

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FITOQUÍMICA DO CAULE DE *Citrus limonia* ENXERTADO
COM *C. sinensis* E DA ESPÉCIE *Nycticalanthus speciosus*
(RUTACEAE) E BIOSÍNTESE DE CUMARINAS PRENILADAS**

ALAN BEZERRA RIBEIRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA, na área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

*bolsista CNPq

São Carlos-SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado do candidato Alan Bezerra Ribeiro realizado em 19 de outubro de 2006.

Profa.Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
(UFSCar) - orientadora

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Maysa Furlan (IQ-UNESP-Araraquara)

Prof. Dr. Sérgio Alves de Carvalho
(Centro APTA citros-IAC-Cordeirópolis)

Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea (UFMA)

Minha terra tem palmeiras,
Onde canta o sabiá;
As aves que aqui gorjeiam,
Não gorjeiam como lá.

Nosso céu tem mais estrelas,
Nossas várzeas têm mais flores,
Nossos bosques têm mais vida,
Nossa vida mais amores.

...

Não permita Deus que eu morra,
Sem que volte para lá;
Sem que desfrute os primores
Que não encontro por cá;
Sem qu'inda aviste as palmeiras,
Onde canta o Sabiá.

Gonçalves Dias

Dedico...

Aos meus pais, Antonio José Ribeiro Filho e Leolina Bezerra Ribeiro, pelo apoio e incentivo sempre de forma amável e confiante.

À minha esposa e amante Kiria Karine L. M. Ribeiro, meu verdadeiro amor, pela constante ajuda em qualquer momento de minha vida.

Aos meus irmãos, Sérgio, Fernando e Jane, sempre apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus minha grande Fé;

À Prof^a Dr^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação sempre disposta e pelos ensinamentos e conselhos.

À Prof^a Dr^a Maysa Furlan, pelos ensinamentos, colaboração e disposição na execução deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Carvalho pela sua disposição em colaborar com este trabalho.

Aos professores do DQ pelos ensinamentos.

Ao pessoal do RMN principalmente à Luciana pela sua ajuda e paciência na produção dos espectros.

Ao Rodrigo Fachini pela realização dos ensaios antifúngicos.

Aos todos os amigos do laboratório de Produtos Naturais não podendo deixar de mencionar alguns como Moacir, Lica, Tuca, Cleverson, Sheylla, Simone, Taty, Paula, Anna, Karine, Verardi e Márcio, entre tantos outros aos quais peço desculpas por não mencionar o nome, pelo apoio, ensinamentos e descontrações no dia-dia.

A todos da “Família Trapo”: Érika e Márcio, Natilene e Alan, Adriana e Roberto, Louise Lee, Cleones, Ozelito e Hugo, pelo apoio nas horas difíceis e ótimas descontrações nos momentos de alegria, sempre tentando fazer de São Carlos e Araraquara nossa amada São Luís.

Aos amigos Paraenses Sebastião, Paty Marinho, Andrey, Thiago, Adriano e Edson, principalmente pelas conversas “na mesma língua”.

As amigas Adriana e Débora pelas colaborações nos ensaios enzimáticos. Mesmo em vários momentos difíceis sempre achávamos um jeito de dar boas risadas;

Aos amigos dos laboratórios de Síntese, HPLC e RMN, agradeço a todos pelas colaborações;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	P.
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE QUADROS.....	xxiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxiv
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS.....	xxv
RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxii
PREFÁCIO	1
OBJETIVOS	5
1 - ESTUDO FITOQUÍMICO DO PORTA-ENXERTO DE <i>Citrus sinensis</i> SOBRE <i>C. limonia</i>	7
1.1 - FAMÍLIA RUTACEAE.....	7
1.2 – ENXERTIA.....	11
1.3 - ENXERTO DE <i>Citrus sinensis</i> SOBRE <i>C. limonia</i>	14
1.4 - PARTE EXPERIMENTAL.....	19
1.4.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	19
1.4.2 - Coleta do material botânico.....	21
1.5 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	22
1.5.1 - Fracionamentos do extrato Hexano-Diclorometânico (HD).....	24
1.6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
1.6.1 – Cumarinas.....	31
1.6.1.1 – Identificação da Substância I (Suberosina).....	31
1.6.1.2 – Identificação da Substância II (Xantiletina).....	41
1.6.1.3 – Identificação da Substância III (Seselina).....	46
1.6.1.4 – Identificação da Substância IV (Tamarina).....	51
1.6.1.5 – Identificação da Substância V (Crenulatina).....	58
1.6.2 – Flavonóides.....	61
1.6.2.1 – Identificação da Substância VI (Limonianina).....	61
1.6.2.2 – Identificação da Substância VII (Lupinifolina).....	69
1.6.2.3 – Identificação da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	80
1.6.3 – Alcalóide.....	91
1.6.3.1 – Identificação da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	91
2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A <i>Guignardia citricarpa</i>	101
2.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	106
2.1.1 – Materiais e métodos.....	106
2.1.1.1 – Materiais e reagentes utilizados.....	106

2.1.1.2 – Obtenção das substâncias ensaiadas.....	106
2.1.1.3 – Patógeno.....	107
2.1.2 – Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa in vitro</i> pelo método de difusão em agar.....	107
2.1.3 – Ensaio de inibição de <i>G. citricarpa, in vitro</i> , pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.....	109
2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	112
3 - ESTUDO BIOSINTÉTICO DE CUMARINAS PRENILADAS...	117
3.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	125
3.1.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	125
3.1.2 - Coleta do material botânico.....	128
3.1.3 – Protocolo para avaliação da atividade da enzima preniltransferase.....	128
3.1.4 – Protocolo de incorporação de precursores marcados com radioisótopos.....	129
3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	130
3.2.1 – Dosagem protéica do extrato enzimático das raízes.....	144
3.2.2 – Eletroforese em Gel.....	146
3.2.3 – Quantificação dos produtos da reação de prenilação.....	148
3.2.4 – Experimento de incorporação de IPP- ¹⁴ C.....	150
4 - ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Nycticalanthus speciosus</i>	153
4.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	155
4.1.1 - Materiais e reagentes utilizados.....	155
4.1.2 - Coleta do material botânico.....	157
4.2 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	158
4.2.1 - Fracionamentos do extrato diclorometânico do caule (EDGN)....	159
4.2.3 - Fracionamentos do extrato diclorometânico das raízes (EDRN)..	162
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	165
4.3.1 – Alcalóides.....	165
4.3.1.1 – Identificação da Substância X (Dictamina).....	165
4.3.1.2 – Identificação da Substância XI (γ -fagarina).....	170
4.3.1.3 – Identificação da Substância XII (Esquimianina).....	175
4.3.1.4 – Identificação da Substância XIII (1-metil-4-metoxi-2-quinolona).....	180
4.3.1.5 – Identificação da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	185
4.3.1.6 – Identificação da Substância XV (Rutaecarpina).....	190
4.3.1.7 – Identificação da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	200
4.3.2 – Cumarina.....	212
4.3.2.1 – Identificação da Substância XVII (Seselina).....	212
4.3.3 – Limonóides.....	213
4.3.3.1 – Identificação da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	213

4.3.3.2 – Identificação da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila).....	230
4.3.3.3 – Identificação da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	243
5 – CONCLUSÕES.....	257
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	259

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ϕ = diâmetro

δ = deslocamento químico

J = constante de acoplamento

s = singleto

d = dubleto

dd = duplo dubleto

dl = dubleto largo

ddd = duplo duplo dubleto

t = tripleto

tl = tripleto largo

$quint$ = quinteto

m = multipleto

m/z = relação massa/carga

CC = cromatografia em coluna

CCDA = cromatografia em camada delgada analítica

CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa

CG-MS = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

Hex = hexano

AcOEt = acetato de etila

DCM = diclorometano

Dtt = 1,4-ditiotreitol

MeOH = metanol

RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

COSY = correlated spectroscopy

HSQC = heteronuclear single quantum correlation

HMBC = heteronuclear multiple quantum correlation

DEPT = “distortionless enhancement by polarization transfer”

NOESY = nuclear overhauser effect spectroscopy

DMAPP = pirofosfato de dimetilalila

EDTA = etileno diamino tetracético (dissódico)

PVPP = polivinilpolipirrolidona

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonil

TEMED = N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina

dpm = decaimento por minuto

LISTA DE TABELAS

	P.
TABELA 1.1: Dados de RMN de ^1H da substância I (Suberosina) em comparação com dados da literatura.....	36
TABELA 1.2: Dados de RMN de ^{13}C da substância I (Suberosina).....	36
TABELA 1.3: Dados de RMN de ^1H da substância II (Xantiletina) em comparação com dados da literatura.....	43
TABELA 1.4: Dados de RMN de ^{13}C da substância II (Xantiletina)....	43
TABELA 1.5: Dados de RMN de ^1H da substância III (Seselina) em comparação com dados da literatura.....	48
TABELA 1.6: Dados de RMN de ^{13}C da substância III (Seselina).....	48
TABELA 1.7: Dados de RMN de ^1H da substância IV (Tamarina) em comparação com dados da literatura.....	54
TABELA 1.8: Dados de RMN de ^{13}C da substância IV (Tamarina)....	54
TABELA 1.9: Dados de RMN de ^1H da substância V (Crenulatina) em comparação com dados da literatura.....	59
TABELA 1.10: Dados de RMN de ^1H da substância VI (Limonianina) em comparação com dados da literatura.....	64
TABELA 1.11: Dados de RMN de ^{13}C da substância VI (Limonianina).....	64
TABELA 1.12: Dados de RMN de ^1H da substância VII (Lupinifolina) em comparação com dados da literatura.....	74
TABELA 1.13: Dados de RMN de ^{13}C da substância VII (Lupinifolina).....	75
TABELA 1.14: Dados de RMN de ^1H da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	85
TABELA 1.15: Dados de RMN de ^{13}C da substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	86
TABELA 1.16: Dados de RMN de ^1H da substância IX (5-hidroxinoracrinicina) em comparação com dados da literatura.....	94
TABELA 1.17: Dados de RMN de ^{13}C obtidos pela projeção do HSQC da substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	94
TABELA 3.1: Experimentos de reação de prenilação.....	134
TABELA 3.2: Formação dos produtos xantiletina, seselina e suberosina com os precursores umbeliferona e herniarina em diferentes horários de coleta da planta.....	140
TABELA 3.3: Dados para determinação da curva padrão da ovoalbumina.....	145
TABELA 3.4: Concentrações de proteínas dos extratos enzimáticos da planta enxertada.....	146

TABELA 3.5: Concentrações dos produtos da reação de prenilação....	149
TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H da substância X (Dictamina) em comparação com dados da literatura.....	167
TABELA 4.2: Dados de RMN de ^{13}C da substância X (Dictamina).....	167
TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H da substância XI (γ -Fagarina) em comparação com dados da literatura.....	172
TABELA 4.4: Dados de RMN de ^{13}C da substância XI (γ -Fagarina)....	172
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da substância XII (Esquimianina) em comparação com dados da literatura.....	177
TABELA 4.6: Dados de RMN de ^{13}C da substância XII (Esquimianina).....	177
TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H da substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona) em comparação com dados da literatura.....	182
TABELA 4.8: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	182
TABELA 4.9: Dados de RMN de ^1H da substância XIV (N-Metilflindersina) em comparação com dados da literatura.....	187
TABELA 4.10: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIV (N-Metilflindersina).....	187
TABELA 4.11: Dados de RMN de ^1H da substância XV (Rutaecarpina) em comparação com dados da literatura.....	194
TABELA 4.12: Dados de RMN de ^{13}C da substância XV (Rutaecarpina).....	194
TABELA 4.13: Dados de RMN de ^1H da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina) em comparação com dados da literatura.....	205
TABELA 4.14: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	205
TABELA 4.15: Dados de HSQC e HMBC da substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	206
TABELA 4.16: Dados de RMN de ^1H da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	220
TABELA 4.17: Dados de RMN de ^{13}C da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	221
TABELA 4.18: Dados de HSQC e HMBC da substância XVIII (2-hidroxi-isoobacunoato de metila).....	222
TABELA 4.19: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeppiisoobacunoato de metila)....	233
TABELA 4.20: Dados de RMN de ^{13}C da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeppiisoobacunoato de metila).....	234
TABELA 4.21: Dados de HSQC e HMBC da substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeppiisoobacunoato de metila).....	235
TABELA 4.22: Dados de RMN de ^1H e do experimento de COSY da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	249

TABELA 4.23: Dados de RMN de ^{13}C da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	250
TABELA 4.24: Dados de HSQC e HMBC da substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino).....	251

LISTA DE FIGURAS

	P.
FIGURA 1.1: Processo de formação de uma planta de citros enxertada via borbulha.....	13
FIGURA 1.2: Foto de plantas de <i>Citrus limonia</i> Osbeck (limão Cravo) enxertadas com <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck (laranja Pêra).....	22
FIGURA 1.3: Estrutura química da cumarina Suberosina (Substância I)..	31
FIGURA 1.4: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância I.....	32
FIGURA 1.5: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância I.....	33
FIGURA 1.6: Correlações observadas no experimento de HMBC para a unidade isoprênica da Substância I.....	35
FIGURA 1.7: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	37
FIGURA 1.8: Experimento de COSY (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	38
FIGURA 1.9: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	39
FIGURA 1.10: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da Substância I (Suberosina).....	40
FIGURA 1.11: Espectro de massas da Suberosina (Substância I).....	41
FIGURA 1.12: Estrutura química da cumarina Xantiletina (Substância II).....	41
FIGURA 1.13: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).....	44
FIGURA 1.14: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância II (Xantiletina).....	45
FIGURA 1.15: Espectro de massas Xantiletina (Substância II).....	46
FIGURA 1.16: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância III)..	46
FIGURA 1.17: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).....	49
FIGURA 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da Substância III (Seselina).....	50
FIGURA 1.19: Espectro de massas Seselina (Substância III).....	51
FIGURA 1.20: Estrutura química da cumarina Tamarina (Substância IV).....	51
FIGURA 1.21: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância IV.....	53
FIGURA 1.22: Espectro (e ampliações) de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância IV (Tamarina).....	55
FIGURA 1.23: Experimento de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da Substância	

IV (Tamarina).....	56
FIGURA 1.24: Experimento de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da Substância IV (Tamarina).....	57
FIGURA 1.25: Espectro de massas da Tamarina (Substância IV).....	58
FIGURA 1.26: Estrutura química da cumarina Crenulatina (Substância V).....	58
FIGURA 1.27: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da Substância V (Crenulatina).....	60
FIGURA 1.28: Estrutura química da flavona Limonianina (Substância VI).....	61
FIGURA 1.29: Correlações observadas no experimento de NOESY da Substância VI.....	63
FIGURA 1.30: Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	65
FIGURA 1.31: Experimento de HSQC (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	66
FIGURA 1.32: Espectro de ¹³ C (100 MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	67
FIGURA 1.33: Experimento (ampliação) de NOESY (400MHz, Acetona-d ₆) da Substância VI (Limonianina).....	68
FIGURA 1.34: Espectro de massas da Limonianina (Substância VI).....	69
FIGURA 1.35: Estrutura química da flavanona Lupinifolina (Substância VII).....	69
FIGURA 1.36: Possibilidades de posicionamento do anel pirano e da prenila na estrutura da flavanona.....	72
FIGURA 1.37: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância VII.....	73
FIGURA 1.38: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	76
FIGURA 1.39: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	77
FIGURA 1.40: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	78
FIGURA 1.41: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl ₃) da Substância VII (Lupinifolina).....	79
FIGURA 1.42: Espectro de massas da Lupinifolina (Substância VII).....	80
FIGURA 1.43: Estrutura química da flavanona 5,4'-dihidroxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).....	80
FIGURA 1.44: Correlações complementares observadas no experimento de HMBC da Substância VIII.....	82
FIGURA 1.45: Correlações observadas no experimento de HMBC da Substância VIII que confirmam o posicionamento da prenila no anel A da flavanona.....	84

FIGURA 1.46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	87
FIGURA 1.47: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	88
FIGURA 1.48: Experimento de HMQC (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	89
FIGURA 1.49: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl_3) da Substância VIII (5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona).....	90
FIGURA 1.50: Espectro de massas da 5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (Substância VIII).....	91
FIGURA 1.51: Estrutura química da cumarina 5-hidroxinoracronicina (Substância IX).....	92
FIGURA 1.52: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância IX.....	93
FIGURA 1.53: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	95
FIGURA 1.54: Experimento de COSY (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	96
FIGURA 1.55: Experimento de HSQC (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	97
FIGURA 1.56: Experimento de NOESY (400 MHz, Acetona- d_6) da Substância IX (5-hidroxinoracrinicina).....	98
FIGURA 1.57: Espectro de massas da 5-hidroxinoracrinicina (Substância IX).....	99
FIGURA 2.1: Sintomas da mancha preta dos citros observadas em frutos – Figura extraída do <i>website</i> da FUNDECITRUS.....	103
FIGURA 2.2: Ascósporos (A) e Picnidiósporo (B) de <i>Guignardia citricarpa</i>	104
FIGURA 2.3: Ciclo da doença mancha preta dos citros. – Figura extraída do <i>website</i> da FUNDECITRUS.....	105
FIGURA 2.4: Demonstração do crescimento e inibição do fungo <i>G. citricarpa</i> pelo método de difusão em ágar. (a) crescimento sem inibição do fungo; (b) Inibição do crescimento do fungo próximo aos poços (1, 2 e 3) onde foi adicionado uma substância com potencial antifúngico.....	109

FIGURA 2.5: Germinação de picnidiósporos e formação de apressório de <i>Phyllosticta citricarpa</i> (teleomorfo: <i>Guignardia citricarpa</i>) a partir de picnídios formados em folhas de <i>Citrus</i> (a). Massa de picnidiósporos na superfície do ostíolo do picnídio (b); Picnidiósporos ainda não germinados (c); Placa de Petri com papel de filtro umedecido e placas de vidro em forma de cruz onde se realiza o experimento de inibição (d); Germinação do picnidiósporo e formação de apressório de <i>P. citricarpa</i> (e – f) após 12 e 16h.....	111
FIGURA 3.1: Biossíntese da cumarina Umbeliferona (3) a partir do Ácido cinâmico (1).....	119
FIGURA 3.2: Biossíntese das piranocumarinas Xantiletina (13) e Seselina (16) a partir da cumarina Umbeliferona (3).....	121
FIGURA 3.3: Reação de prenilação da umbeliferona (a) e herniarina (b).	131
FIGURA 3.4: Cromatogramas da xantiletina (a), seselina (b) e suberosina (d).....	132
FIGURA 3.5: Cromatogramas da xantiletina (g) e seselina (h).....	133
FIGURA 3.6: Cromatograma de um branco com presença de endógenos.	135
FIGURA 3.7: Cromatograma da reação de prenilação obtido por CLAE-MS.....	135
FIGURA 3.8: Fragmentogramas dos picos 1 (xantiletina), 2 (seselina) e 3 (suberosina).....	136
FIGURA 3.9: Cromatograma de uma reação de prenilação com precursor umbeliferona e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco.....	137
FIGURA 3.10: Cromatograma da reação de prenilação realizada às 23:00h, com precursor herniarina e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco...	138
FIGURA 3.11: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule inferior sobreposto ao branco.....	142
FIGURA 3.12: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule superior sobreposto ao branco.....	143
FIGURA 3.13: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático das folhas sobreposto ao branco.....	143
FIGURA 3.14: Eletroforese em gel de poli(acrilamida) de extratos das raízes e folhas.....	147
FIGURA 3.15: Foto do experimento de incorporação do IPP- ^{14}C nas raízes do enxerto de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	150
FIGURA 4.1: Estrutura química do alcalóide Dictamina (Substância X)..	165
FIGURA 4.2: Espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da Substância X (Dictamina).....	168
FIGURA 4.3: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) da Substância X (Dictamina).....	169
FIGURA 4.4: Espectro de massas da Dictamina (Substância X).....	170
FIGURA 4.5: Estrutura química do alcalóide γ -Fagarina (Substância XI).....	170
FIGURA 4.6: Espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da Substância	

XI (γ -Fagarina).....	173
FIGURA 4.7: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XI (γ -Fagarina).....	174
FIGURA 4.8: Espectro de massas da γ -Fagarina (Substância XI).....	175
FIGURA 4.9: Estrutura química do alcalóide Esquimianina (Substância XII).....	175
FIGURA 4.10: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).....	178
FIGURA 4.11: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XII (Esquimianina).....	179
FIGURA 4.12: Espectro de massas da Esquimianina (Substância X).....	180
FIGURA 4.13: Estrutura química do alcalóide 1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).....	180
FIGURA 4.14: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	183
FIGURA 4.15: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIII (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	184
FIGURA 4.16: Espectro de massas da 1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (Substância XIII).....	185
FIGURA 4.17: Estrutura química do alcalóide N-Metilflindersina (Substância XIV).....	185
FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	188
FIGURA 4.19: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XIV (N-Metilflindersina).....	189
FIGURA 4.20: Espectro de massas da N-Metilflindersina (Substância XIV).....	190
FIGURA 4.21: Estrutura química do alcalóide Rutaecarpina (Substância XV).....	190
FIGURA 4.22: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.....	192
FIGURA 4.23: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XV.....	192
FIGURA 4.24: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	195
FIGURA 4.25: Experimento de HSQC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	196
FIGURA 4.26: Experimento de COSY (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	197
FIGURA 4.27: Experimento de HMBC (e ampliação) (400MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	198
FIGURA 4.28: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância XV (Rutaecarpina).....	199
FIGURA 4.29: Estrutura química do alcalóide 8,8a-seco-8-carboxi-14-	

N-Metilrutaecarpina (Substância XVI).....	200
FIGURA 4.30: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	201
FIGURA 4.31: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	201
FIGURA 4.32: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	202
FIGURA 4.33: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	203
FIGURA 4.34: Correlações observadas no experimento de HMBC para a Substância XVI.....	204
FIGURA 4.35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	207
FIGURA 4.36: Experimento de HSQC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	208
FIGURA 4.37: Experimento de COSY (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	209
FIGURA 4.38: Experimento de HMBC (400MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	210
FIGURA 4.39: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) da Substância XVI (8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina).....	211
FIGURA 4.40: Estrutura química da cumarina Seselina (Substância XVII).....	212
FIGURA 4.41: Estrutura química do limonóide 2-hidroxi-epiisobacunoato de metila (Substância XVIII).....	213
FIGURA 4.42: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel furano da Substância XVIII.....	214
FIGURA 4.43: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XVIII.....	215
FIGURA 4.44: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel C da Substância XVIII.....	216
FIGURA 4.45: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XVIII.....	217
FIGURA 4.46: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XVIII.....	218
FIGURA 4.47: Correlações observadas no experimento de HMBC para o grupo carbometoxi da Substância XVIII.....	219
FIGURA 4.48: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	223
FIGURA 4.49: Experimento de COSY (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	224
FIGURA 4.50: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl_3) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	225
FIGURA 4.51: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl_3) da Substância	

XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	226
FIGURA 4.52: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	227
FIGURA 4.53: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	228
FIGURA 4.54: Experimento de NOESY (400MHz, CDCl ₃) da Substância XVIII (2-hidroxi-epiisobacunoato de metila).....	229
FIGURA 4.55: Estrutura química do limonóide 2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila (Substância XIX).....	230
FIGURA 4.56: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XIX.....	231
FIGURA 4.57: Possibilidades de oxidação do anel furano para a Substância XIX.....	232
FIGURA 4.58: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	236
FIGURA 4.59: Experimento de HSQC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	237
FIGURA 4.60: Experimento de HMBC (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	238
FIGURA 4.61: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	239
FIGURA 4.62: Espectro de DEPT 135 (100 MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	240
FIGURA 4.63: Experimento de COSY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	241
FIGURA 4.64: Experimento de NOESY (400MHz, MeOD) da Substância XIX (2,21-dihidroxi-23-oxoeipiisobacunoato de metila).....	242
FIGURA 4.65: Estrutura química do limonóide 7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino (Substância XX).....	243
FIGURA 4.66: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel A da Substância XX.....	244
FIGURA 4.67: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel lactônico da Substância XX.....	245
FIGURA 4.68: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel B da Substância XX.....	247
FIGURA 4.69: Correlações observadas no experimento de HMBC para o anel D da Substância XX.....	248
FIGURA 4.70: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	252
FIGURA 4.71: Experimento de HSQC (400MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	253
FIGURA 4.72: Experimento de HMBC (400MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	254
FIGURA 4.73: Experimento de COSY (400MHz, CDCl ₃) da Substância	

XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	255
FIGURA 4.74: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da Substância XX (7-acetil-21-hidroxi-23-oxotectleanino).....	256

LISTA DE QUADROS

	P.
QUADRO 1.1: Substâncias isoladas do caule superior e folhas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	17
QUADRO 1.2: Substâncias isoladas das raízes do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	18
QUADRO 4.1: Substâncias isoladas dos galhos de <i>Nycticalanthus</i> <i>speciosus</i>	154

LISTA DE ESQUEMAS

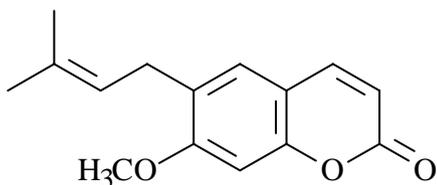
	P.
ESQUEMA 1.1: Preparação dos extratos Hexano-Diclorometânico (HD) e Metanólico a partir do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	23
ESQUEMA 1.2: Fracionamento do extrato Hexano-Diclorometânico com obtenção das substâncias IX e VI.....	26
ESQUEMA 1.3: Fracionamento da subfração C 2.2 com obtenção das Substâncias I, VII e VIII.....	28
ESQUEMA 1.4: Fracionamento das subfrações C 2.2.4 e C 2.2.6 com obtenção das Substâncias II, III, IV, V e IX.....	30
ESQUEMA 4.1: Preparação dos extratos diclorometânico (EDCN), acetato de estila (EACN), n-butanólico (EBCN) e aquoso (EAqCN) do caule de <i>N. speciosus</i>	159
ESQUEMA 4.2: Fracionamento do extrato diclorometânico (EDCN) com obtenção das substâncias XI, XII, XVI, XVIII e XIX.....	161
ESQUEMA 4.3: Fracionamento do extrato EDRN com obtenção das substâncias X, XIII, XIV, XV, XVII, XVIII e XX.....	164

LISTA DE GRÁFICOS

	P.
GRÁFICO 2.1: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> na germinação de picnidiósporos de <i>G. citricarpa</i>	114
GRÁFICO 2.2: Efeito das substâncias isoladas do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> na formação de apressórios (b) de <i>G. citricarpa</i>	115
GRÁFICO 3.1: Comparação da formação da xantiletina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	139
GRÁFICO 3.2: Comparação da formação da seselina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	139
GRÁFICO 3.3: Comparação da formação da suberosina com o horário de reação, utilizando a umbeliferona e a herniarina como precursores.....	140
GRÁFICO 3.4: Comparação da formação da xantiletina, seselina e suberosina com cofator $MgCl_2$ e $MnCl_2$, utilizando como precursor a herniarina.....	141
GRÁFICO 3.5: Curva padrão da Ovoalbumina.....	145
GRÁFICO 3.6: Curva de calibração da Xantiletina.....	148
GRÁFICO 3.7: Curva de calibração da Seselina.....	149
GRÁFICO 3.8: Curva de calibração da Suberosina.....	149
GRÁFICO 3.9: Incorporação do IPP- ^{14}C obtido do extrato das raízes após 52 h.....	151
GRÁFICO 3.10: Incorporação do IPP- ^{14}C obtido do extrato das folhas após 52 h.....	151

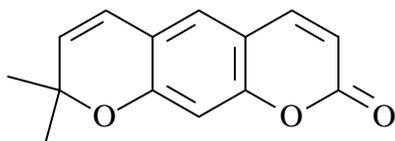
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

CAULE DE *CITRUS LIMONIA* ENXERTADO DE *C. SINENSIS*



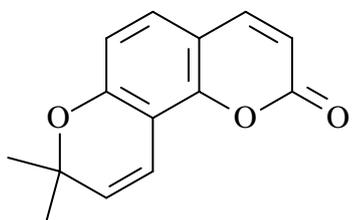
Suberosina (I)

Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 31)



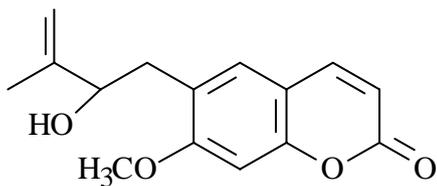
Xantiletina (II)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 41)



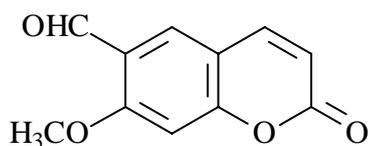
Seselina (III)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 46)



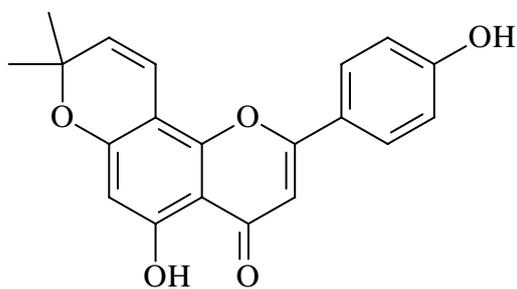
Tamarina (IV)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 51)



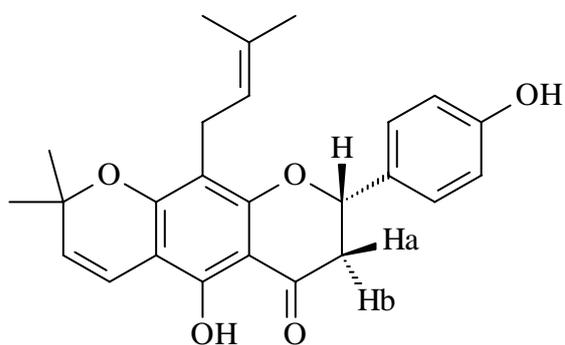
Crenulatina (V)

Isolamento (p. 30)
Identificação (p. 58)



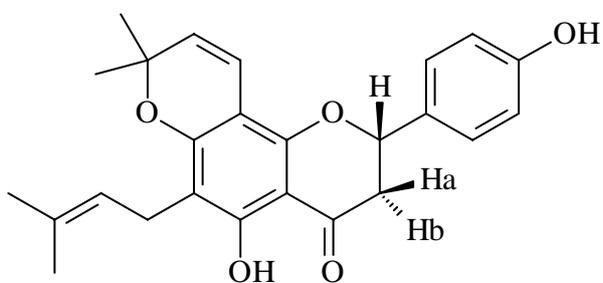
Isolamento (p. 26)
Identificação (p. 61)

Limonianina (VI)



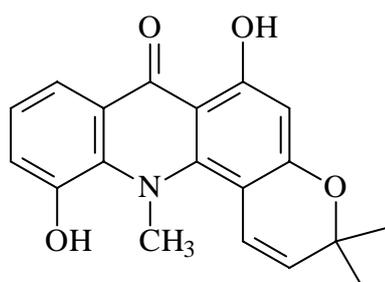
Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 69)

Lupinifolina (VII)



Isolamento (p. 28)
Identificação (p. 80)

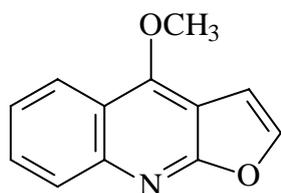
5,4'-diidroxí-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona (VIII)



Isolamento (p. 26)
Identificação (p. 91)

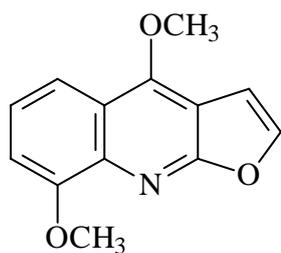
5-hidroxinoracrinicina (IX)

NYCTICALANTHUS SPECIOSUS



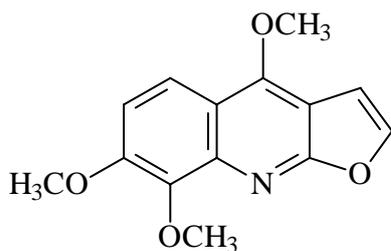
Dictamina (X)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 165)



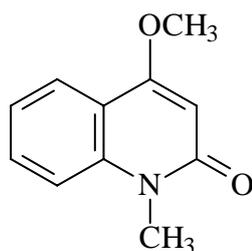
γ-Fagarina (XI)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 170)



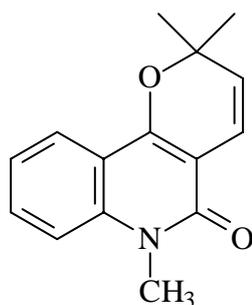
Esquimianina (XII)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 175)



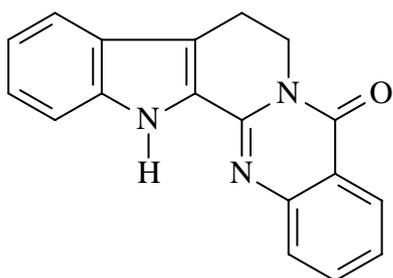
1-Metil-4-metoxi-2-quinolona (XIII)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 180)



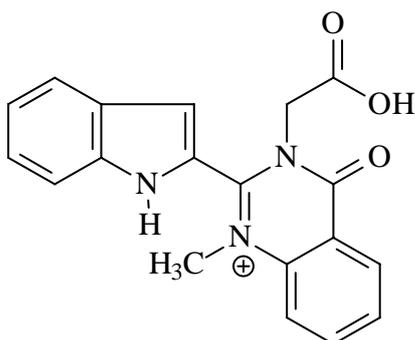
N-Metilflindersina (XIV)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 185)



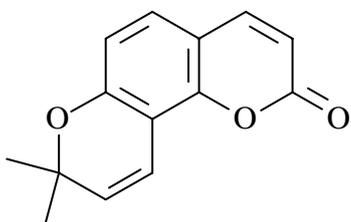
Rutaecarpina (XV)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 190)



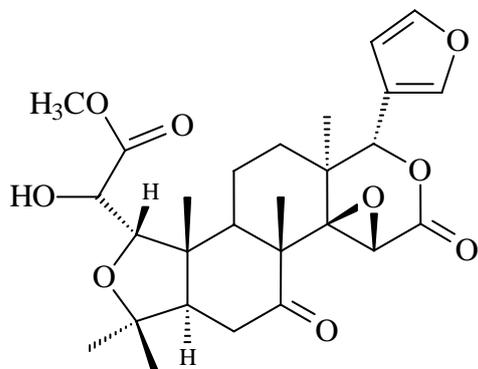
8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina (XVI)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 200)



Seselina (XVII)

Isolamento (p. 164)
Identificação (p. 46)



2-hidroxi-epiisobacunoato de metila (XVIII)

Isolamento (p. 161)
Identificação (p. 213)

RESUMO

FITOQUÍMICA DO CAULE DE *Citrus limonia* ENXERTADO COM *C. sinensis* E DA ESPÉCIE *Nycticalanthus speciosus* (RUTACEAE) E BIOSÍNTESE DE CUMARINAS PRENILADAS – O limão Cravo (*C. limonia*) é o porta-enxerto mais utilizado na citricultura brasileira por sua alta e precoce produtividade, além de sua boa adaptação aos tipos mais comuns de solo e grande resistência à seca, permitindo um maior aproveitamento da safra. Visando complementar o conhecimento químico de enxertos e entender melhor sobre o mecanismo dos mesmos, realizou-se neste trabalho estudo fitoquímico do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*. Estudos fitoquímicos iniciais mostraram a presença de uma maior quantidade de compostos prenilados na parte inferior do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* enquanto que na parte superior do mesmo apenas dois compostos prenilados foram encontrados em poucas quantidades, levando a supor que esses compostos estejam sendo translocados do porta-enxerto para o enxerto. Dessa forma, realizou-se ainda estudo biossintético de cumarinas preniladas para avaliar a atividade da enzima preniltransferase, responsável pela incorporação de unidades isoprênicas nesses compostos, com o intuito de confirmar se há translocação dos mesmos no enxerto estudado. Com o objetivo de se avançar no conhecimento do perfil químico da família Rutaceae, na qual se insere o gênero *Citrus*, este trabalho descreve também o estudo fitoquímico e quimiossistemático da espécie *Nycticalanthus speciosus* pertencente à mesma família. O estudo fitoquímico do porta-enxerto envolveu diferentes métodos cromatográficos e permitiu identificar nove substâncias, sendo uma flavanona inédita, e da espécie *Nycticalanthus speciosus*, foram identificados onze substâncias sendo um alcalóide indolopiridoquinazolínico e três limonóides inéditos. As substâncias isoladas do porta-enxerto foram ensaiadas frente ao fungo *Guignardia citricarpa* causador da Mancha preta dos citros com o objetivo de se obter um possível antifúngico contra esta doença, sendo que duas cumarinas mostraram atividades inibitórias promissoras. O estudo biossintético da enzima preniltransferase realizado com DMAPP, Umbeliferona e Herniarina mostrou que deve estar ocorrendo a translocação da piranocumarina xantiletina, visto que nas diferentes partes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* a enzima se mostrou ativa apenas nas raízes e com isso essa cumarina está sendo metabolizadas nas partes inferiores e translocada para as partes superiores do enxerto.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY OF *Citrus sinensis* GRAFTING ONTO *C. limonia* AND OF THE *Nycticalanthus speciosus* SPECIES (RUTACEAE) AND THE BIOSYNTHESIS OF PRENYLATED COUMARINES - The Cravo lime species (*C. limonia*) acts as the grafting host, mostly used in the Brazilian citriculture and because of its precocious productivity, besides its good adaptation to most common soils, permitting for an optimum harvest. With the aim to contribute to the chemical knowledge of these graftings and to better understand its mechanisms, a phytochemical study of the rootstock from *C. sinensis* onto *C. limonia* were carried out. Earlier studies indicated the presence of a remarkable amount of prenylated compounds in the lower part of the *C. sinensis* graft, onto the *C. limonia*, while at the same time in the upper part these compounds was found in a very small amounts, rising to the assumption that these compounds could have been translocated from the host to the introduced graft species. In this way, biosynthetic studies of prenylated coumarines were also carried out aiming to evaluate the activity of the prenyltransferase enzyme, responsible by the incorporation of the isoprene units in these compounds. With the objective to advance our knowledge and chemical profile of the Rutaceae family, in which the *Citrus* genus is inserted. This study also describes the phytochemical and phytosystematics of the *Nycticalanthus speciosus* species pertaining to the same family. In the study of the rootstock, several different chromatographic methods were applied permitting to identify nine substances one of them being an unpublished flavanone. From the *Nycticalanthus speciosus*, eleven compounds were isolated as well as an indolopiridoquinazolic alkaloid and also three limonoids previously unheard of. The isolated compounds from the rootstock were assayed against the fungus *Guignardia citricarpa*, responsible for the black stains in *Citrus* species', with the objective to find a possible antifungus for this disease. Two coumarines showed premissory inhibitory activities. The biosynthetic study carried out with the prenyltransferase enzyme DMAPP, Umbelliferone and Herniarin showed that the translocation of the pyranocoumarine Xanthylentin should have happened. Seen in the different parts of the grafting of *C. sinensis* onto the *C. limonia* the enzyme were active only in the roots and with this observation, it appears that the coumarine is being metabolized in the lower part and translocated to the upper parts of the graft.

PREFÁCIO

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de suco de citros, sendo exportado cerca de 98% da produção. A cultura dos citros é de grande importância econômica para diversos Estados como São Paulo, Sergipe, Minas Gerais, entre outros, onde as maiores produções são de laranja Pêra seguida de Natal e Valência (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A espécie *Citrus limonia* conhecida popularmente como limão Cravo, é pertencente à família Rutaceae e tem sido utilizada em toda citricultura brasileira como porta-enxerto para o cultivo de diversas plantas cítricas. O emprego deste porta-enxerto recebe grande incentivo por apresentar algumas vantagens como a precocidade no início de produção e aumento na produtividade; resistência à seca e ao frio. Desta forma a maioria das laranjas e tangerinas de melhores qualidades são obtidas do enxerto das mesmas sobre o limão Cravo. Sendo assim, o limão cravo é o principal porta-enxerto sobre o qual foi constituída a citricultura brasileira e está presente atualmente em quase 40% das plantas cítricas (POMPEU JUNIOR, 2005).

A partir do estudo do caule de *C. limonia* enxertado com *C. sinensis*, resultados preliminares mostraram o isolamento de vários metabólitos prenilados como cumarinas, flavonóides e alcalóides, enquanto que no enxerto (*C. sinensis*) apenas dois destes compostos foram encontrados e em pequenas quantidades.

Desta forma, visando avançar no conhecimento químico de enxertos e entender melhor sobre o mecanismo dos mesmos, o grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) vem estudando plantas obtidas por enxertia, as quais atingem o estágio adulto em um tempo bem menor, o que facilita os estudos durante o desenvolvimento do mesmo. Assim, iniciou-se o estudo fitoquímico pelo caule do porta-enxerto

Citrus limonia (limão Cravo) enxertado com *C. sinensis* (laranja Pêra) que, associado ao conhecimento do grupo sobre a química da família Rutaceae tornaria o trabalho experimental mais rápido.

Foram estudadas as partes da planta enxertada separadamente, a raiz do porta-enxerto (*C. limonia*) e o caule e as folhas do enxerto (*C. sinensis*). O estudo da parte superior (caule e folhas) levou ao isolamento quase que exclusivamente de flavonóides. Apenas duas piranocumarinas foram isoladas: xantiletina das folhas e caule e xantoxiletina apenas no caule. Um limonóide, a limonina, foi encontrado nas folhas. O triterpeno friedelina foi obtido nas folhas e caule. Os esteróides comuns em plantas, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3- β -glicopiranosil-sitosterol, também foram isolados do caule (GARCIA, 2005).

O interessante é que nas raízes a classe de maior representatividade foi cumarina, principalmente as piranocumarinas. Apenas dois limonóides - limonina e acetato de limonina - foram encontrados. Ao contrário da parte superior, onde a predominância é flavonóides metoxilados, apenas um flavonóide foi localizado, uma flavanona, que é diferente por ser um piranoflavonóide. Os esteróides comuns em planta, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol também foram isolados das raízes.

A Xantiletina foi isolada em grande quantidade (gramas) nas raízes e apenas em pequenas quantidades (miligramas) nas partes superiores. Este fato chama atenção pela predominância de compostos prenilados na parte inferior do enxerto e associado à ausência do piranoflavonóides na parte superior do enxerto, levando inicialmente a questionar a possível translocação desses metabólitos que estão em grande quantidade na parte inferior para a parte superior do enxerto.

Assim, objetivando entender melhor o mecanismo de plantas enxertadas, neste trabalho será abordado um estudo biossintético para avaliar a

atividade da enzima preniltransferase, responsável pela incorporação de unidades isoprênicas, na formação de metabólitos prenilados.

O perfil químico do gênero *Citrus* é caracterizado pela presença de cumarinas, flavonóides, alcalóides e limonóides, sendo que há um grande número de compostos prenilados presentes neste gênero. Portanto, este trabalho visa também isolar e constatar a presença destes compostos em *C. limonia* quando utilizado como porta-enxerto.

Esses compostos isolados do caule de *C. limonia* foram ensaiados frente ao fungo *Guignardia citricarpa* causador da doença dos citros conhecida como “mancha preta dos citros” visando uma busca de substâncias antifúngicas.

Considerando que a família Rutaceae, estudada pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar, apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários como limonóides, flavonóides, alcalóides, cumarinas, etc., buscase ainda nesta pesquisa, avançar no conhecimento químico desta família, por meio de um estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus*, também pertencente à família Rutaceae, visando o isolamento de metabólitos. Este estudo objetiva um maior conhecimento no perfil químico da família Rutaceae, e toma relevância na medida em que não há dados químicos sobre esta espécie publicados na literatura, exceto estudos iniciados pelo grupo da UFSCar.

Com o intuito de explorar os objetivos desta pesquisa de forma mais clara, este trabalho será apresentado em forma de capítulos, facilitando o acompanhamento do seu desenvolvimento. Cada capítulo apresentará uma abordagem teórica sobre o assunto, sua parte experimental e os dados obtidos. Por fim, será feita uma única conclusão, com uma síntese geral dos resultados obtidos no trabalho.

No **capítulo 1**, será abordado o estudo fitoquímico do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis*. No **capítulo 2**, serão apresentados

os ensaios realizados, utilizando as substâncias isoladas, mostradas no **capítulo 1**, contra o fungo *Guignardia citricarpa*. No **capítulo 3**, serão abordados os ensaios para avaliação da translocação de cumarinas preniladas da parte inferior para a superior de plantas de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis*, por meio da determinação da atividade da enzima preniltransferase. Por último, no **capítulo 4** será mostrado o estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais o estudo fitoquímico do caule do porta-enxerto *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* com o intuito de buscar um maior conhecimento químico de plantas enxertadas; ensaiar as substâncias isoladas a partir deste estudo fitoquímico frente ao fungo *Guignardia citricarpa*, causador da doença “mancha preta dos citros”; e avaliar a reação de prenilação de cumarinas, por meio da determinação da atividade da enzima preniltransferase para verificar a translocação de metabólitos secundários da parte inferior para a superior em plantas de *C. limonia* enxertadas com *C. sinensis*.

Em outra etapa, propôs-se ainda nesta pesquisa realizar o estudo fitoquímico da espécie *Nycticalanthus speciosus* para um maior conhecimento químico da família Rutaceae.

CAPÍTULO 1

1 - ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE DE *CITRUS* *LIMONIA* ENXERTADO COM *C. SINENSIS*

Citrus

Citrus

Citrus

Aurantium

Citrus

Citrus

Citrus

Citrus

Citrus

Papeda

Citrus

Citrus

C halimii

C

grandis

C medica

C reticulata

Citrus

Citrus

Citrus

Citrus

Archicitrus

Metacitrus

Citrus

Citrus

Citrus

C. medica *C. reticulata* *Citrus*
C. grandis

sinensis *Citrus*
C. limonia *C.*

C. limonia

C. medica *C. medica* *C. medica*

volkameriana *C. reticulata* *C. jambhiri* *C.*

reticulata *C. sinensis* *C. grandis* *C.*

C. grandis

C. sinensis

C. limonia

aproximação encostia

garfo garfagem

borbulha

Citrus

FIGURA 1.1

a

borbulha

b

c

d

e - f

g

h - i

j

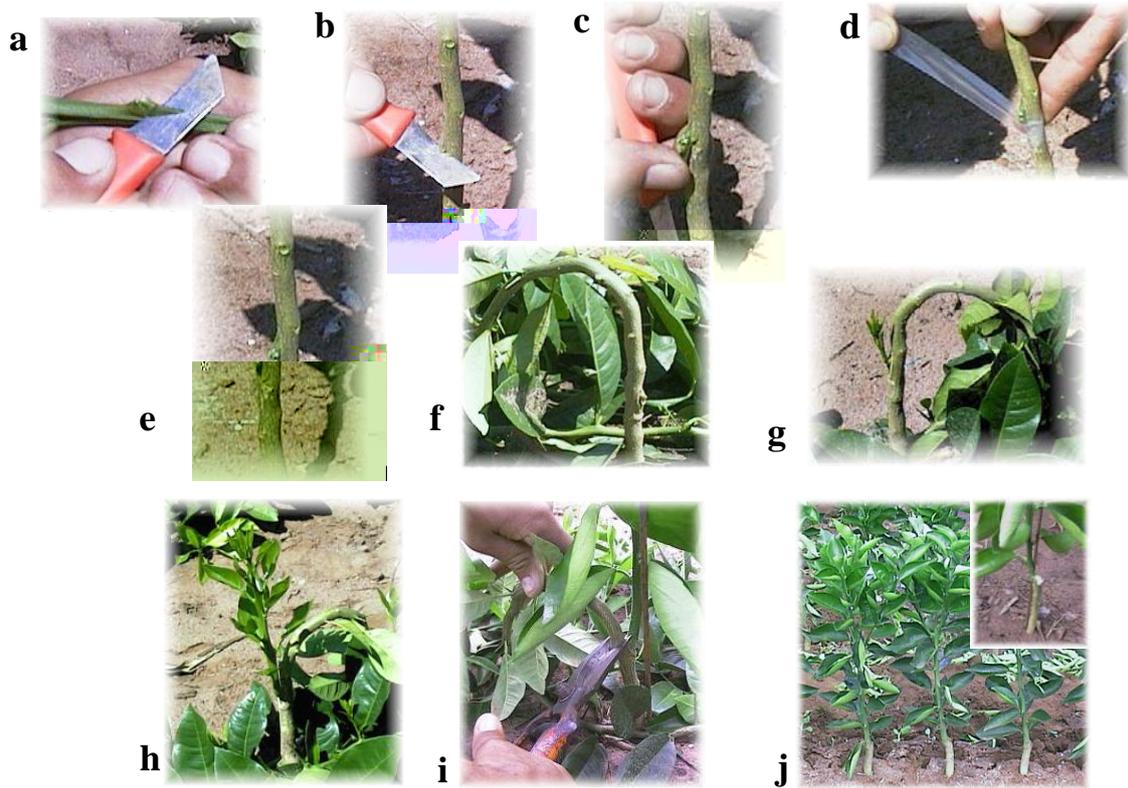


FIGURA 1.1:

website

Citrus sinensis

C. Limonia

sinensis *C. limonia* *C.*

C. sinensis

C. limonia

sinensis **QUADRO 1.1**

C.
C. limonia

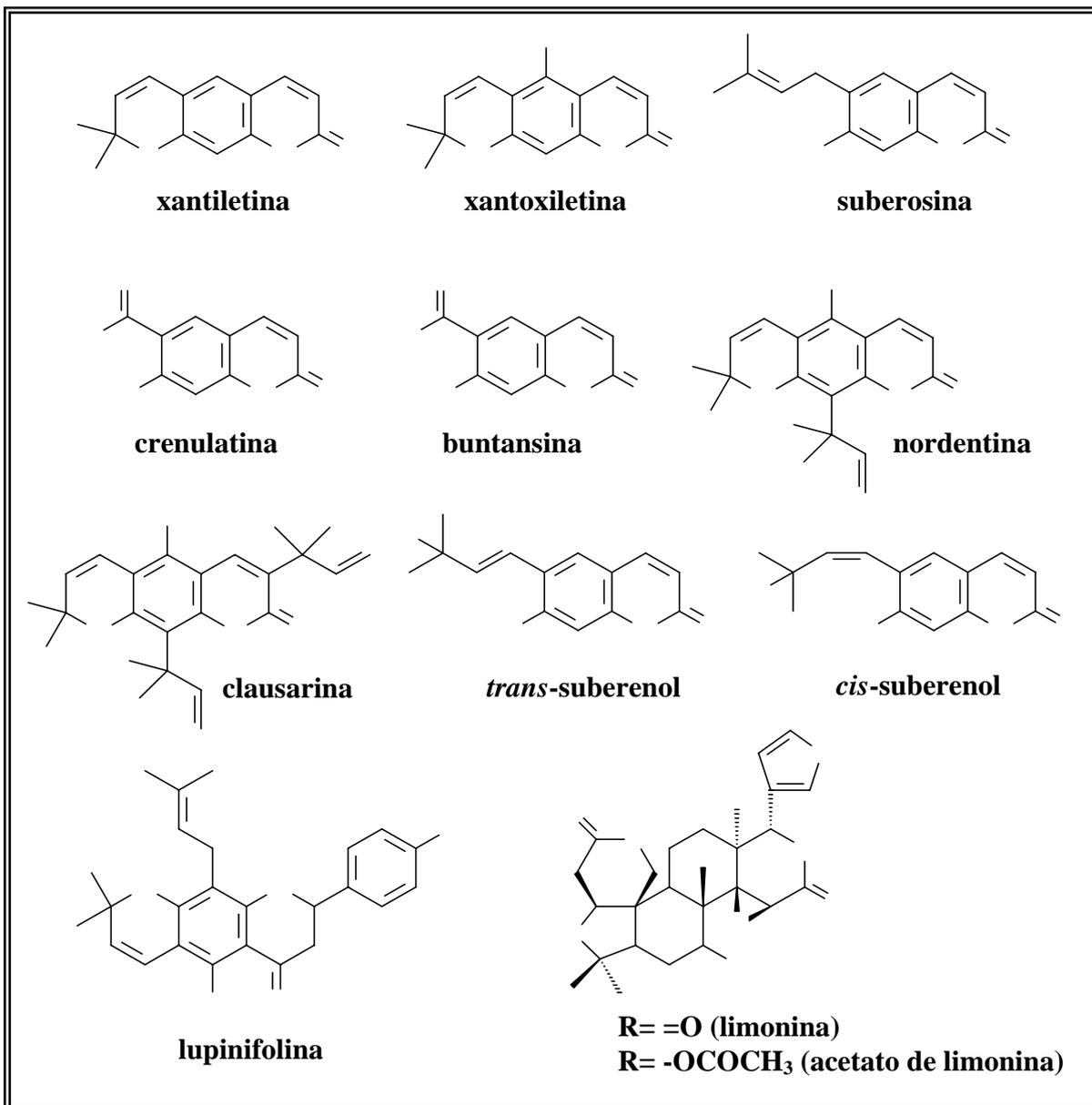
QUADRO 1.2

C. limonia

C.

sinensis

1	4',5,6,7,8-
pentametoxiflavona	
2	4',5,6,7-
tetrametoxiflavona	
3	
3',4',5,6,7-pentametoxiflavona	
4- R: OMe, R ₁ : OMe, R ₂ : OMe, R ₃ : OMe, R ₄ : OMe, R ₅ : OMe, R ₆ : OMe	
(3,3',4',5,6,7,8-heptametoxiflavona	
5	5-hidroxi-
3',4',6,7-tetrametoxiflavona	
6	
3',4',5,6,7,8-hexametoxiflavona	
7	



QUADRO 1.2:

sinensis

C. limonia

C.

•

•

•

μ

μ

•

•

•

μ φ
μ φ

•

•

•

•

Citrus limonia

C. sinensis

FIGURA 1.2

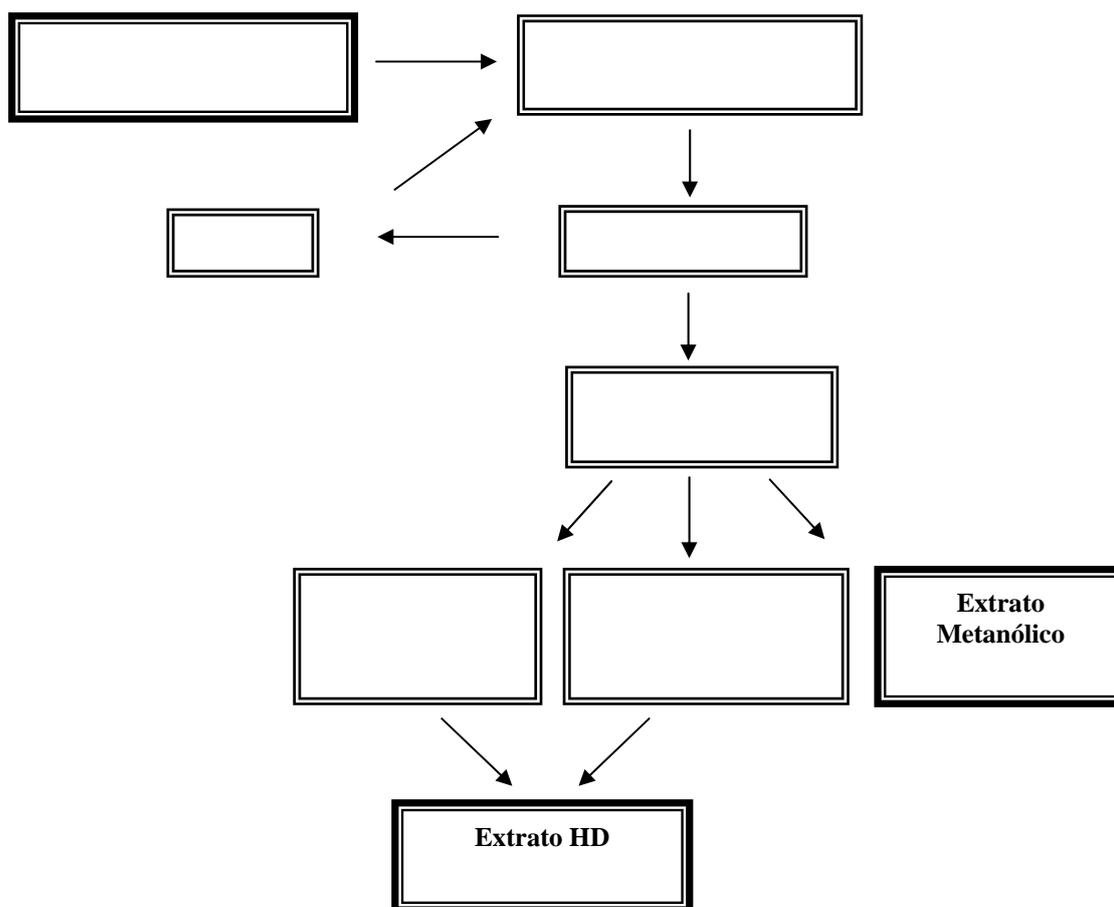


FIGURA 1.2: *Citrus limonia*
C. sinensis

C. limonia

C. sinensis

ESQUEMA 1.1



ESQUEMA 1.1

C. sinensis

C. limonia

Citrus limonia

C.

sinensis

C. limonia

C. sinensis

FIGURA 1.2

φ

ESQUEMA 1.2

C

φ

C 2

φ

ESQUEMA 1.2

C 2.3

ϕ

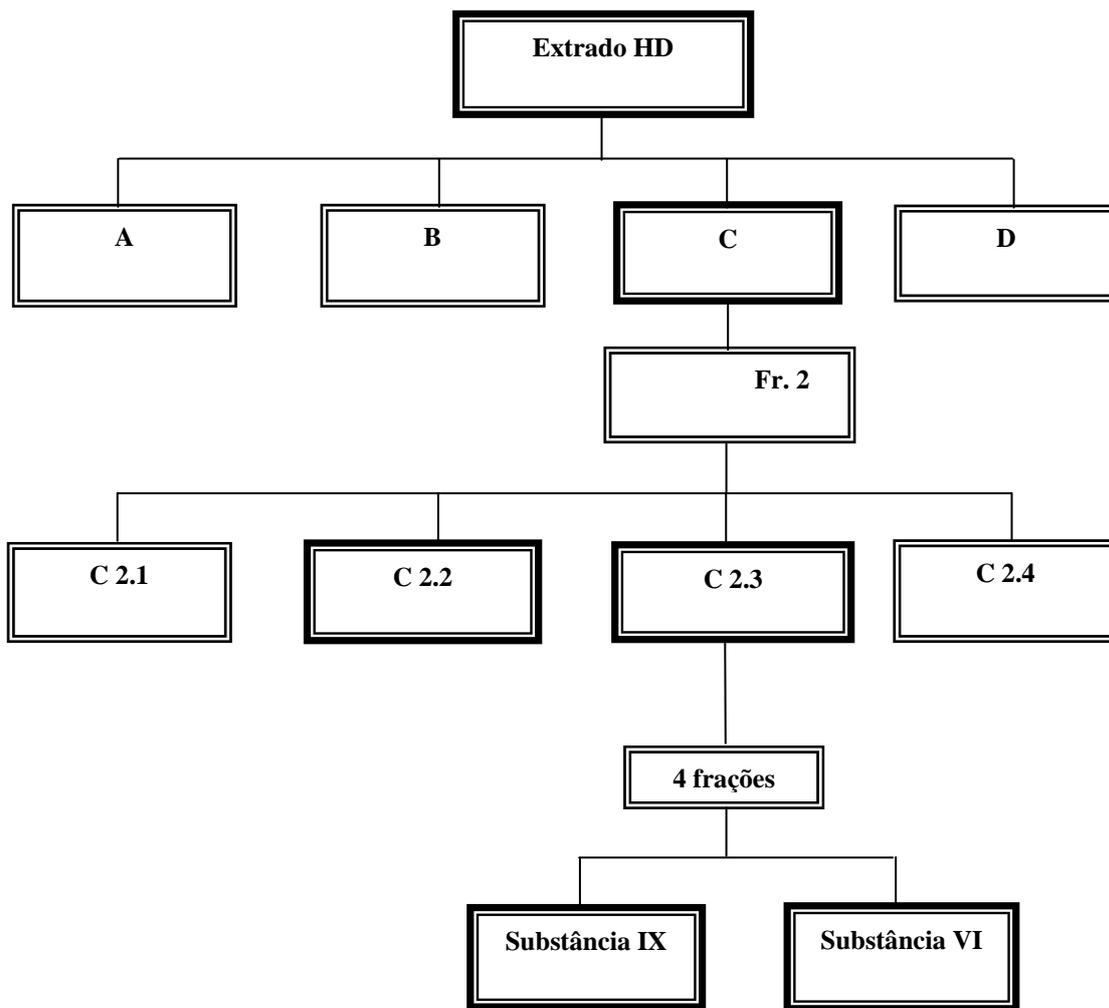
C 2.3.1

ϕ

μ

C 2.3.2

ESQUEMA 1.2



φ
φ
φ
φ

ESQUEMA 1.2

C 2.2

C 2.2

φ

C 2.2.2

C 2.2.2

φ

φ

ESQUEMA 1.3

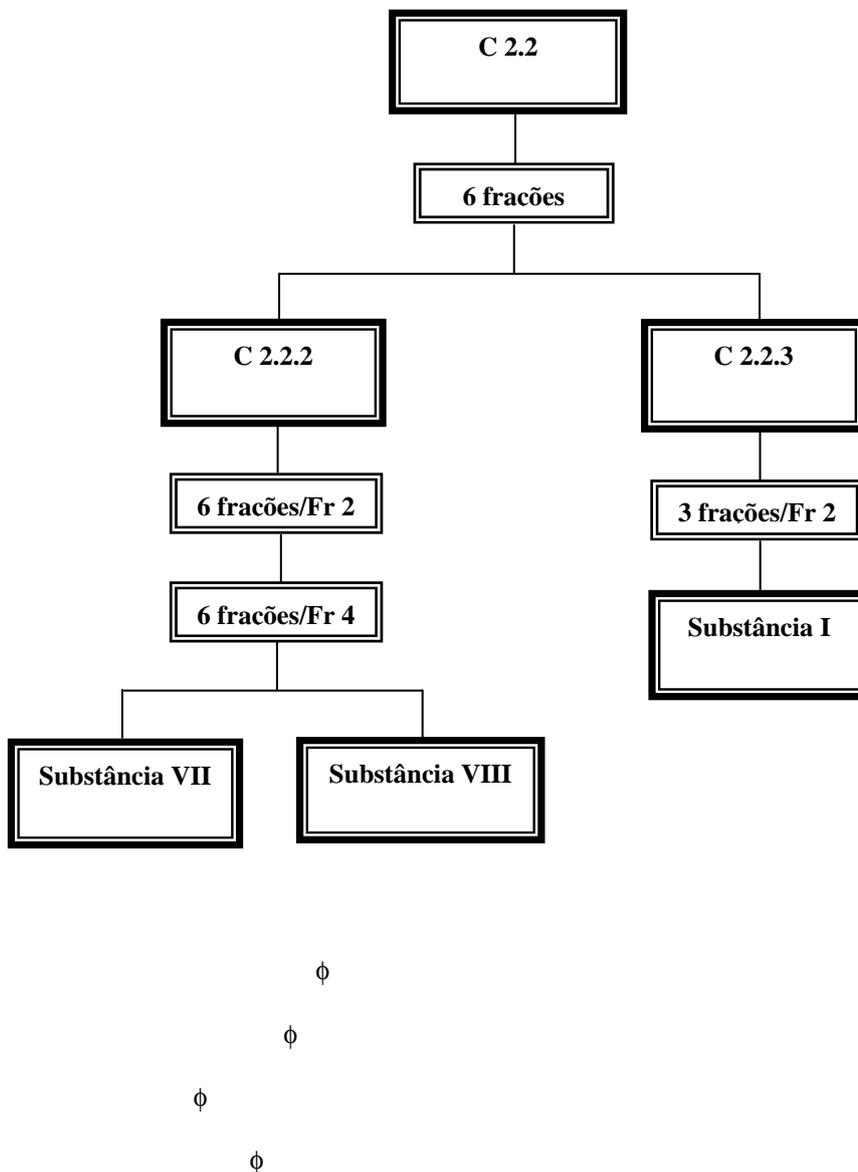
C 2.2

C 2.2.3

C 2.2.3

φ

ESQUEMA 1.3



ESQUEMA 1.3:

C 2.2.4

φ

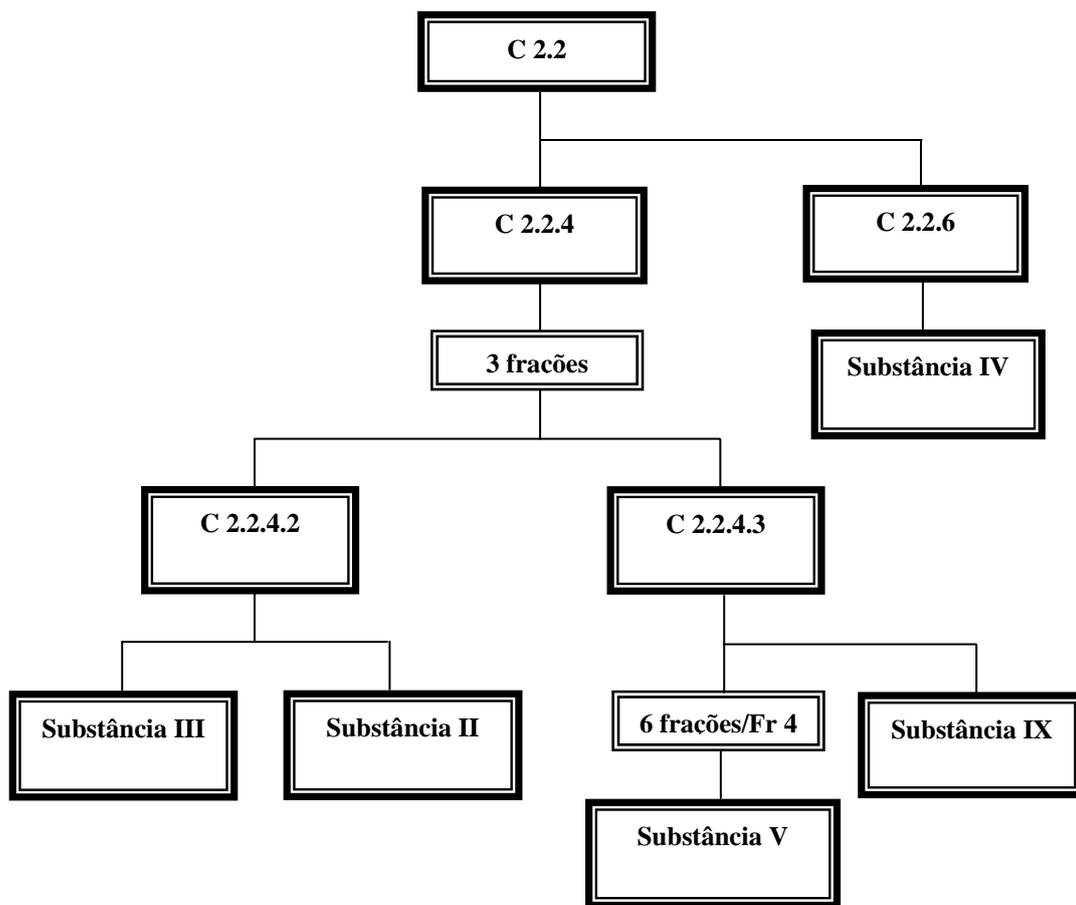
C 2.2.4.2

C

2.2.4.3

φ

ESQUEMA 1.4



ESQUEMA 1.4:

Citrus limonia

C. sinensis

FIGURA 1.3

Citrus

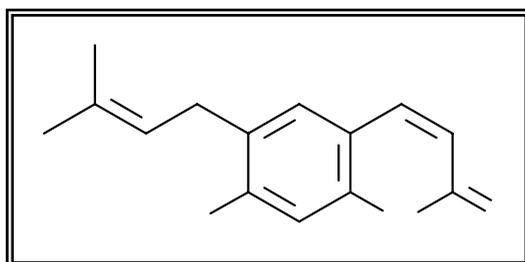


FIGURA 1.3

FIGURA 1.7

δ δ
 J

FIGURA 1.8

δ

δ

δ

FIGURA 1.9

δ

δ

δ

FIGURA 1.10

δ

δ

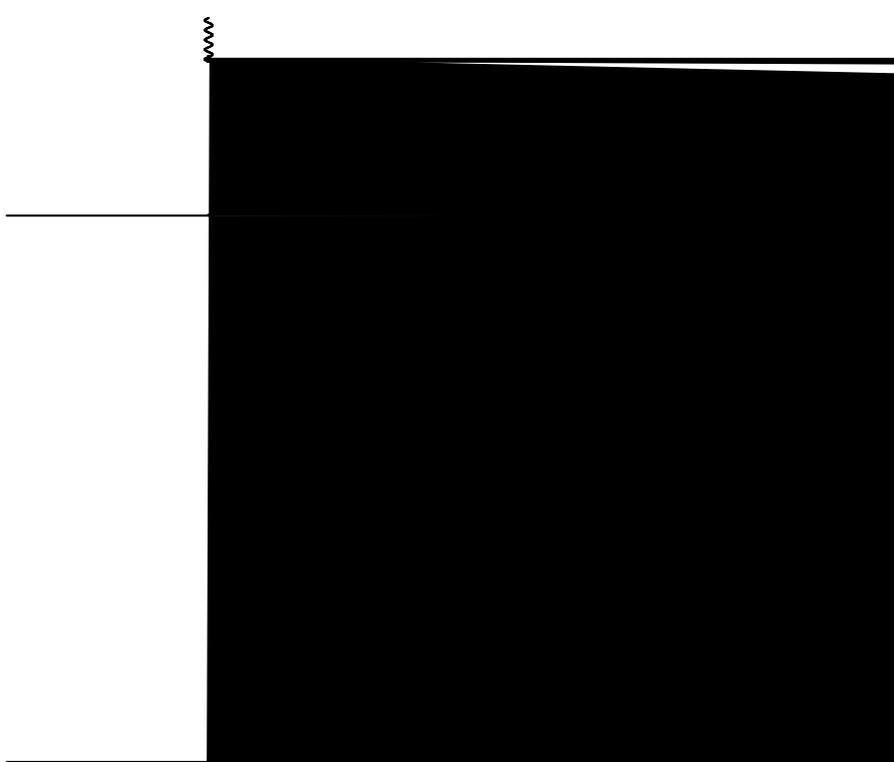
δ

δ

δ

FIGURA 1.4

TABELAS 1.1 1.2



δ

δ

δ

δ

δ

δ

FIGURA 1.5

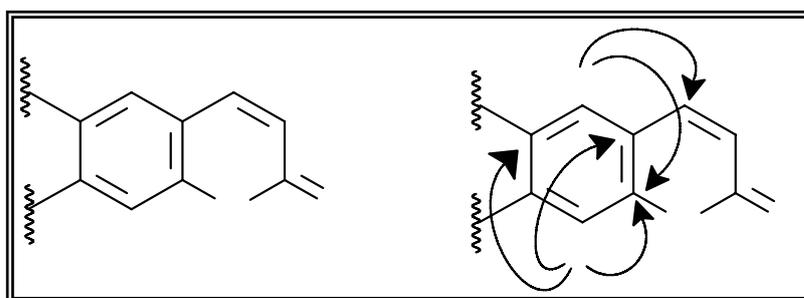
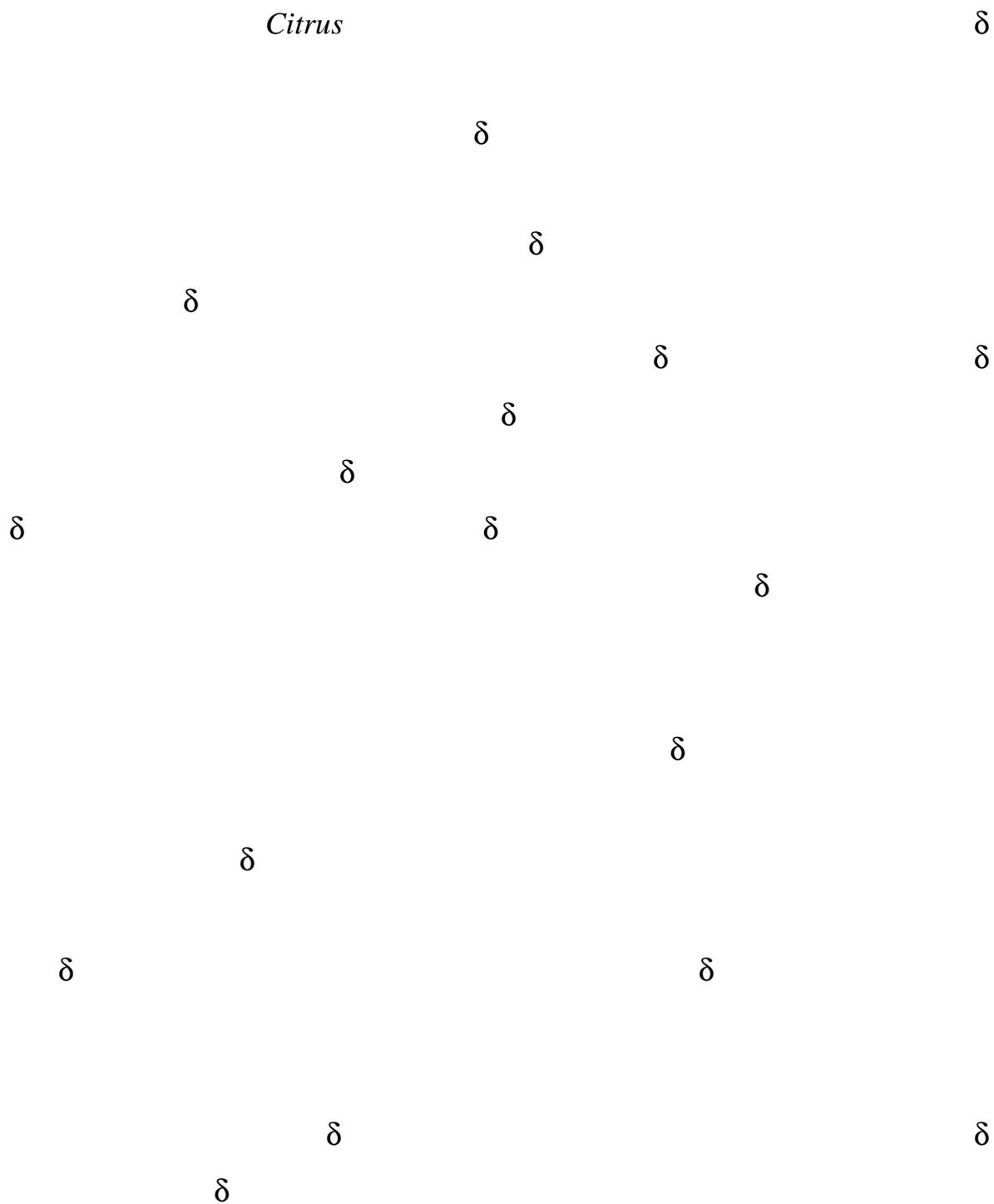


FIGURA 1.5

δ

δ

δ



FIGURA

1.6

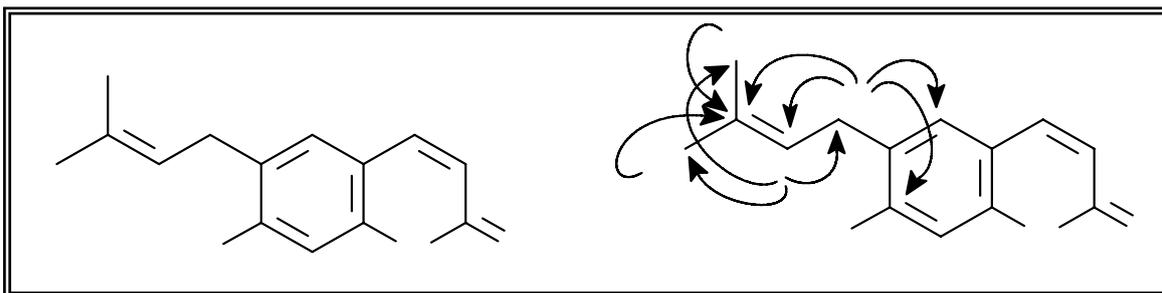


FIGURA 1.6

FIGURA 1.11

quasi molecular

íon

SUBEROSINA

TABELA 1.1

Hidrogênio	Suberosina isolada	Suberosina (literatura)
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>t</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 1.2

Carbono	Suberosina isolada
	δ

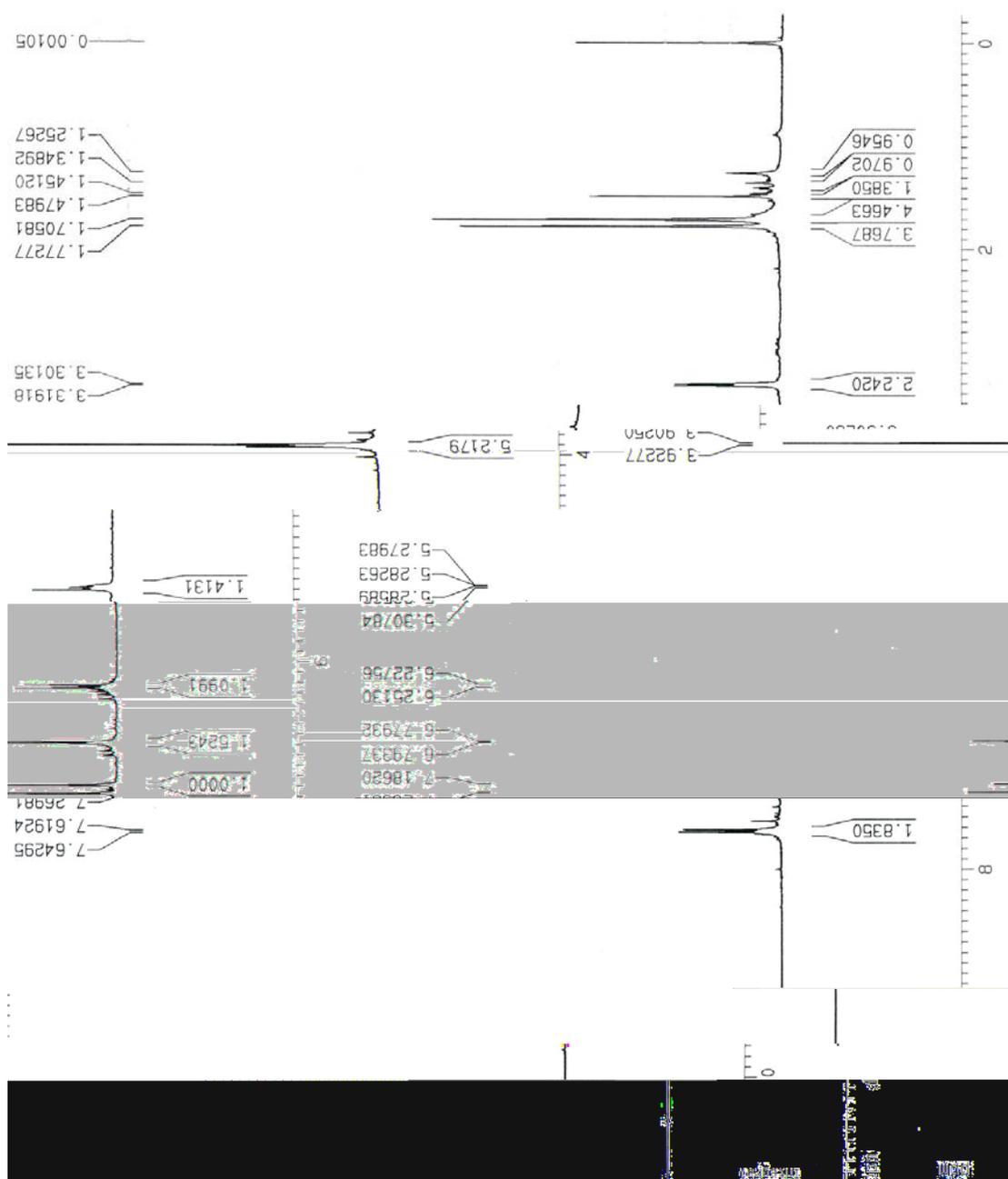


FIGURA 1.7:

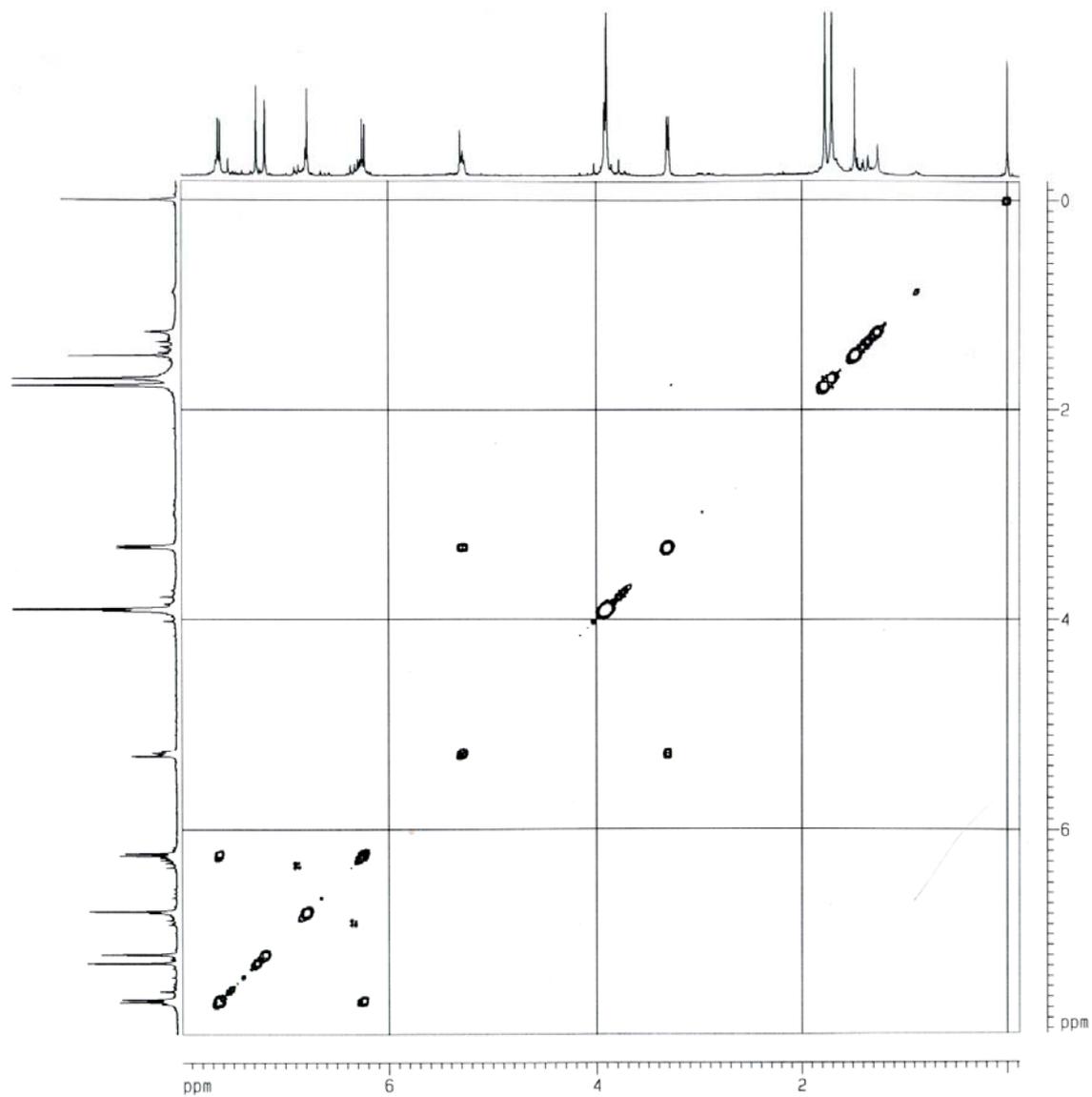


FIGURA 1.8:

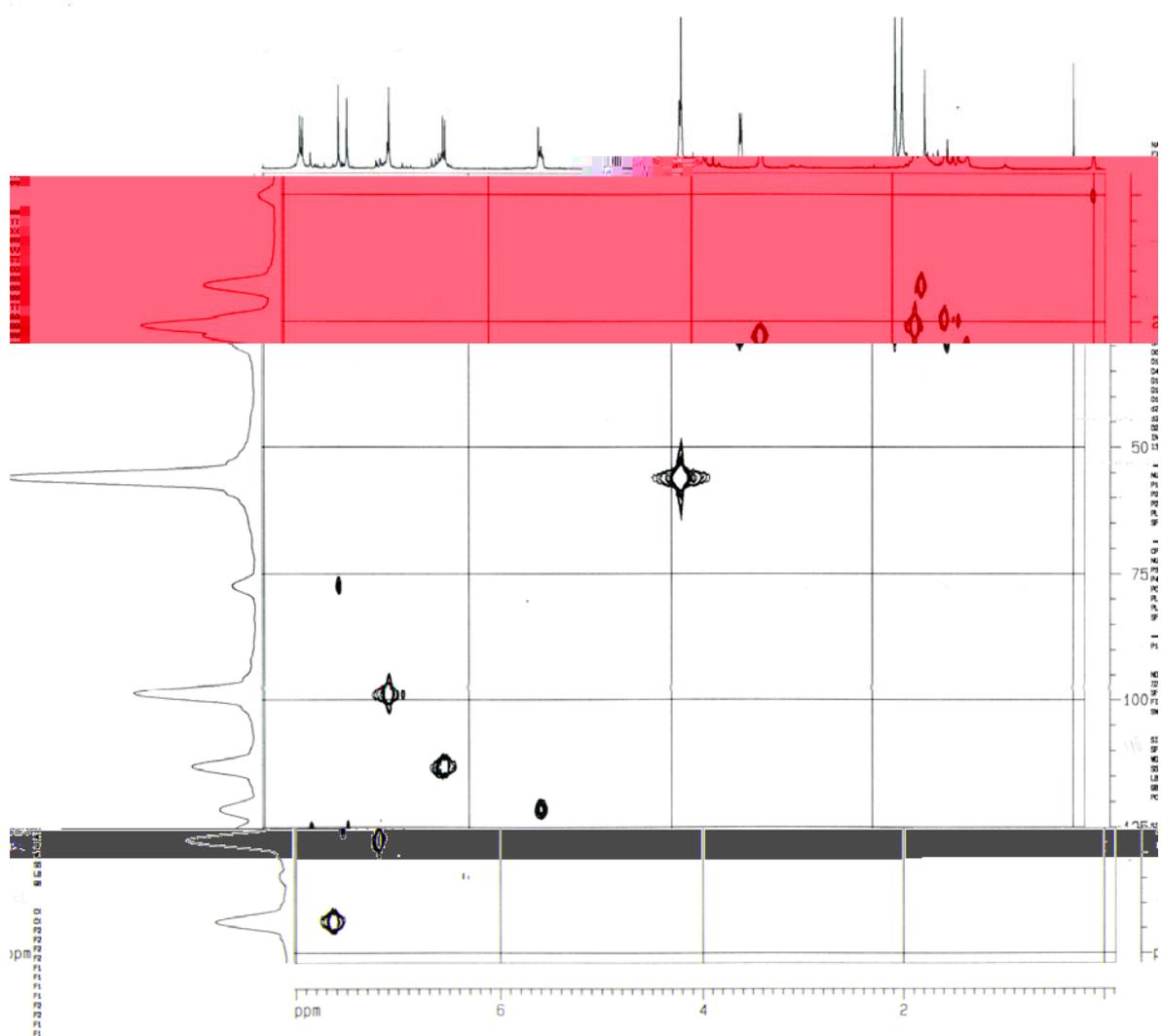


FIGURA 1.9:

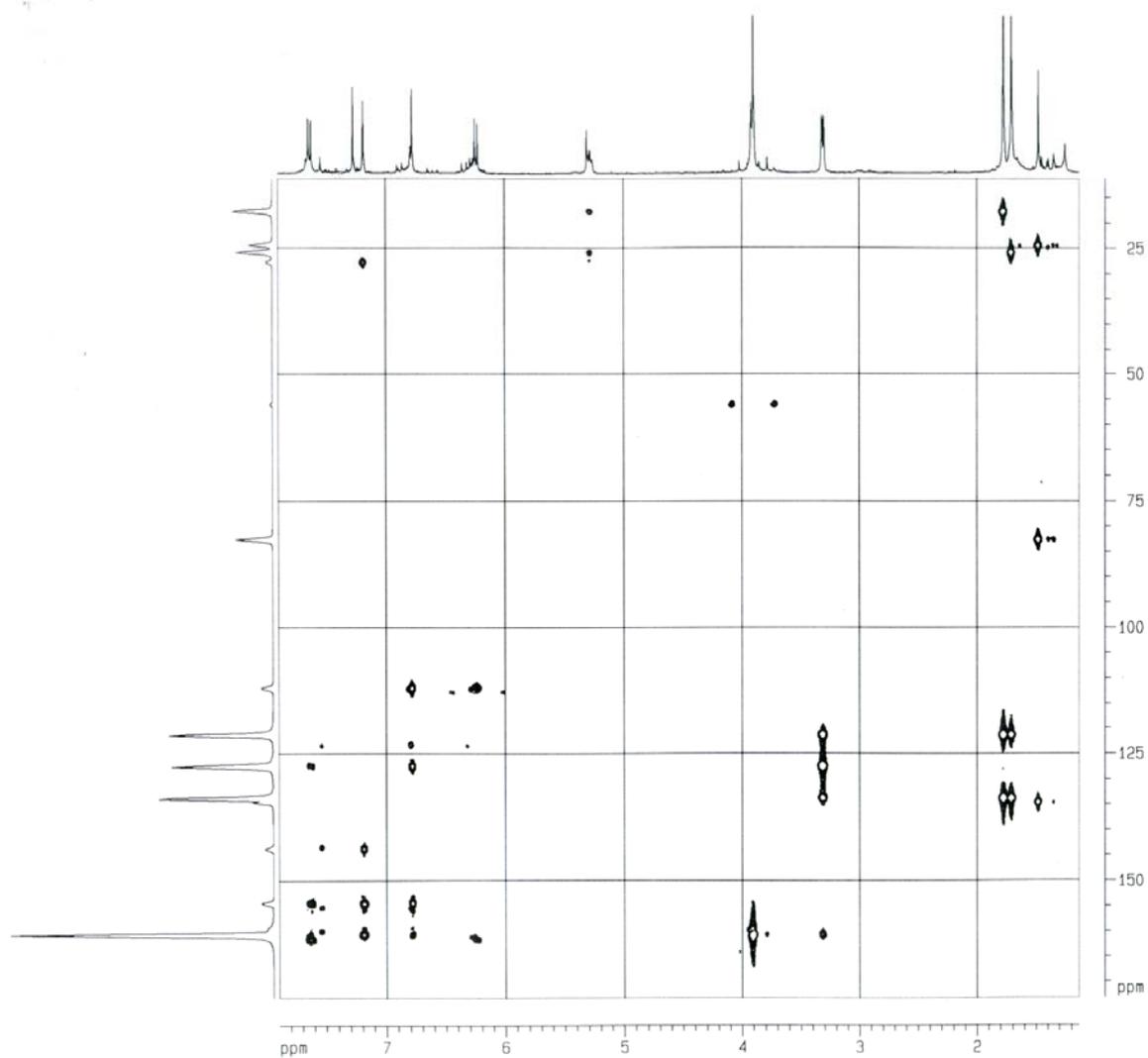


FIGURA 1.10:

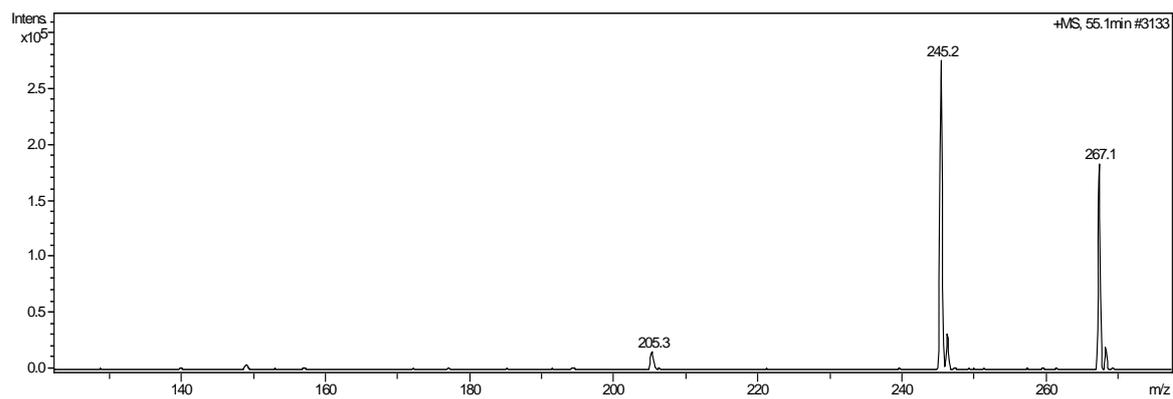


FIGURA 1.11

FIGURA 1.12

Citrus

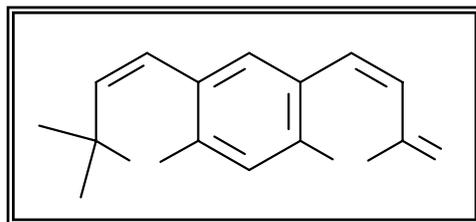


FIGURA 1.12

FIGURA 1.13

δ J

δ

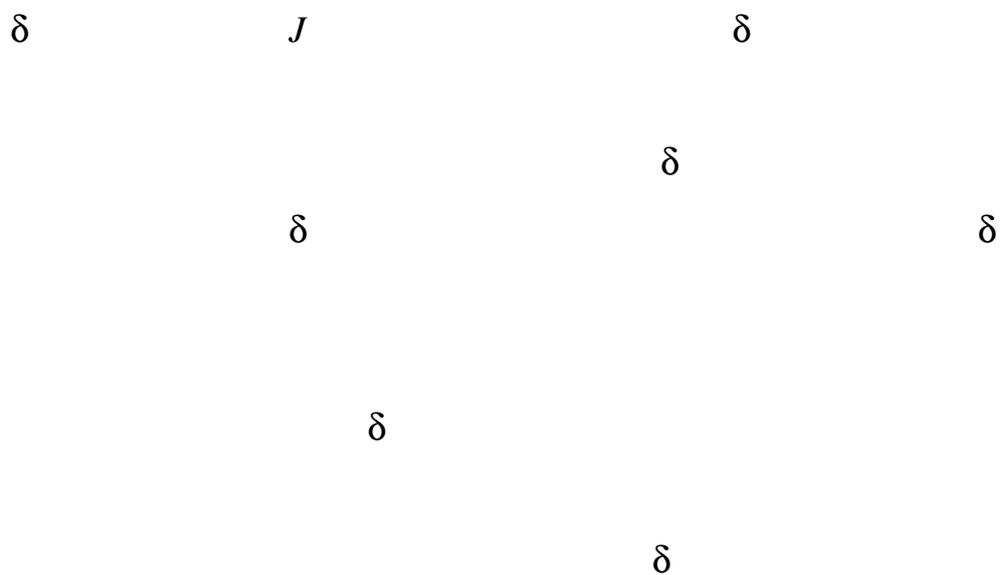


FIGURA 1.14

1.4

TABELAS 1.3

FIGURA 1.15

íon quasi molecular

XANTILETINA

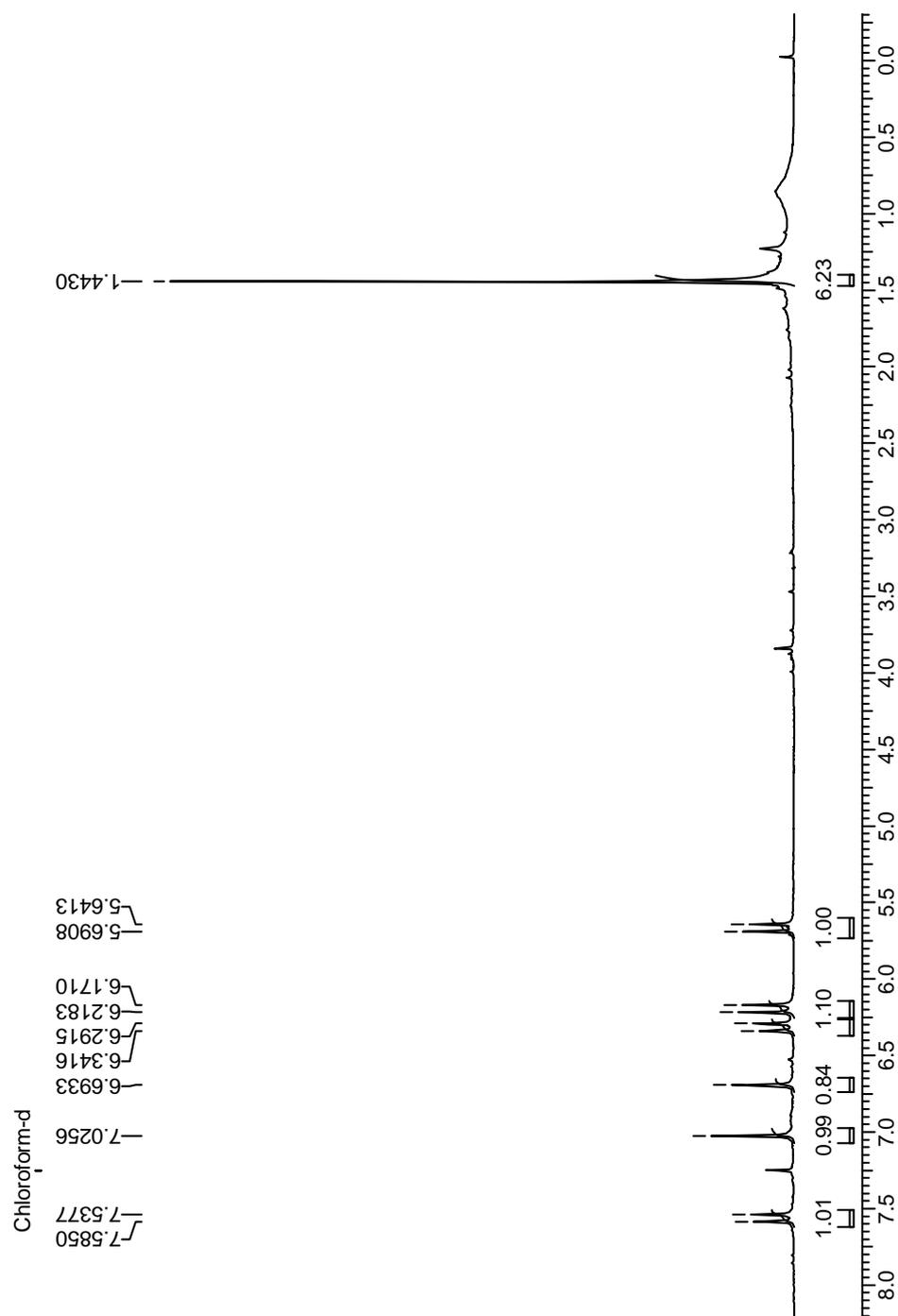


FIGURA 1.13:

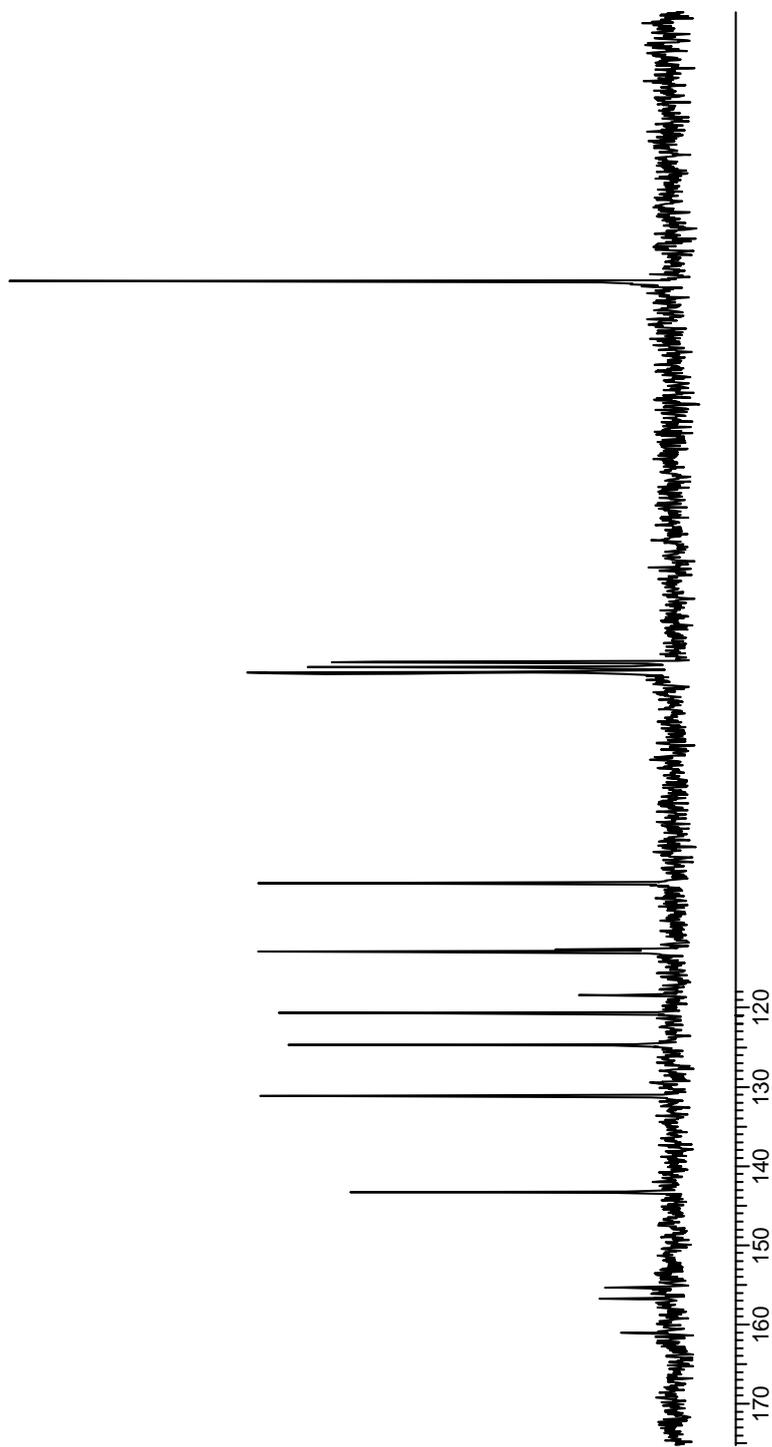


FIGURA 1.14:

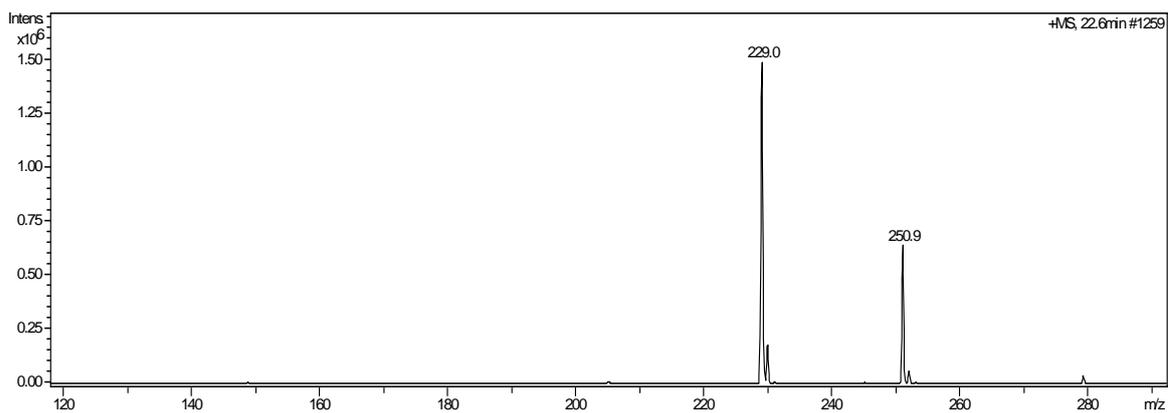


FIGURA 1.15

FIGURA 1.16

Citrus

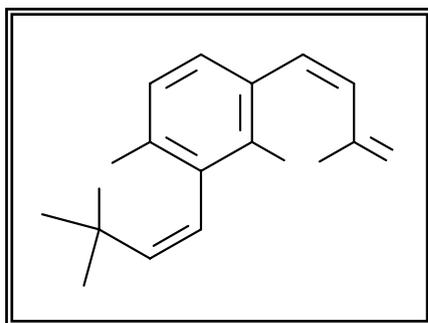


FIGURA 1.16

FIGURA 1.17

δ

δ

FIGURA 1.18
1.6

TABELAS 1.5

δ

δ

J

orto

orto

δ

δ

FIGURA 1.19

SESELINA

TABELA 1.5

Hidrogênio	Seselina isolada	Seselina (literatura)
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
δ	<i>J</i>	

TABELA 1.6

Carbono	Seselina isolada
δ	

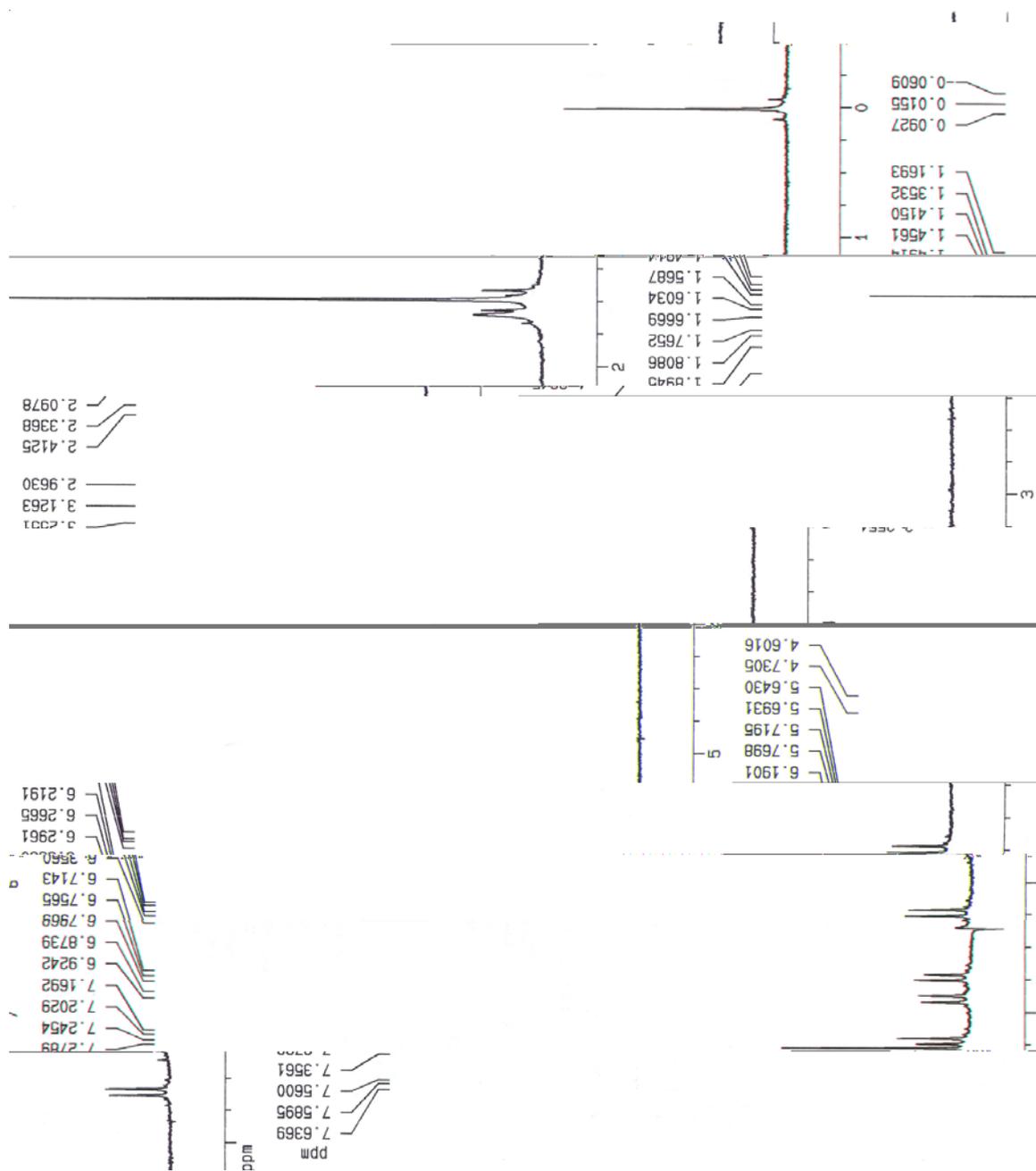


FIGURA 1.17:

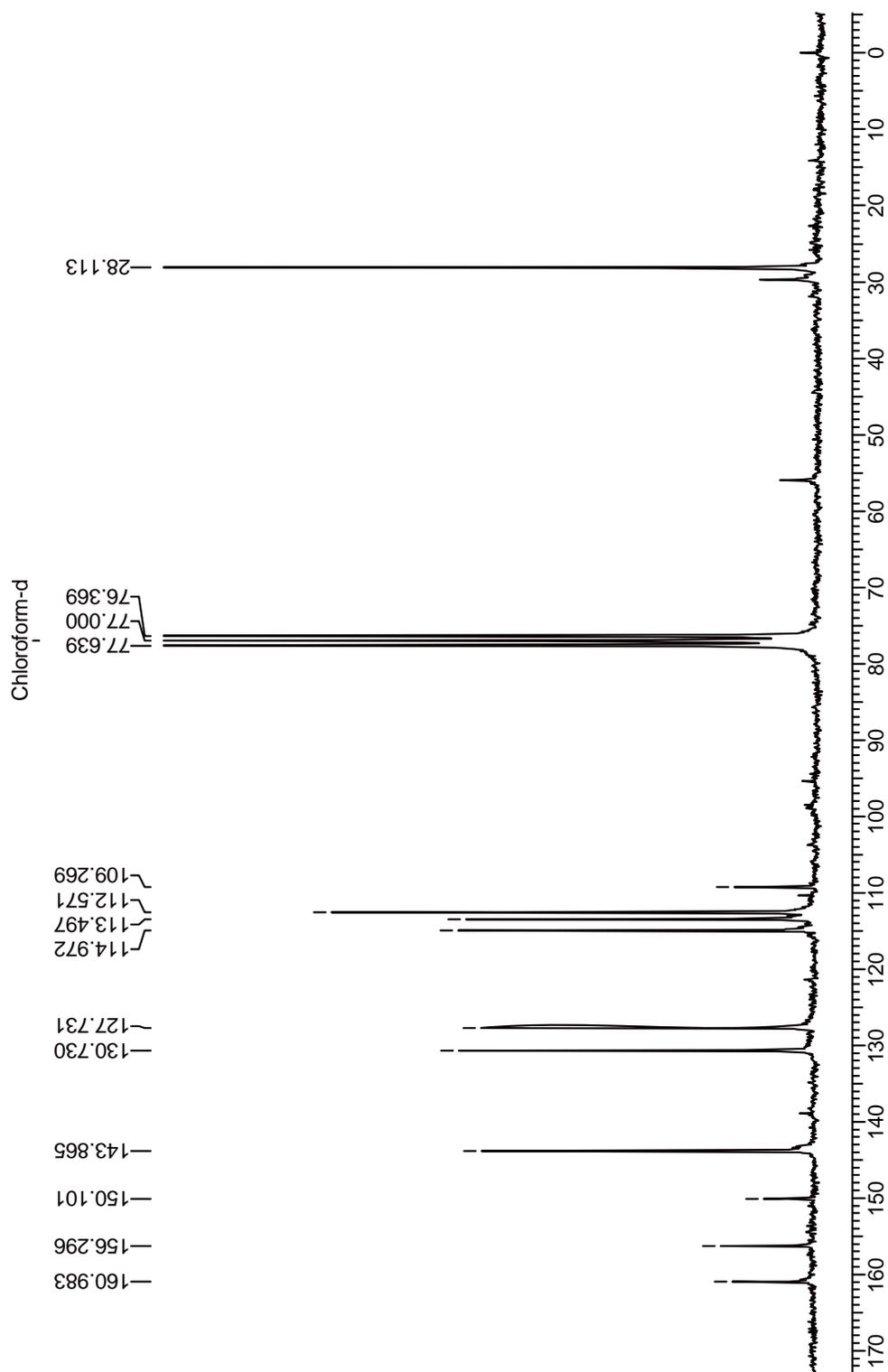


FIGURA 1.18:

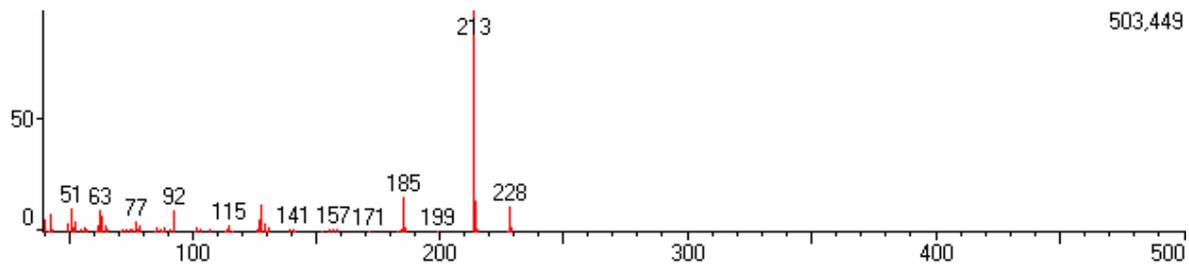


FIGURA 1.19

FIGURA 1.20

Citrus

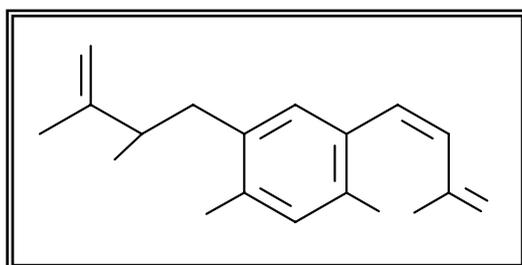


FIGURA 1.20

FIGURA 1.22

δ

δ

δ

δ

δ

δ

δ

FIGURA 1.23

δ

FIGURA 1.24

δ

δ

δ

δ

δ

δ

δ

J

δ

J

δ

δ

δ

δ

δ

δ

δ

FIGURA 1.21

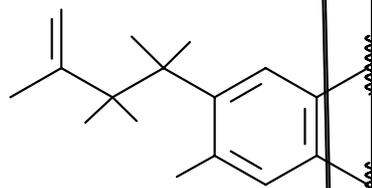


FIGURA 1.21

TABELAS 1.7 1.8

FIGURA 1.25

TAMARINA



FIGURA 1.22:

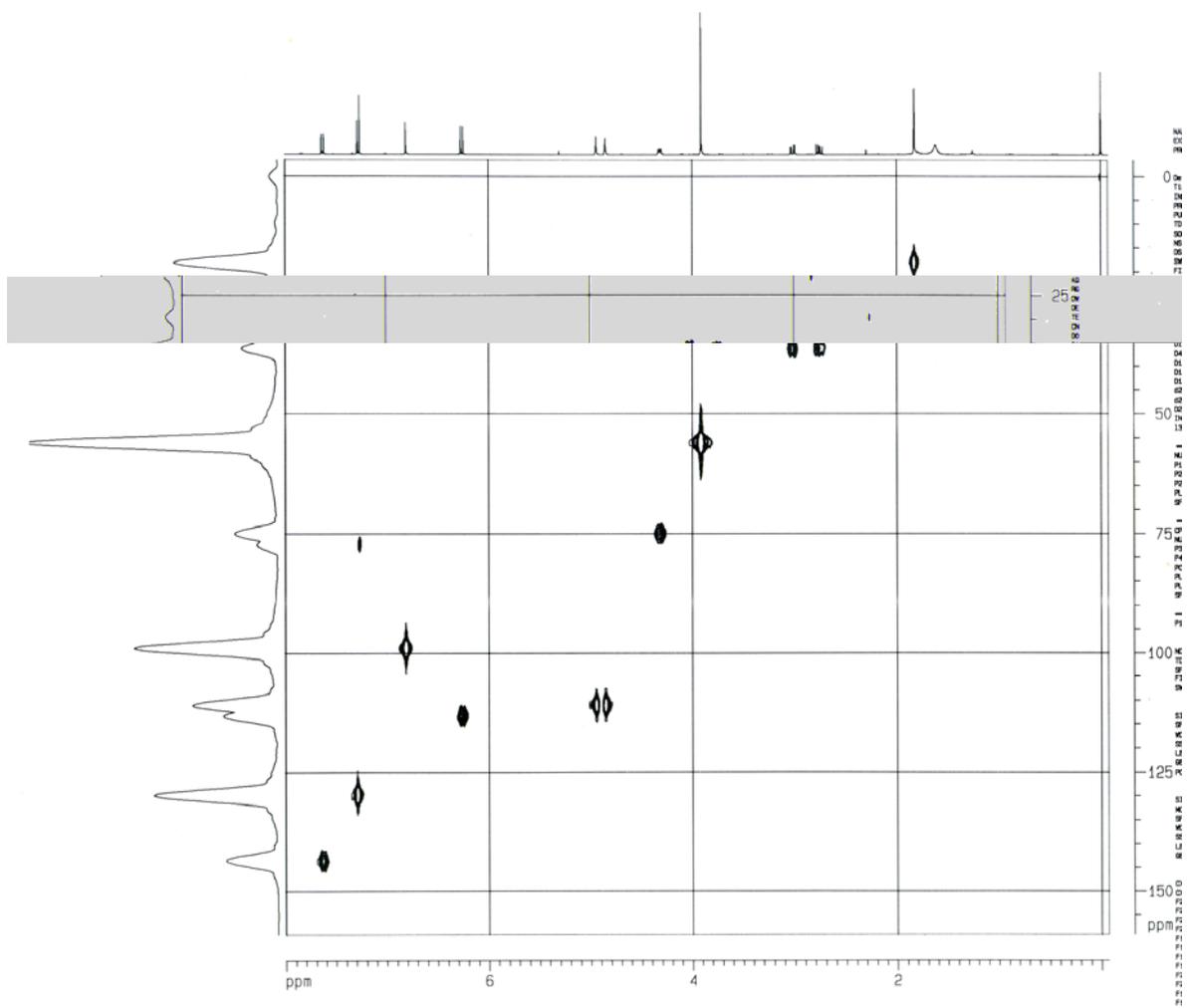


FIGURA 1.23:

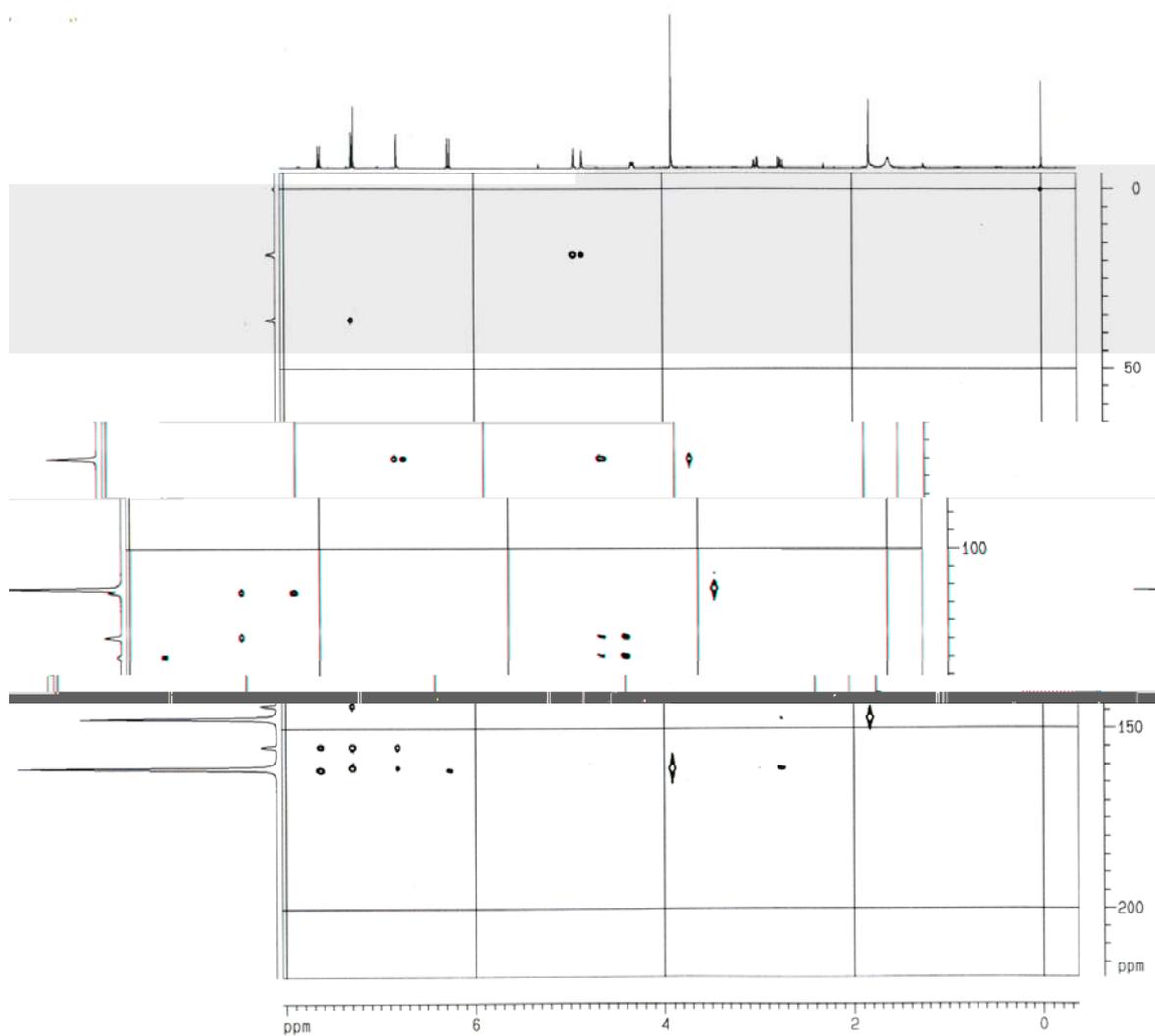


FIGURA 1.24:

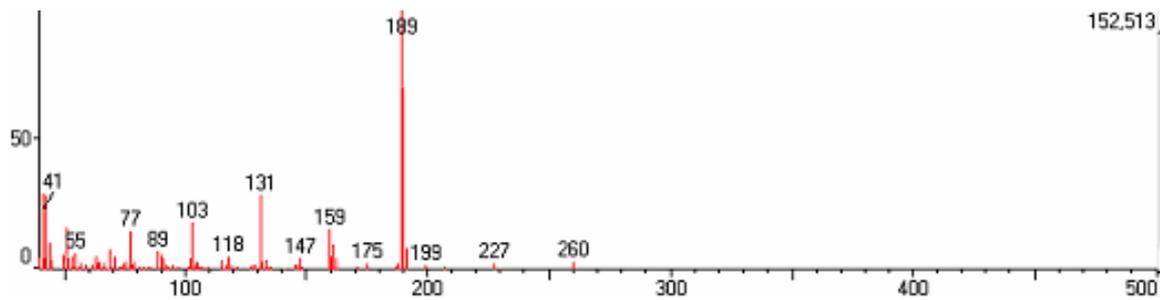


FIGURA 1.25

FIGURA 1.26

Citrus

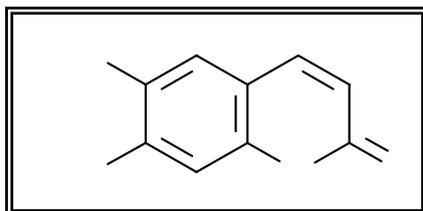


FIGURA 1.26

FIGURA 1.27

δ

δ

δ

δ

CRENULATINA

TABELA 1.9

TABELA 1.9

Hidrogênio	Crenulatina isolada	Crenulatina (literatura)
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

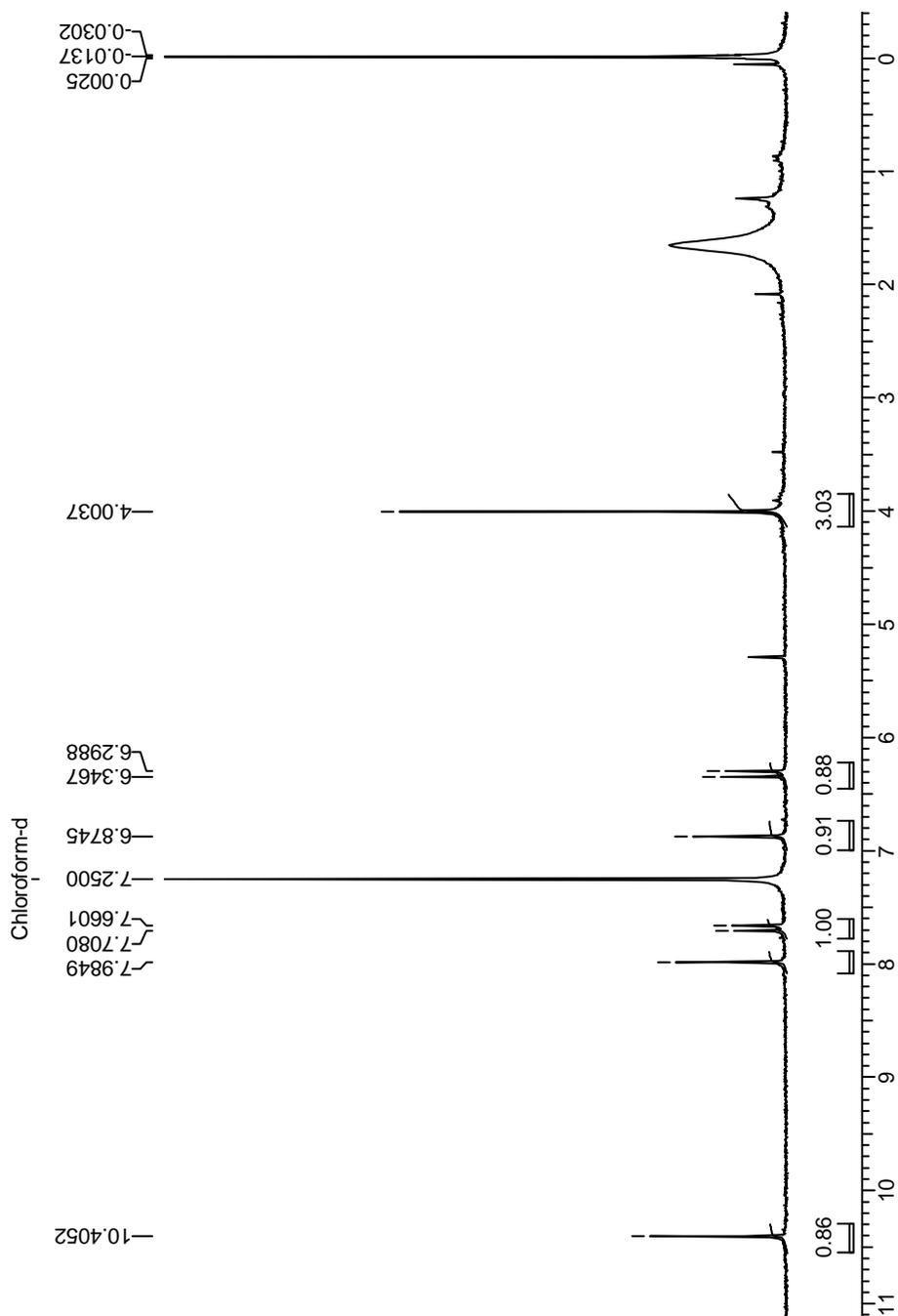


FIGURA 1.27:

FIGURA 1.28

Citrus

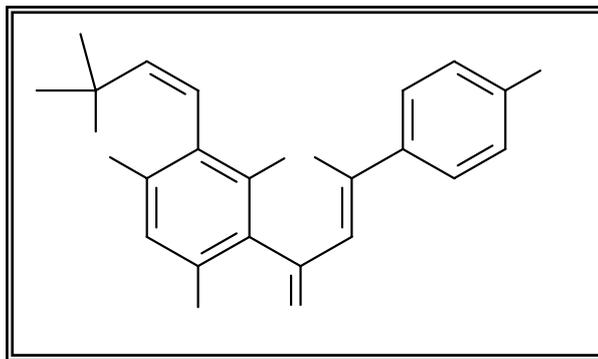


FIGURA 1.28

FIGURA 1.30

δ

δ

orto

δ

1.31

δ

FIGURA

δ

δ

δ

δ

FIGURA

1.32

δ

δ

δ

J

δ

δ

Citrus

δ

δ

δ

FIGURA 1.33

δ

δ

FIGURA 1.29

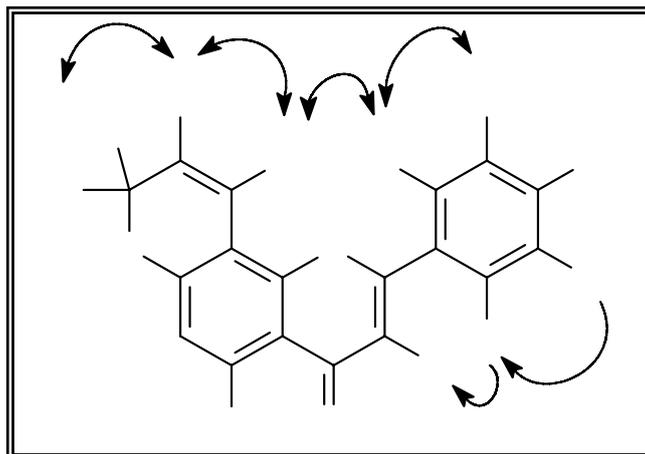


FIGURA 1.29

δ

δ

TABELAS 1.10 1.11

FIGURA 1.34

íon quase molecular

LIMONIANINA

TABELA 1.10

Hidrogênio	Limonianina isolada	Limonianina (literatura)
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	
	δ	<i>J</i>

TABELA 1.11

Carbono	Limonianina isolada
δ	

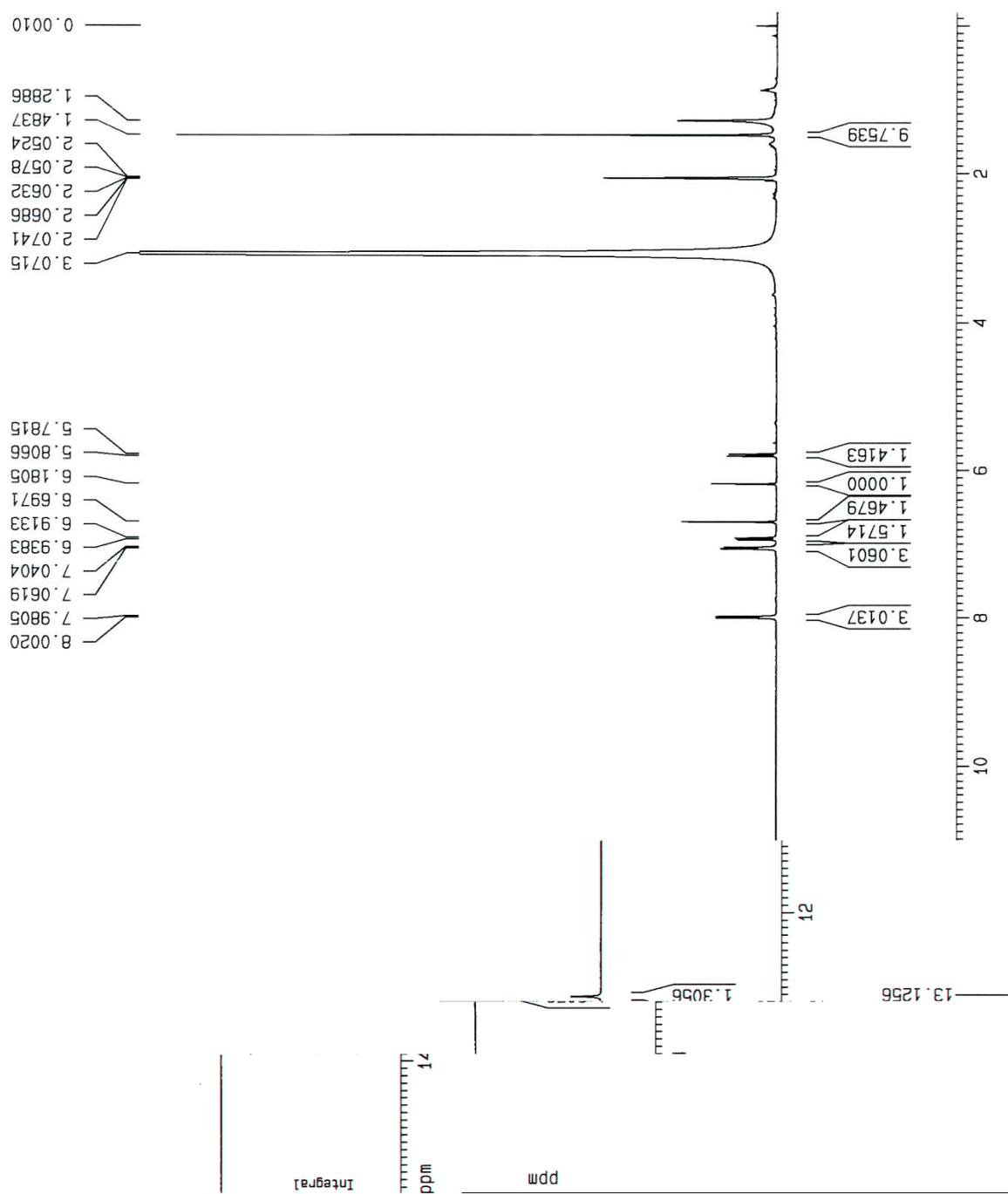


FIGURA 1.30:

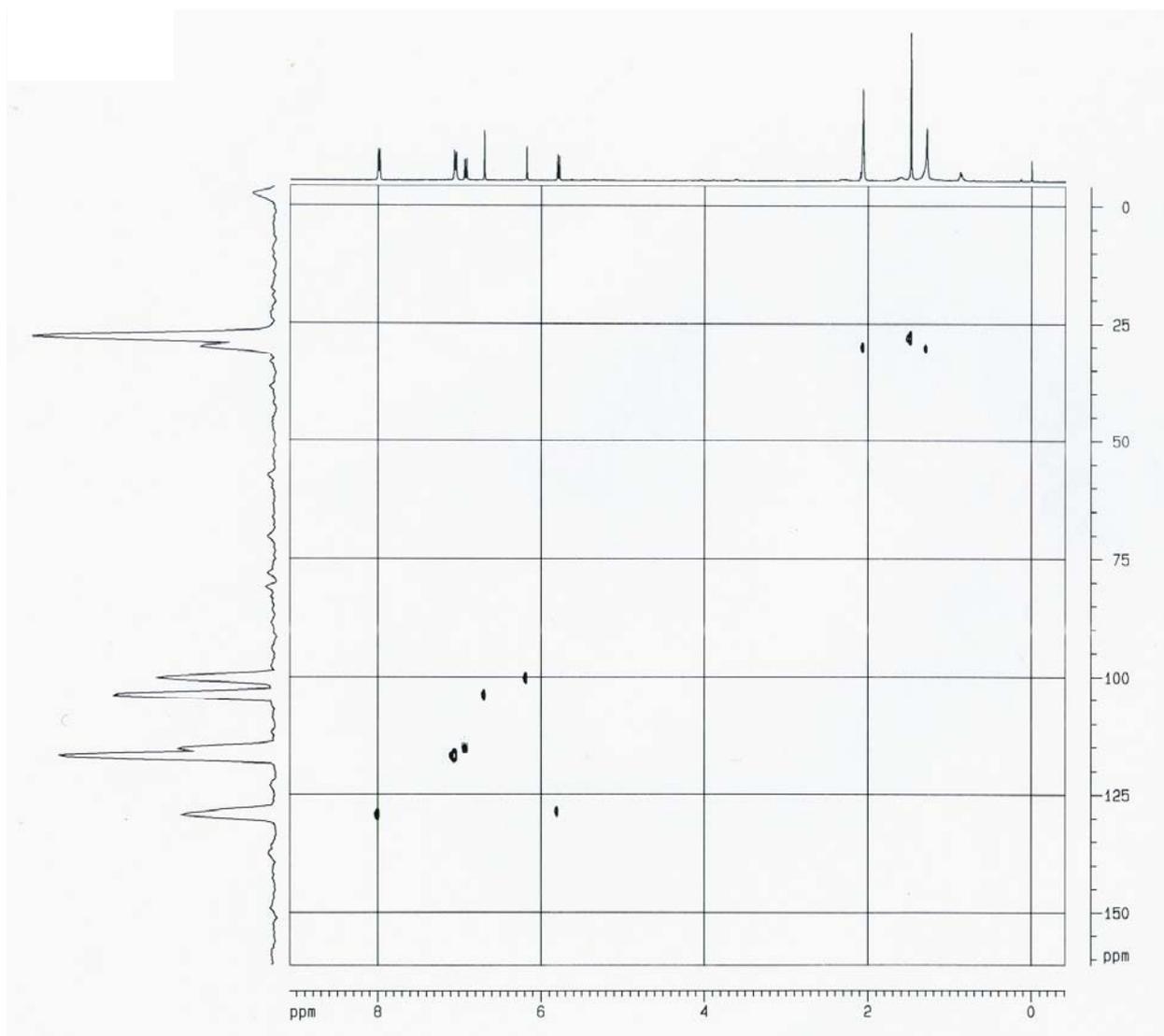


FIGURA 1.31:

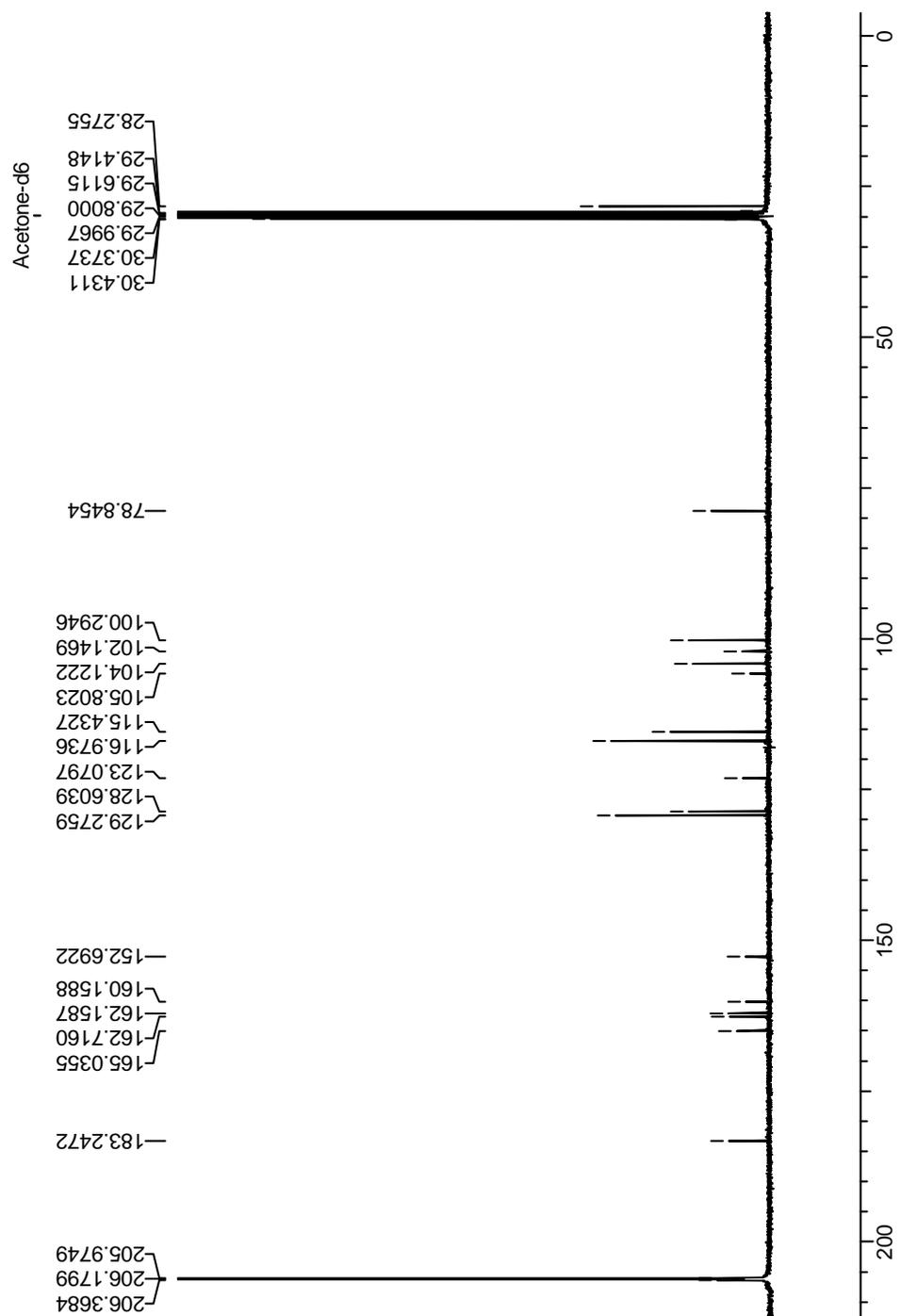


FIGURA 1.32:

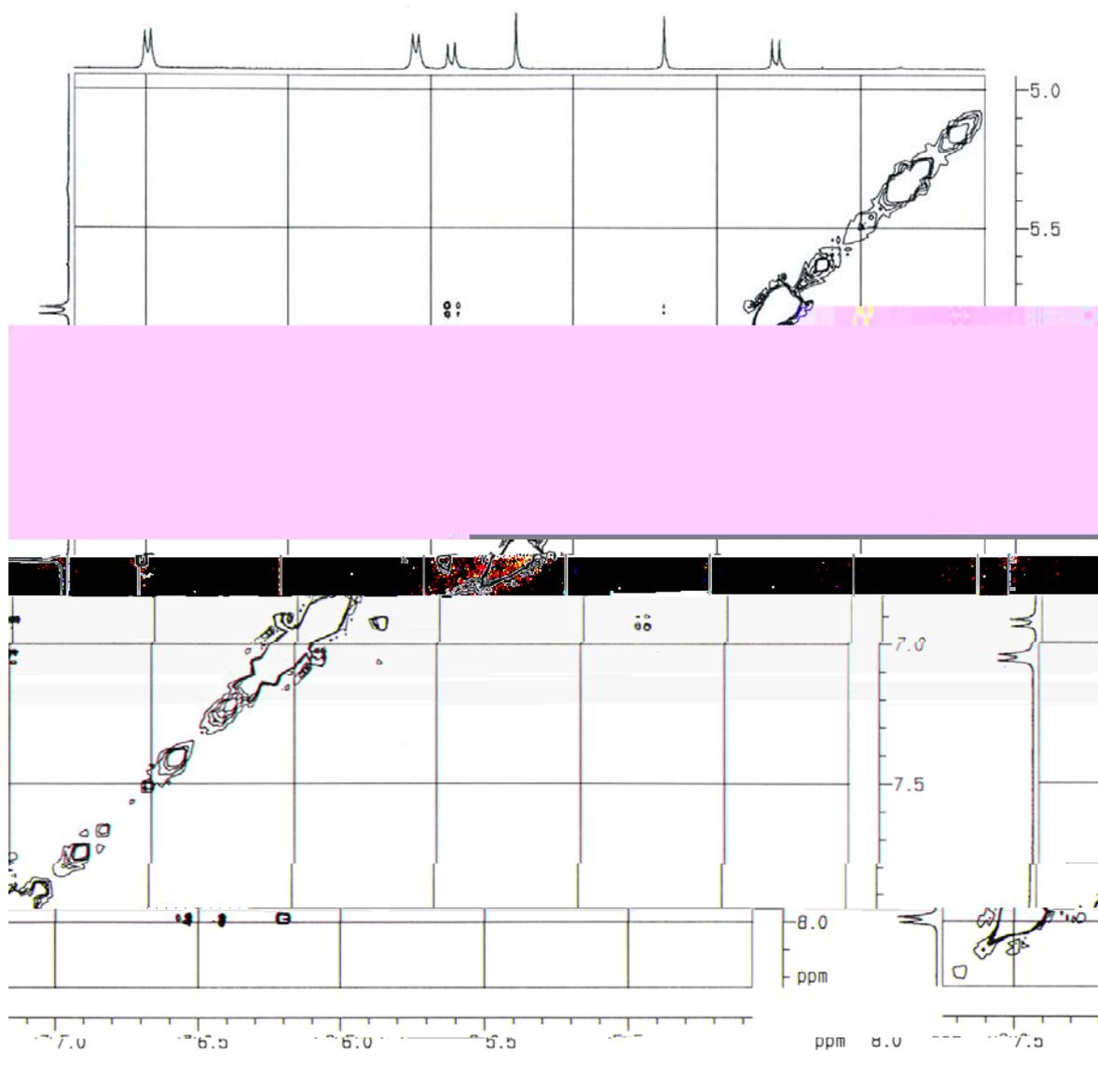


FIGURA 1.33:

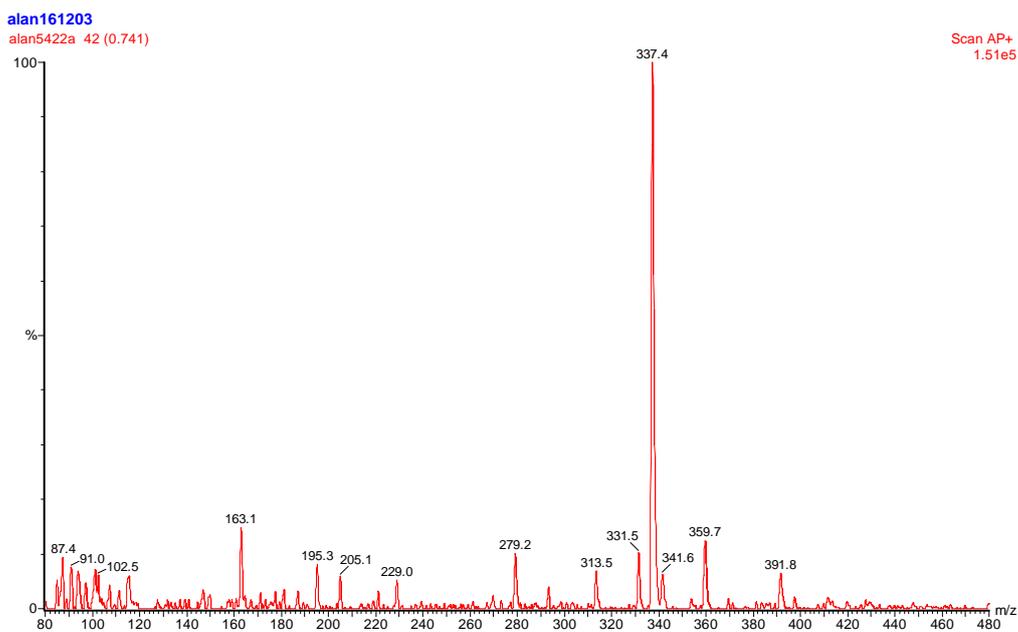


FIGURA 1.34

FIGURA 1.35

Citrus

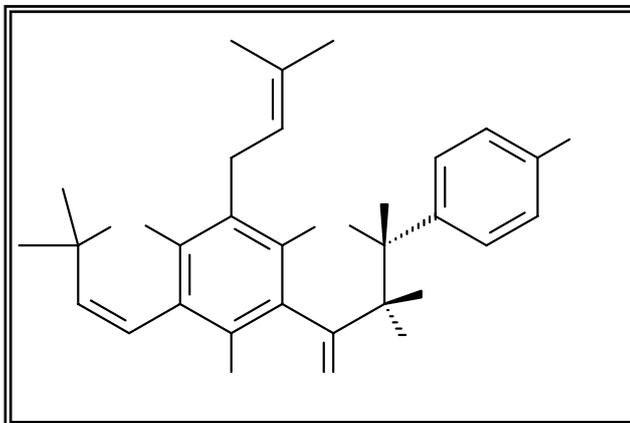
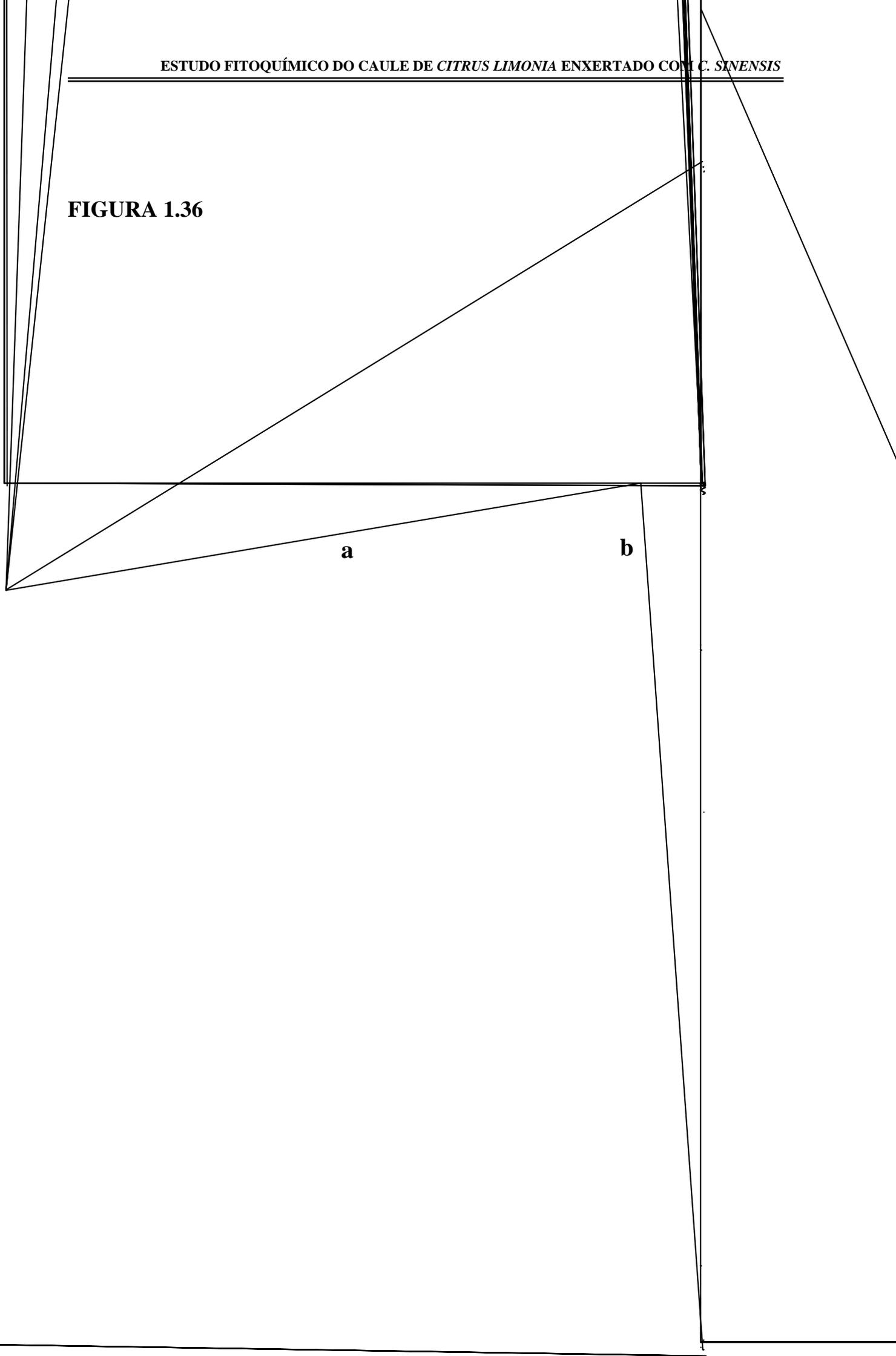


FIGURA 1.35

FIGURA 1.36



TABELAS 1.12 1.13

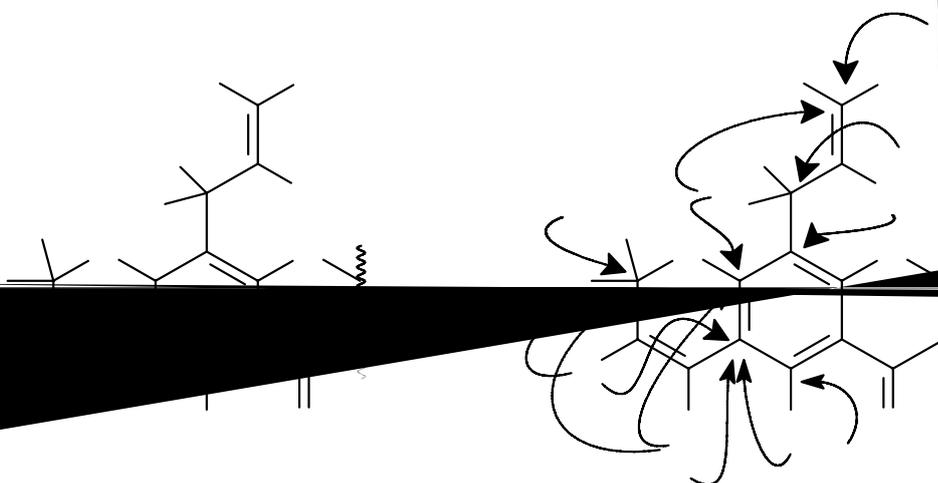


TABELA 1.12

Hidrogênio	Lupinifolina isolada	Lupinifolina (literatura)
	<i>dd</i>	<i>dd</i>
	<i>dd</i>	<i>dd</i>
	<i>dd</i>	<i>dd</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>t</i>	<i>t</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 1.13

Carbono	Lupinifolina isolada
----------------	-----------------------------

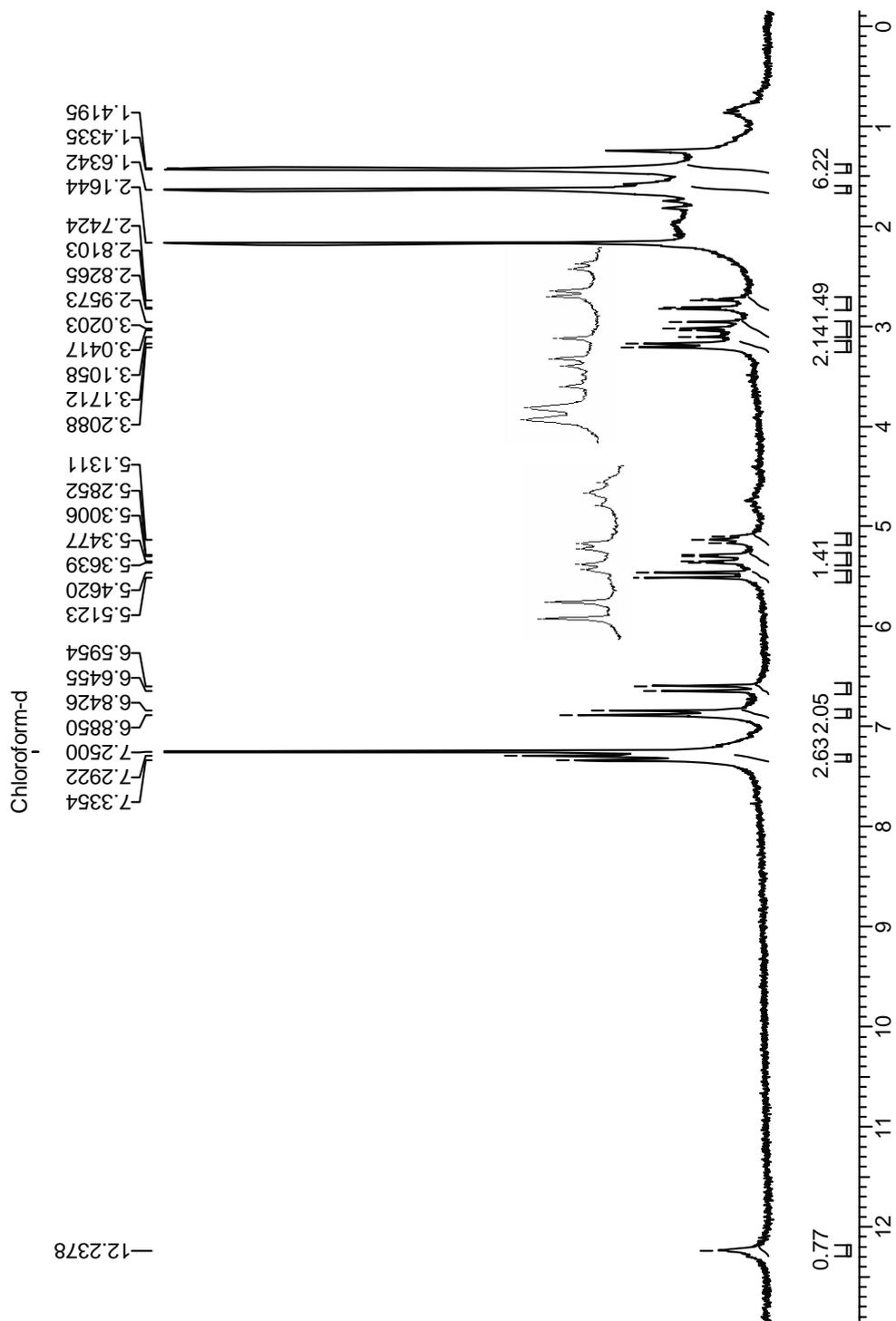


FIGURA 1.38:

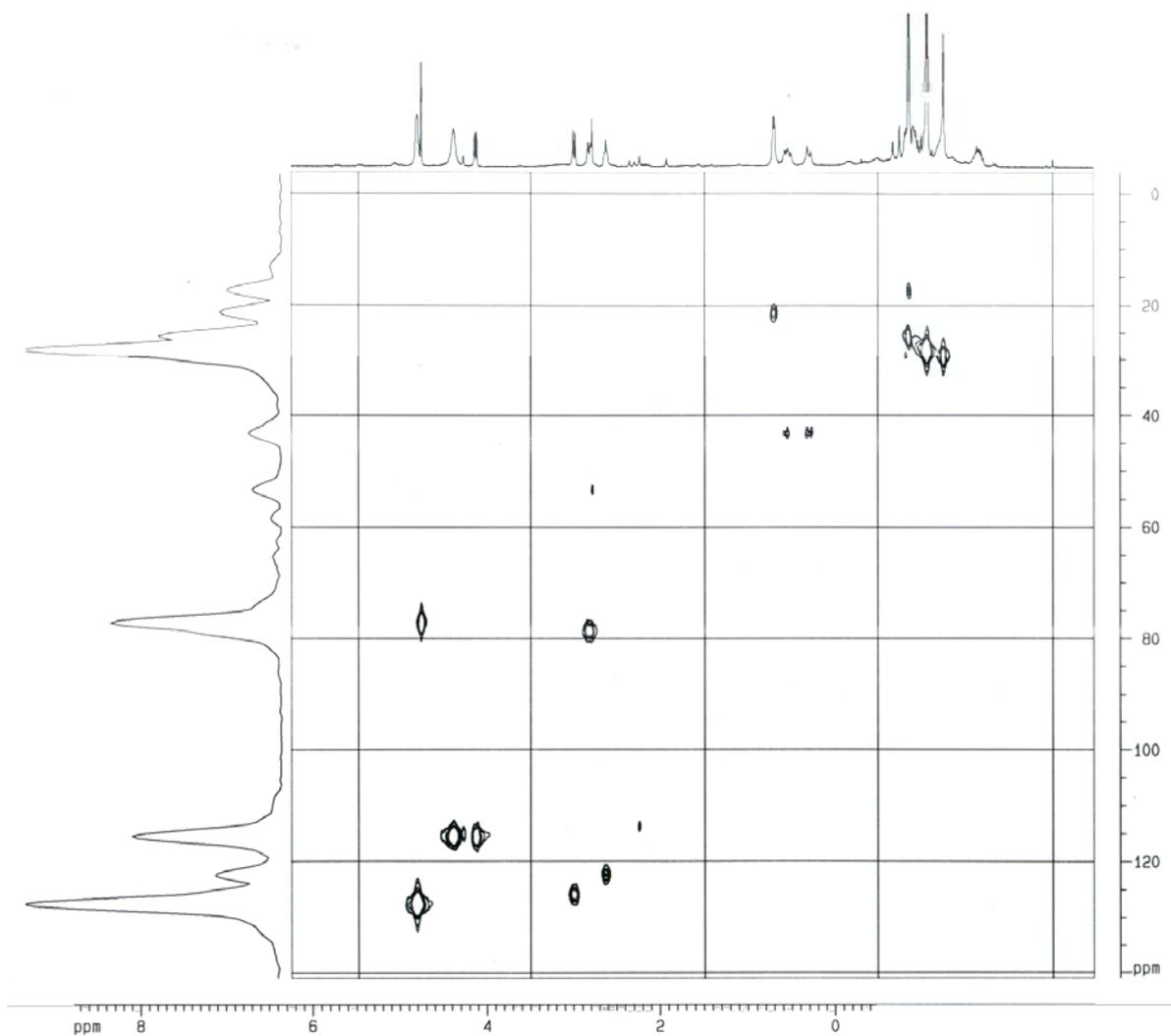


FIGURA 1.39:



FIGURA 1.40:

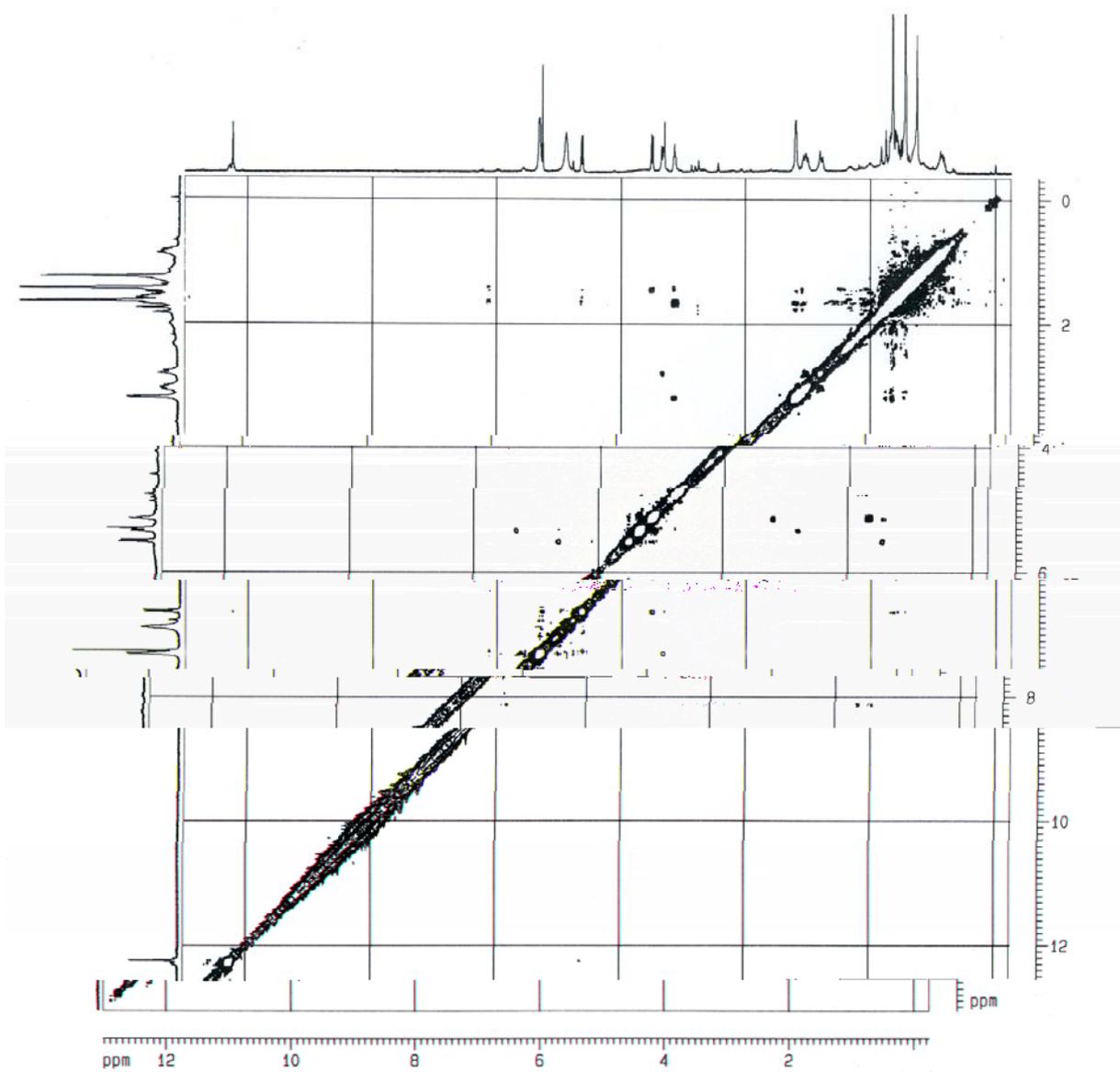


FIGURA 1.41:

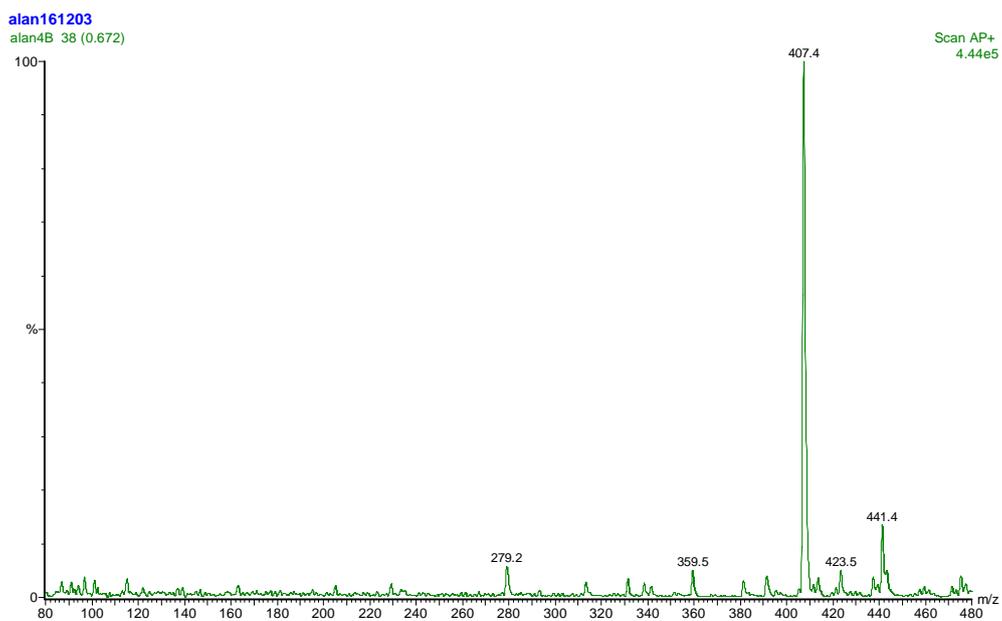


FIGURA 1.42

FIGURA 1.43

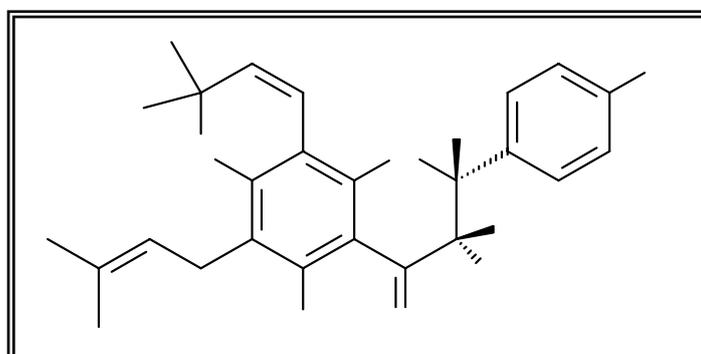


FIGURA 1.43

FIGURA 1.46



FIGURA 1.43

FIGURA 1.47

FIGURA 1.44

FIGURA 1.48

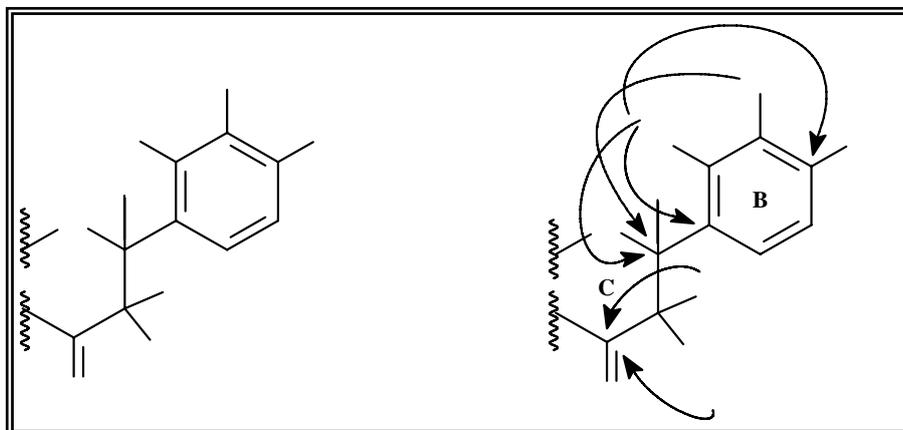


FIGURA 1.44

TABELAS 1.14 1.15

					δ
		δ			
δ				J	
	δ			δ	
		δ			δ
				δ	δ
			δ		
					δ
				δ	δ
					δ

δ δ δ
 δ

FIGURA 1.49

δ δ δ

FIGURA 1.45

δ δ
 δ

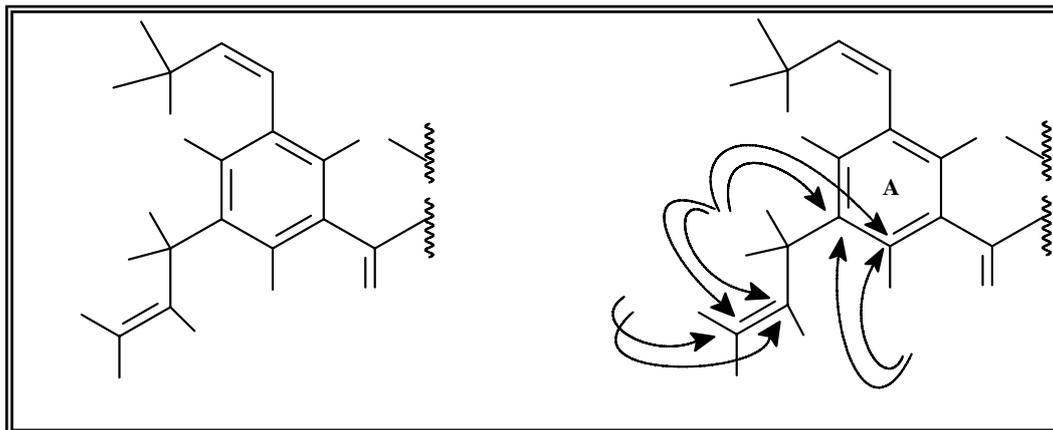


FIGURA 1.45

FIGURA 1.50

íon quase molecular

5,4'-dihidroxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona

TABELA 1.14

Hidrogênio	Substância X isolada
	<i>dd</i>
	<i>dd</i>
	<i>dd</i>
	<i>d</i>
	<i>d</i>
	<i>d</i>
	<i>d</i>
	<i>s</i>
	<i>d</i>
	<i>t</i>
	<i>s</i>
	<i>s</i>
δ	<i>J</i>

TABELA 1.15

Carbono	Substância X isolada
----------------	-----------------------------

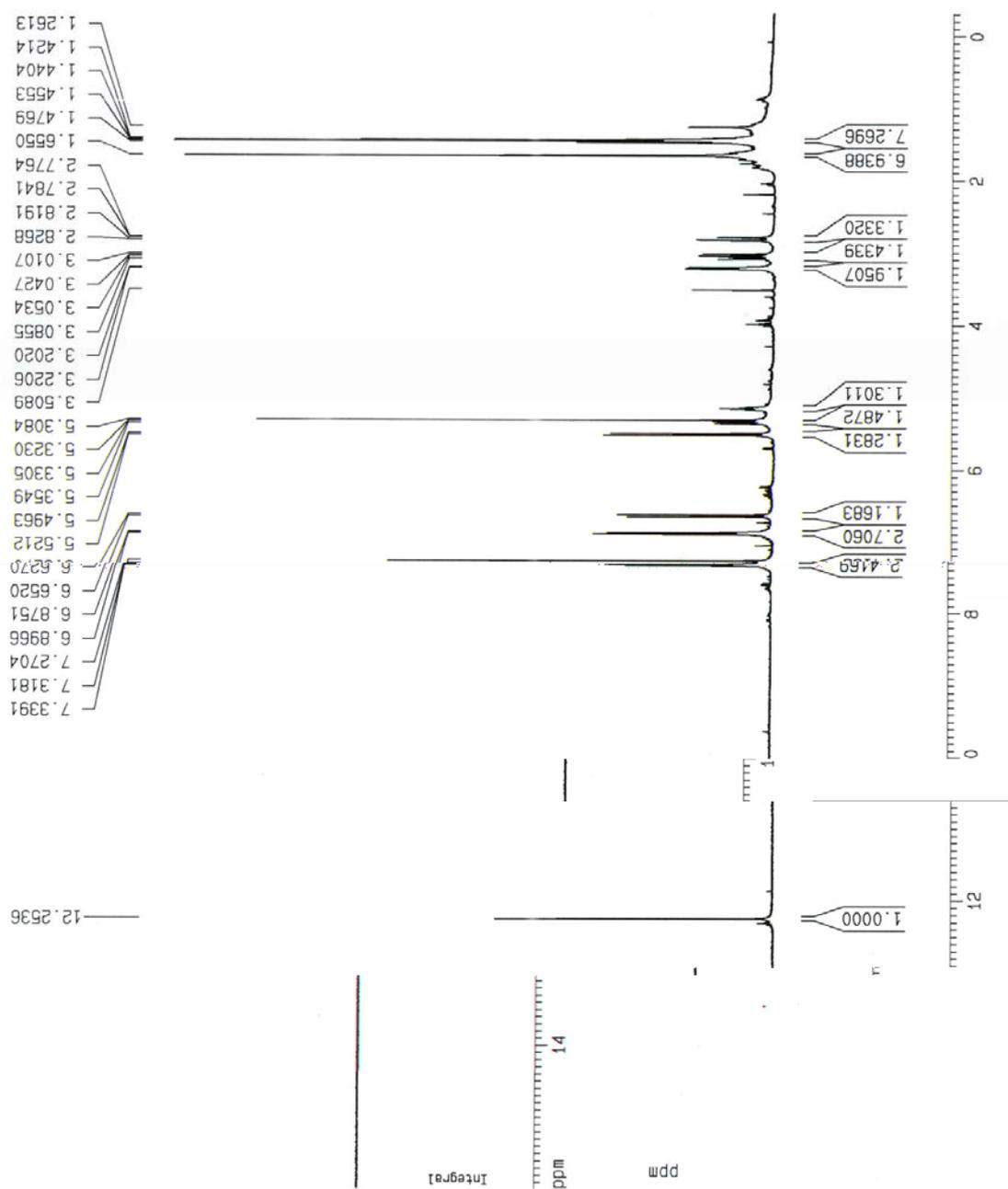


FIGURA 1.46:

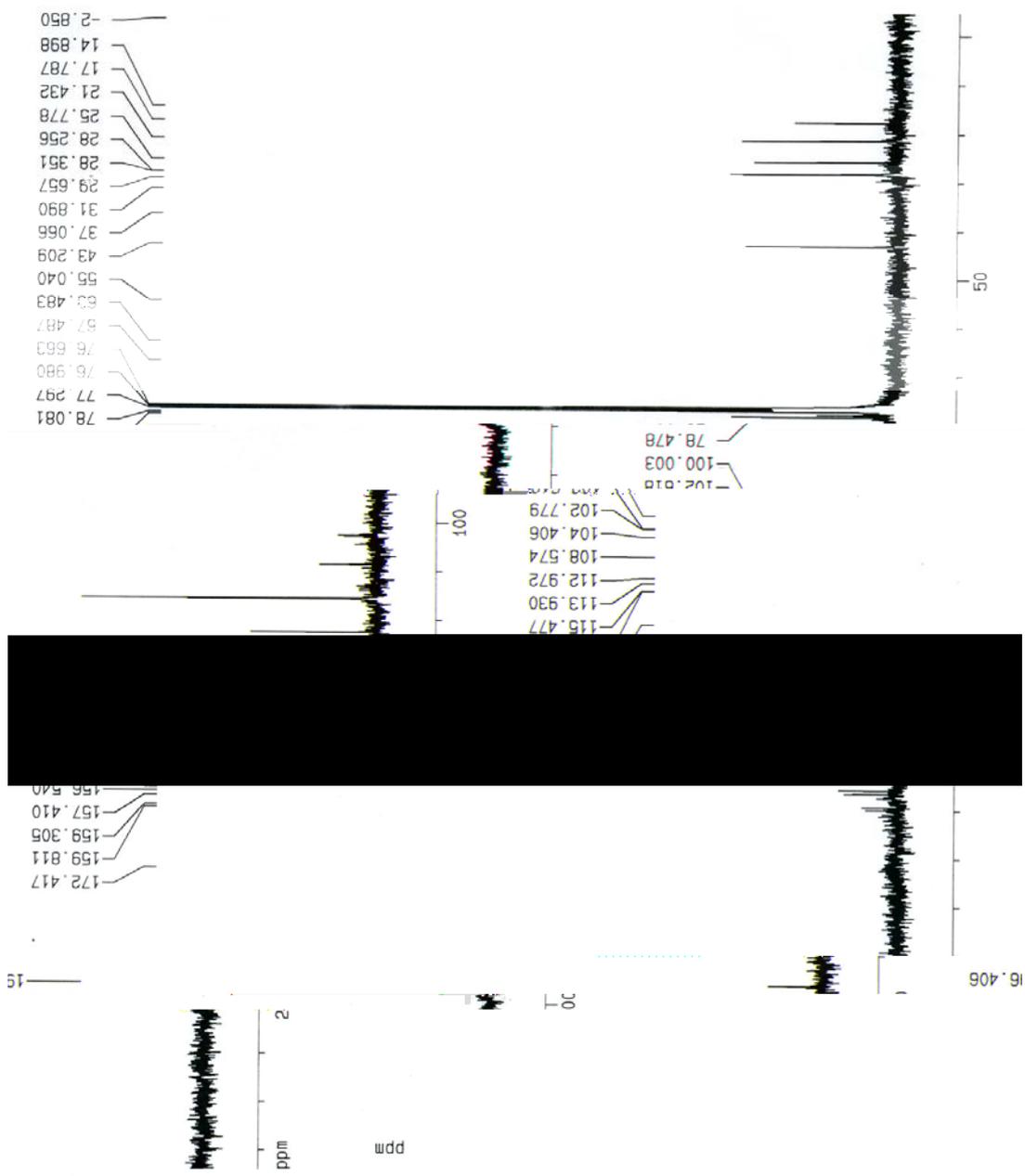


FIGURA 1.47:

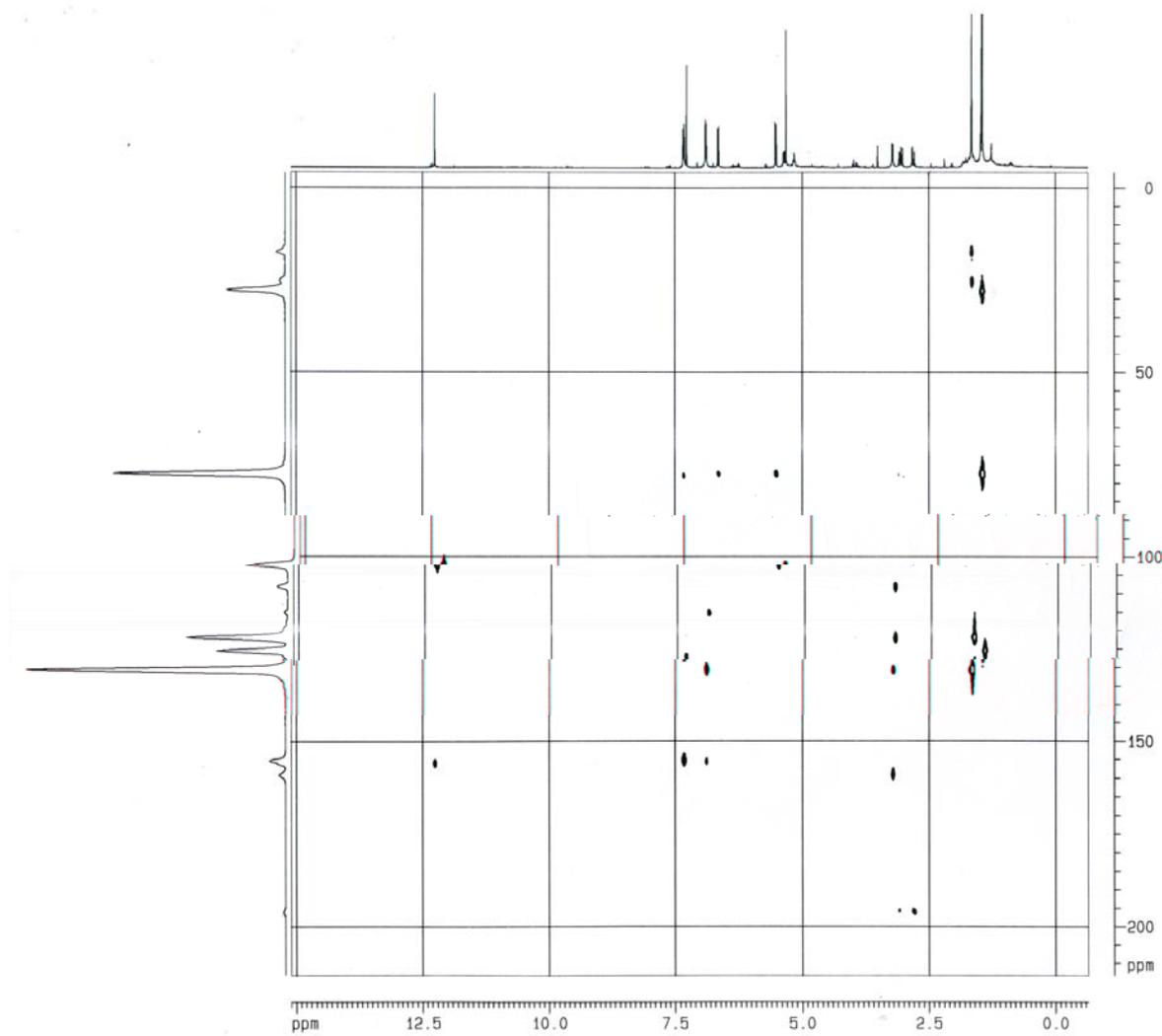


FIGURA 1.48:

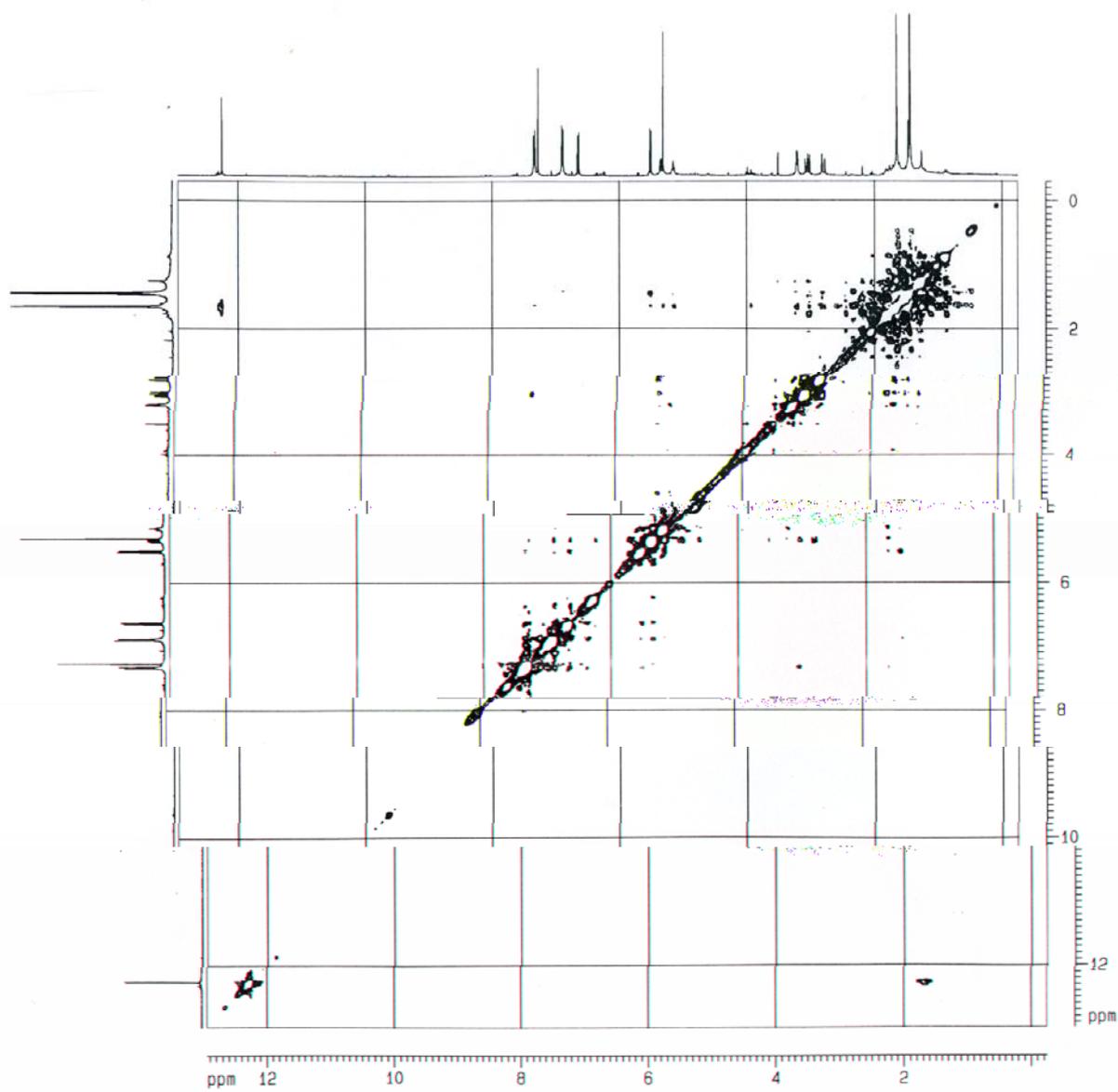


FIGURA 1.49:

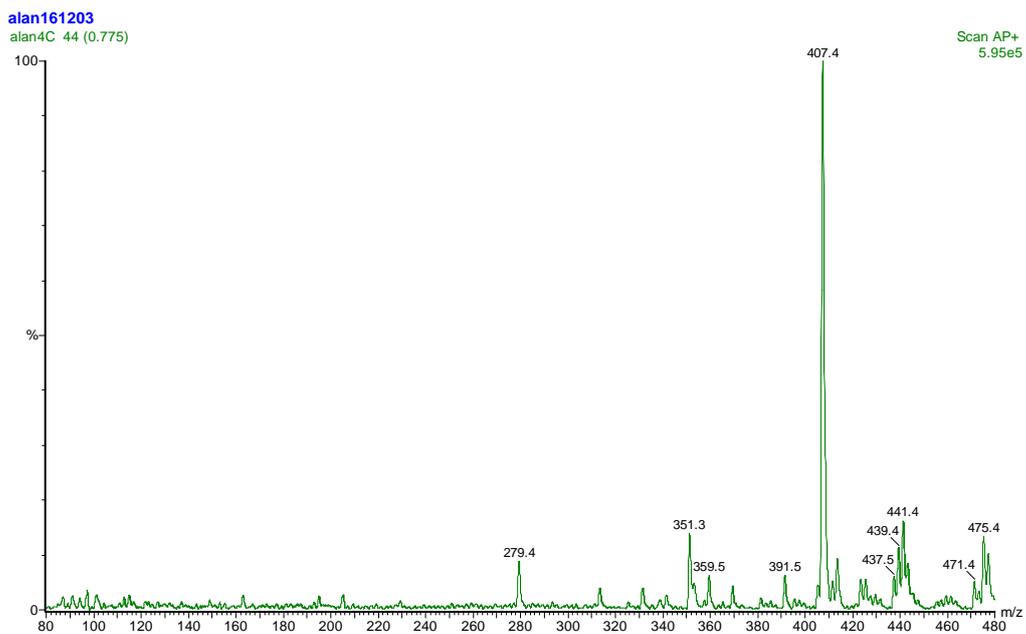


FIGURA 1.50

FIGURA 1.51

Citrus

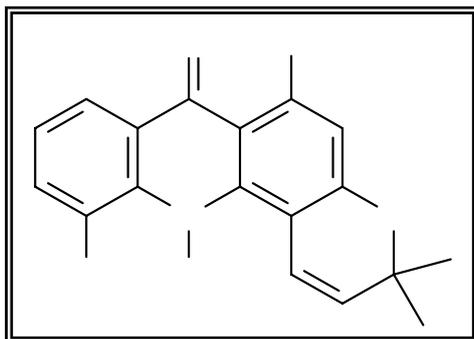


FIGURA 1.51

FIGURA 1.53



FIGURA 1.54

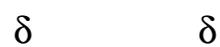


FIGURA 1.55

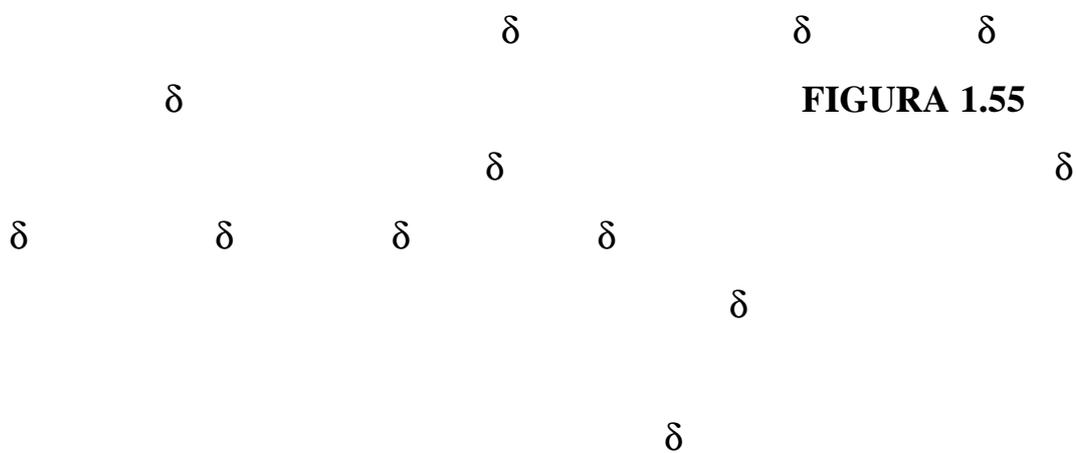


FIGURA 1.57



FIGURA 1.52

δ

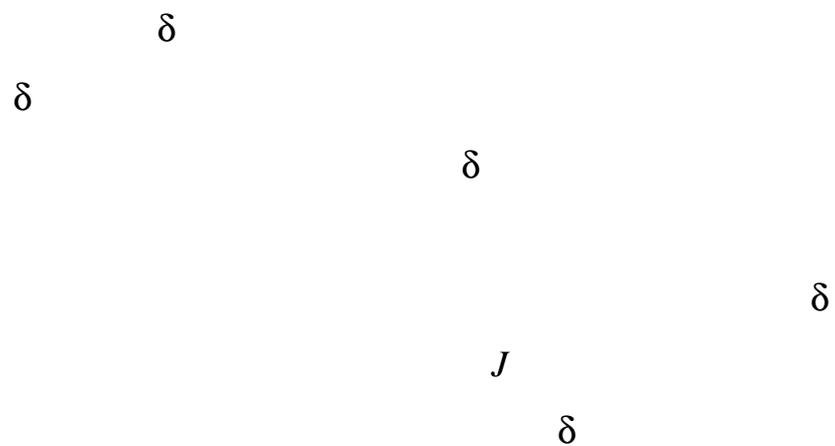


FIGURA 1.56



FIGURA 1.52

δ

δ

TABELAS 1.16 1.17

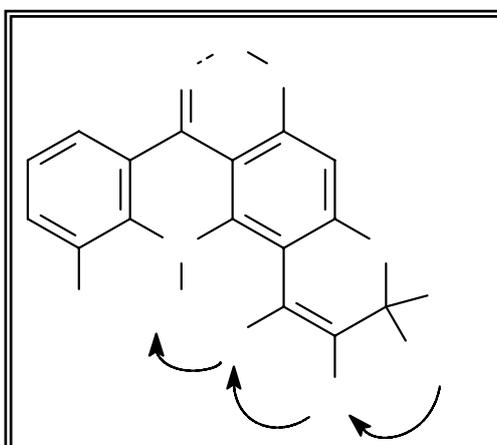
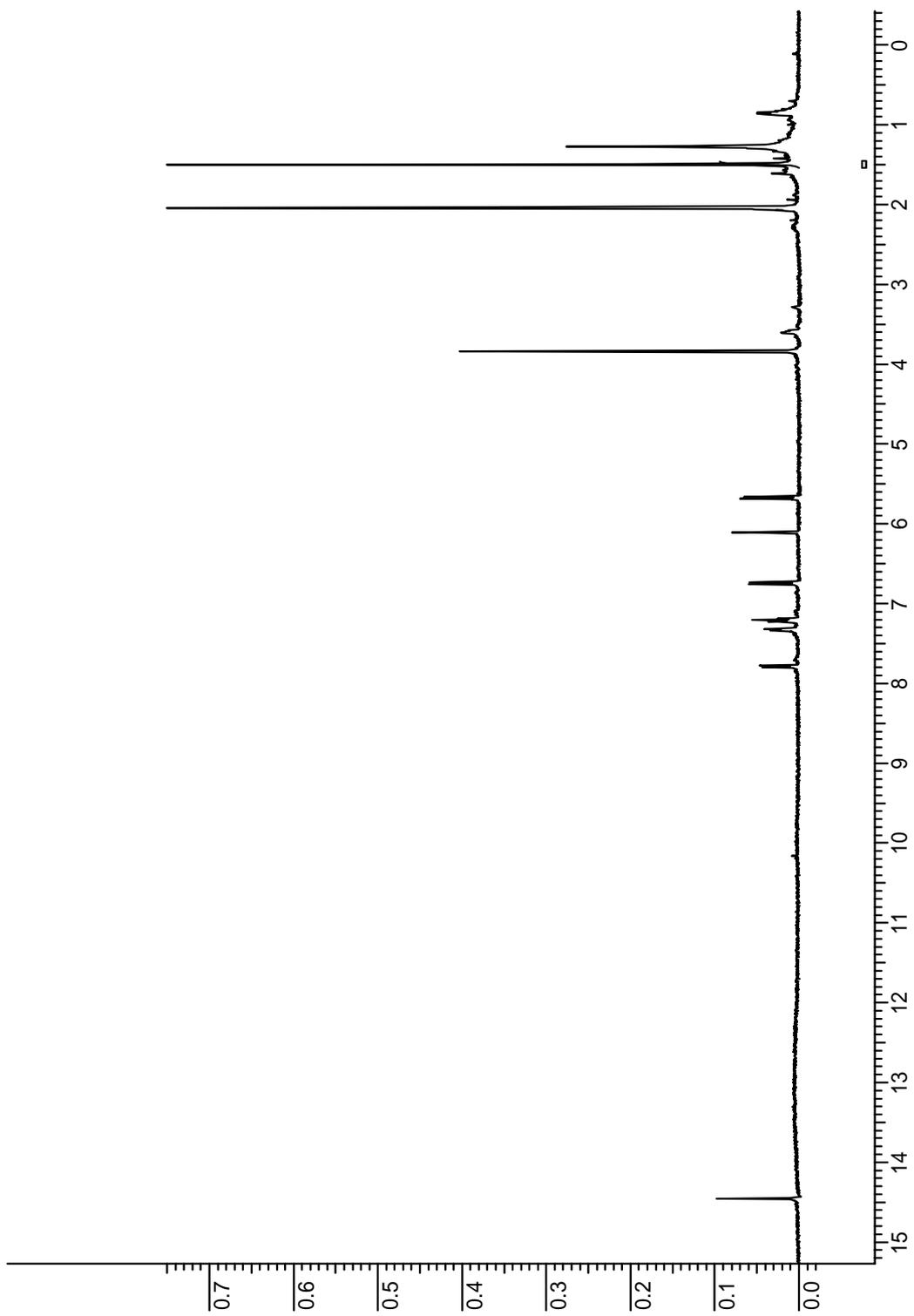


FIGURA 1.52



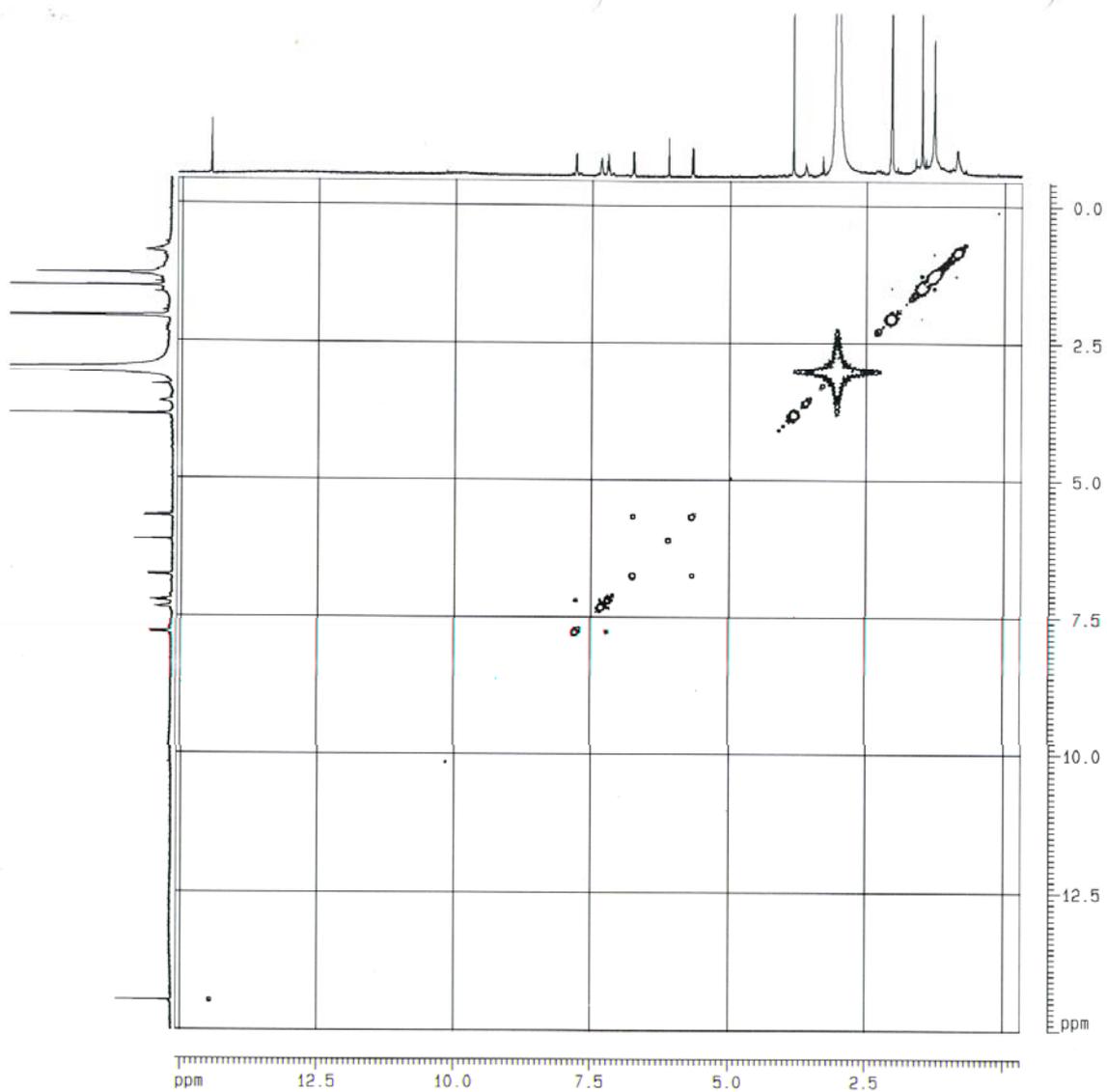


FIGURA 1.54:

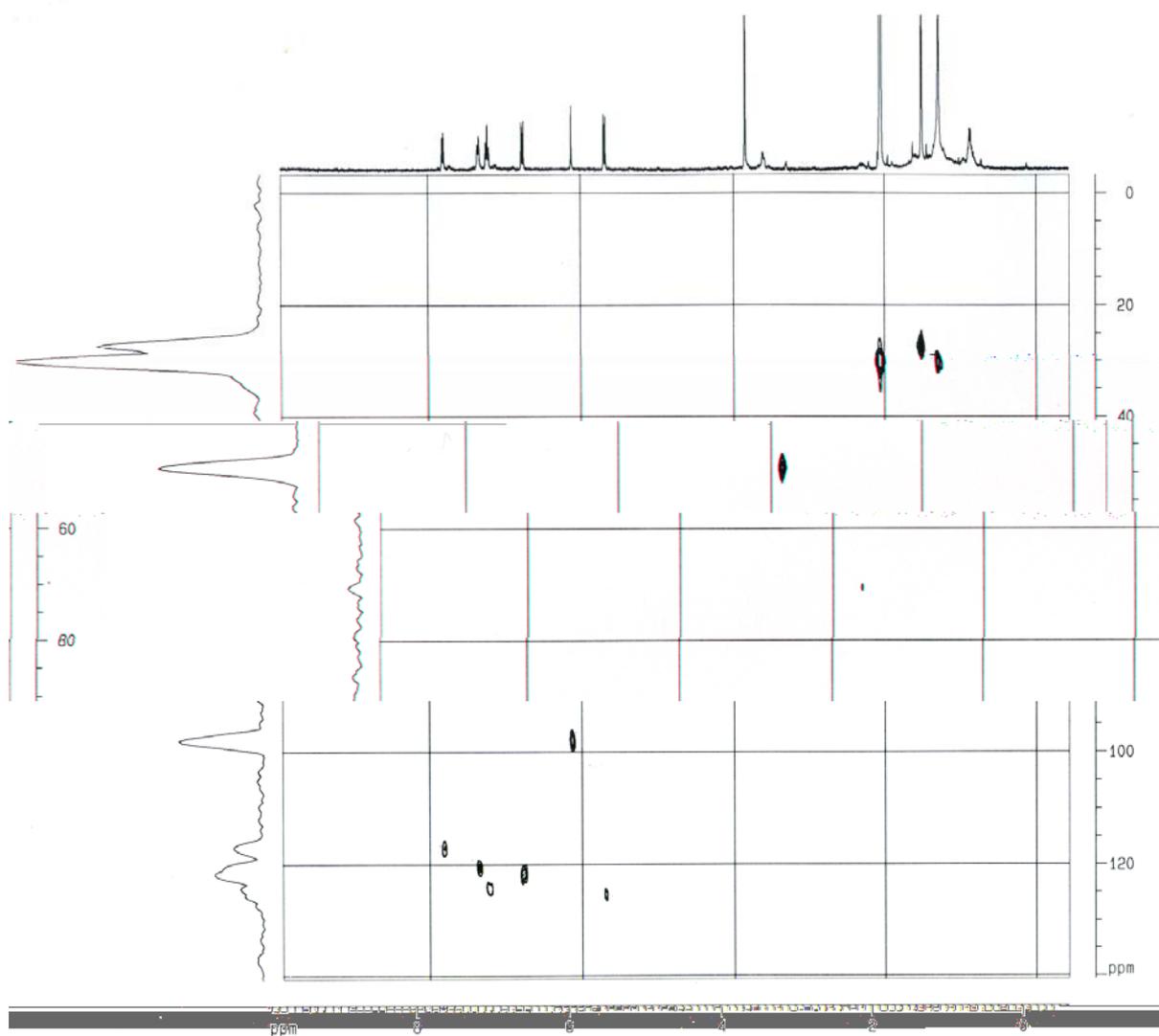


FIGURA 1.55:

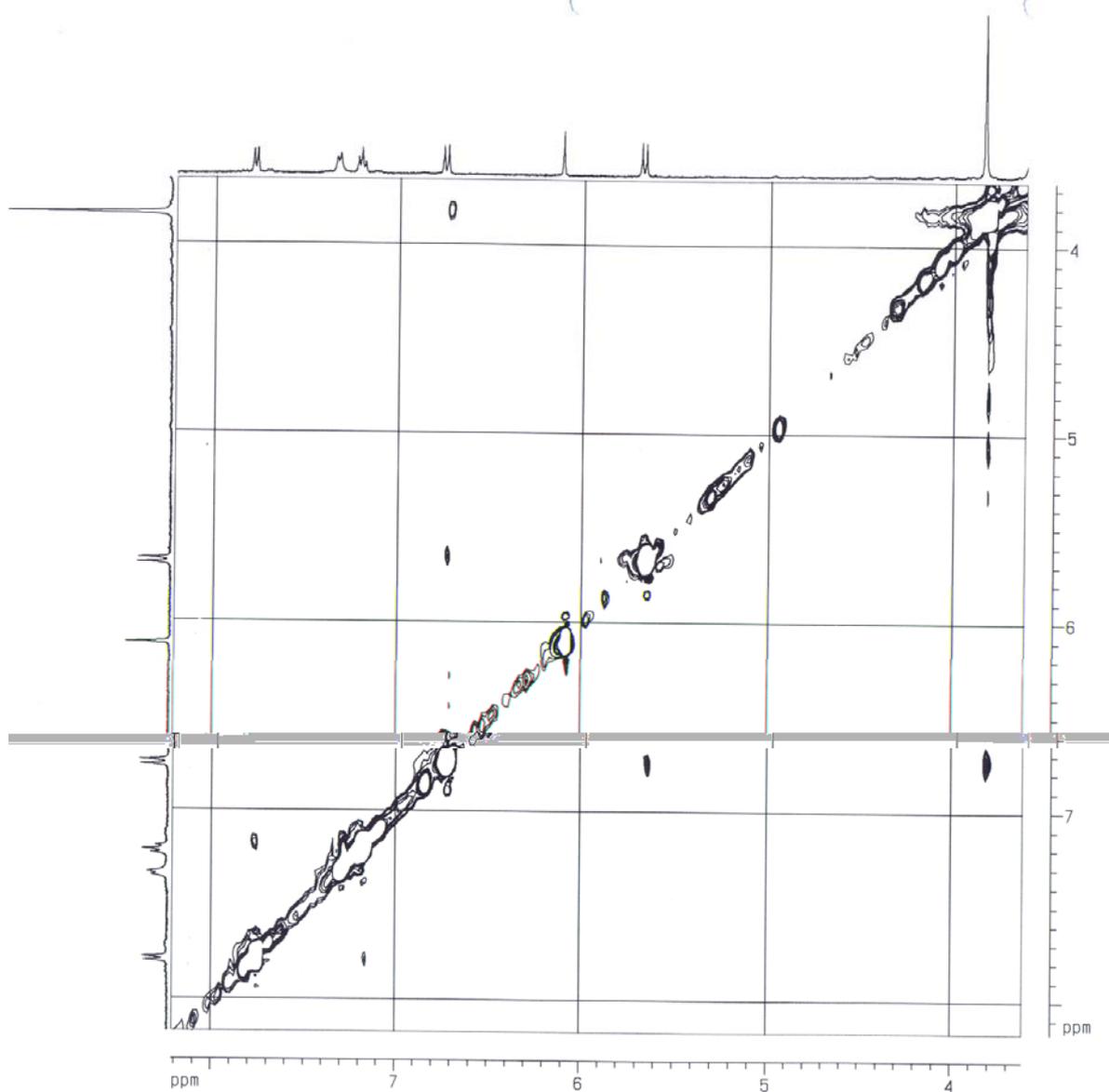


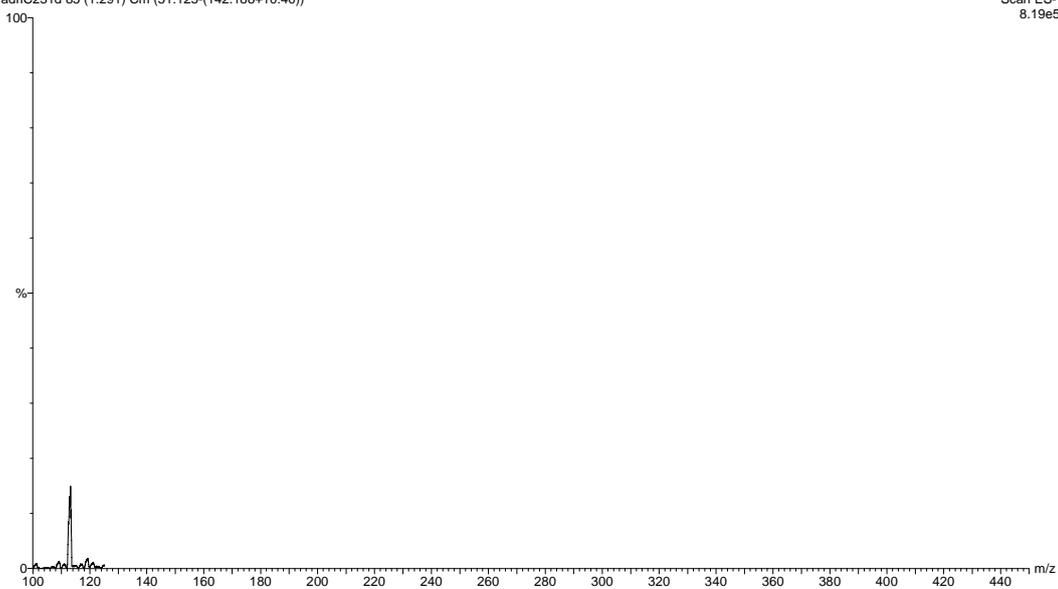
FIGURA 1.56:

ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE DE *CITRUS LIMONIA* ENXERTADO COM *C. SINENSIS*

adriana091202

adriC231d 85 (1.291) Cm (51:125-(142:188+10:40))

Scan ES-
8.19e5



CAPÍTULO 2

2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À *GUIGNARDIA CITRICARPA*

Citrus sinensis

in natura

FIGURA 2.1

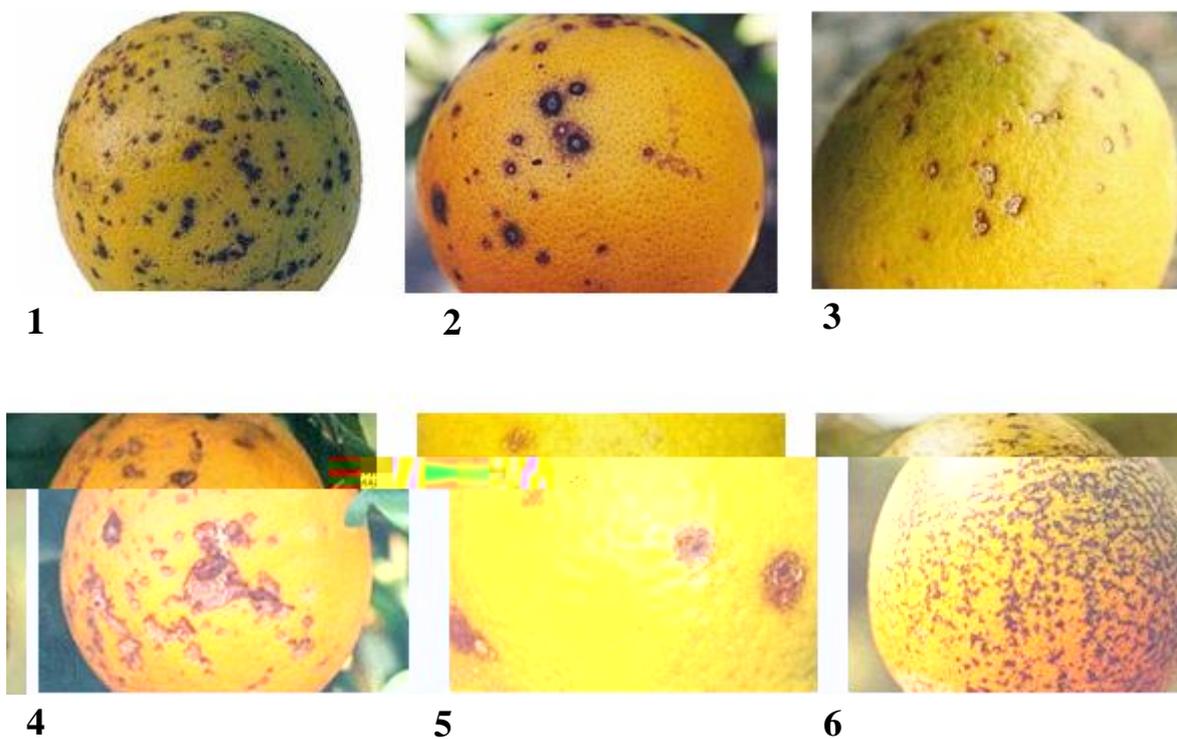


FIGURA 2.1:

website

Phoma citricarpa

Phyllosticta citricarpa

Guignardia citricarpa

Citrus

citricarpa

Guignardia

Phyllosticta citricarpa

FIGURA 2.2 (A)

FIGURA 2.2 (B)

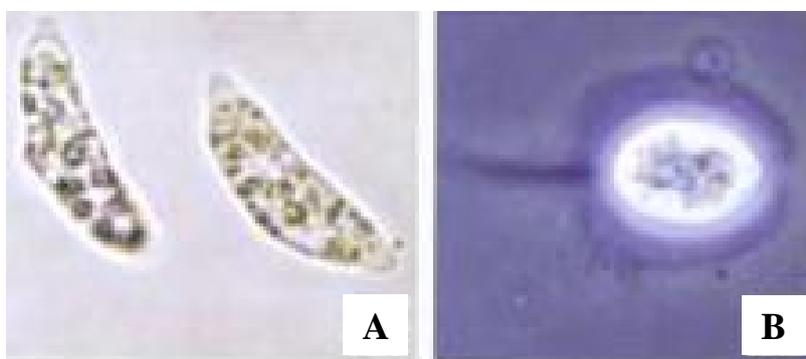


FIGURA 2.2:

A

B

Guignardia citricarpa

FIGURA 2.3

1

2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A *GUIGNARDIA CITRICARPA*

G. citricarpa

C. limonia

C. sinensis

capítulo

Phyllosticta citricarpa

G. citricarpa in vitro

in

vitro

G. citricarpa

μ

FIGURA 2.4

a

G.

citricarpa **b**

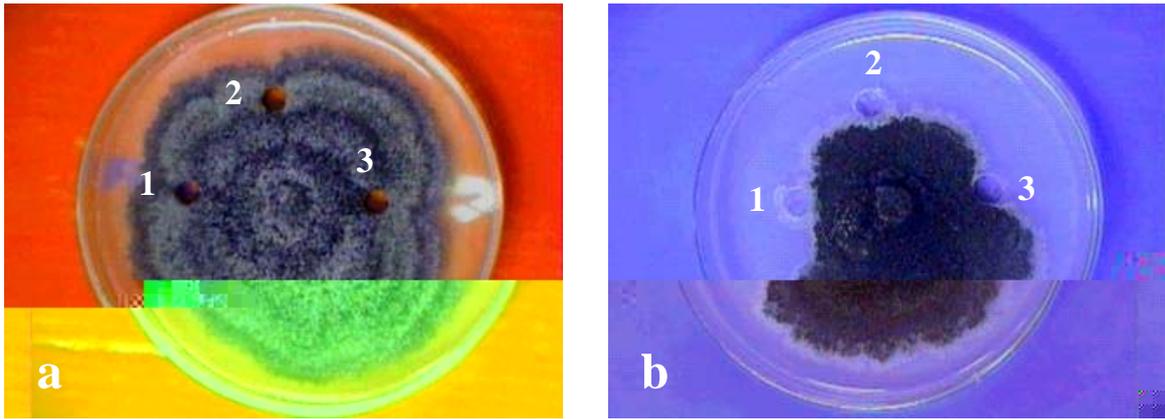


FIGURA 2.4:
citricarpa

G.

G. citricarpa in vitro

G. citricarpa

G. citricarpa

Citrus

ϕ

FIGURA 2.5c

ϕ

Citrus

ϕ

FIGURA

2.5d

μ

μ

FIGURA

2.5e f

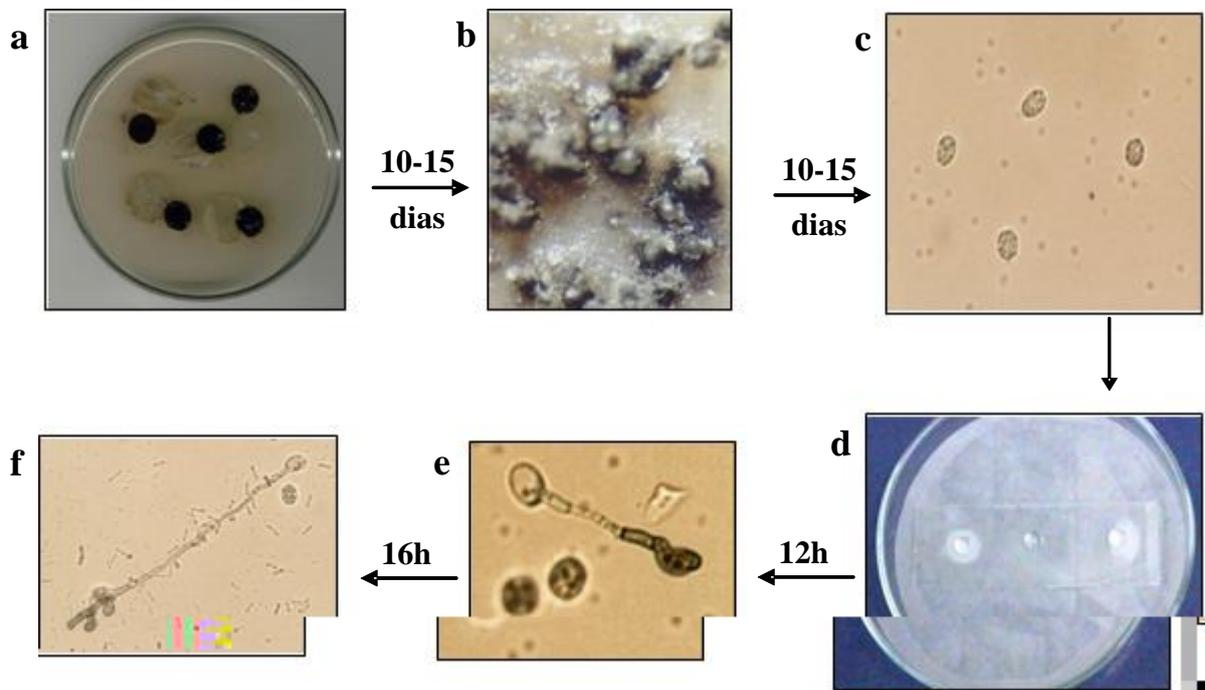


FIGURA 2.5:

Phyllosticta citricarpa

Guignardia citricarpa

Citrus a

b

c

d

P. citricarpa e f

G. citricarpa *C.*
sinensis *C. limonia*

G. citricarpa

Citrus

C. sinensis

C. limonia

C. limonia

C. sinensis

C. sinensis *C. limonia*

G. citricarpa in vitro

C. sinensis *C. limonia*

GRÁFICO 2.1 *G. citricarpa*
GRÁFICO 2.2

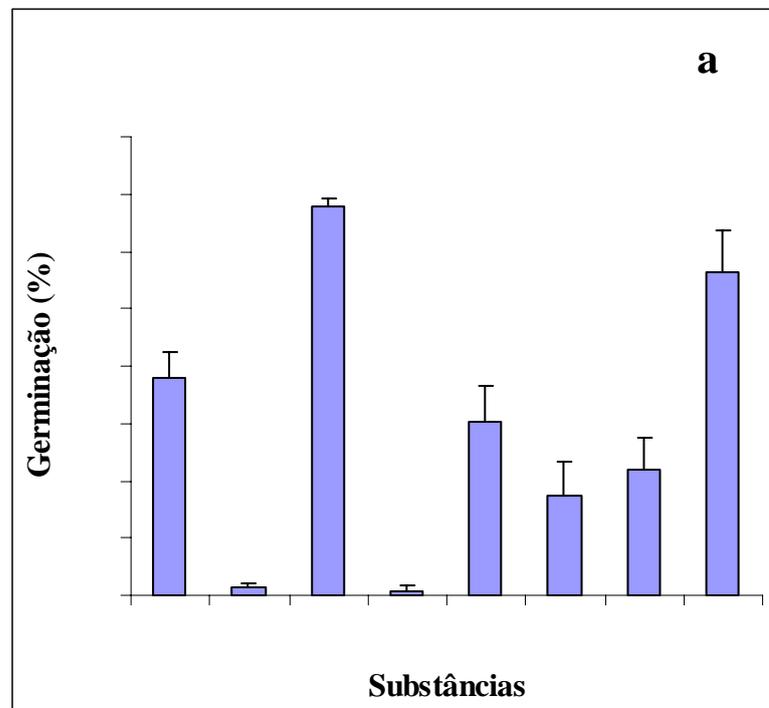


GRÁFICO 2.1
C. limonia

C. sinensis
G. citricarpa

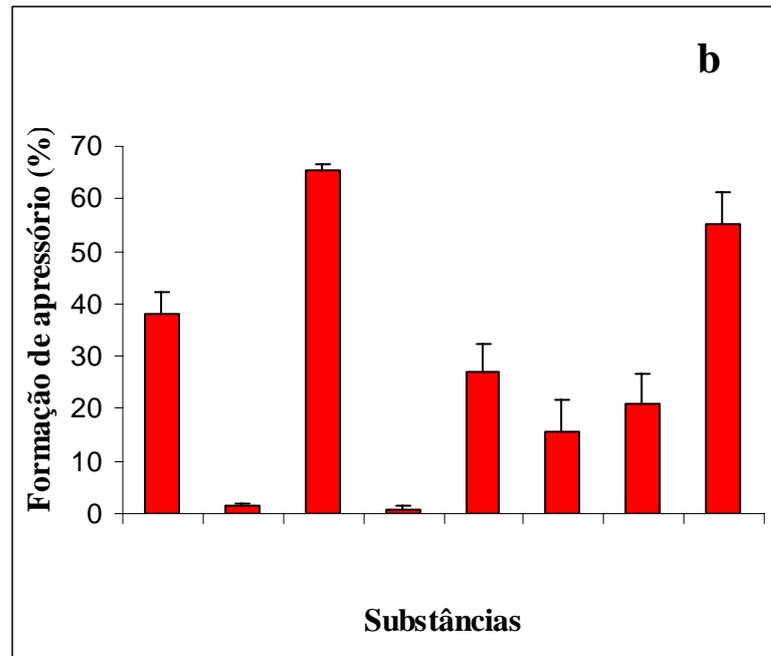


GRÁFICO 2.2

C. limonia

C. sinensis

b *G. citricarpa*

CAPÍTULO 3

3 - ESTUDO BIOSSINTÉTICO DE CUMARINAS PRENILADAS

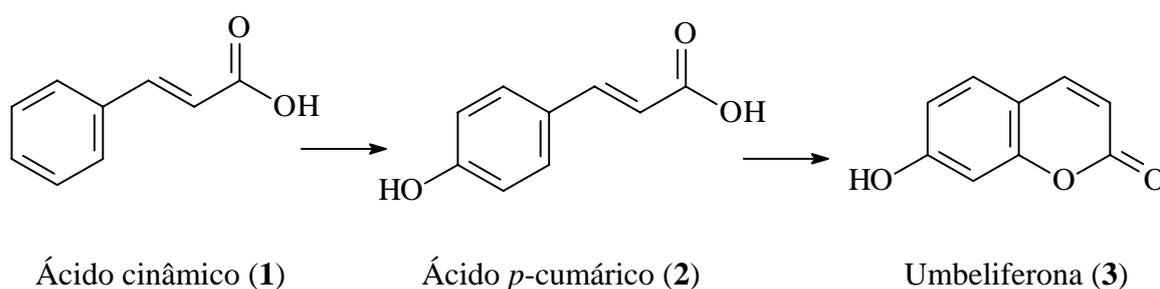
A biossíntese dos metabólitos biologicamente ativos é determinada por interações ecológicas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções principalmente de defesa e atração (RHODES, 1994). Os metabólitos, de acordo com a classe química a que pertencem, são potencialmente ativos em uma determinada função. Essa função também depende da localização na planta em que são metabolizados e assim a formação destes metabólitos são condicionados às reações enzimáticas que ocorrem em nível de compartimentos celulares (ENGLARD, 1990).

Após determinar a classe química de alguns metabólitos pode porpôr-se uma rota biossintética, ou seja, a biogênese, que é baseada no seu metabolismo primário derivadas de substâncias do caminho do mevalonato, acetato, chiquimato e ácidos aminados (BERGAMO, 2003).

O estudo para determinação de rotas biossintéticas de metabólitos secundários está associado ao fato de que quando uma substância com alguma atividade biológica e de interesse farmacológico é isolada, muitas vezes, é necessário otimizar a produção destes metabólitos. Para tanto, é importante conhecer a enzima ou sistema enzimático envolvido na biossíntese desta substância, além de conhecer seu mecanismo de ação, seus ativadores e inibidores, entre outras características.

Desta forma, com intuito de se conhecer melhor sobre o mecanismo de ação das piranocumarinas que foram as substâncias isoladas em maior quantidade das raízes de plantas de *C. limonia* enxertadas com *C. sinensis* e ainda por serem as únicas cumarinas preniladas isoladas nas folhas do mesmo enxerto, é que se segue um estudo biossintético. Levou-se em consideração nesse estudo pesquisas já realizadas desde 1942 em que o ácido

p-cumárico (2), formado a partir do ácido cinâmico (1), é utilizado como precursor geral de cumarinas 7-oxigenadas sintetizadas em plantas e que uma hidroxilação na posição *meta* em relação à hidroxila existente no ácido *p*-cumárico é necessária para a formação do anel lactônico o que leva à formação da Umbeliferona (3), cumarina precursora para a formação das piranocumarinas (NIELSEN, 1970).



Esta hidroxilação é mecanisticamente desfavorável o que torna essa etapa biossintética aparentemente duvidosa. Para isto, os experimentos realizados em *Hydrangea macrophylla* e *Lavandula officinalis*, tendo como substratos marcados o ácido *trans-p*-cumárico (2) e seu β -D-glicosídeo (4), o ácido *cis-p*-cumárico, ácido *trans*-cinâmico, espirolactona, ácido *trans-o*-cumárico e seu β -D-glicosídeo, demonstraram que o ácido *trans-p*-cumárico e seu β -D-glicosídeo são prontamente transformados em umbeliferona (3), enquanto que os demais são precursores ineficientes.

Os passos para a formação da Umbeliferona (3) foram realizados *in vitro* segundo Austin (1965) e seguem a partir da transformação do ácido *trans*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (6) ao *cis*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (7) e posteriormente à skimmina (8). Em estudos posteriores realizados com *Hydrangea macrophylla* foram isolados a skimmina e o ácido *cis*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (5), o que permite esquematizar a biossíntese de umbeliferona como mostrado na **FIGURA 3.1**, na página 119.

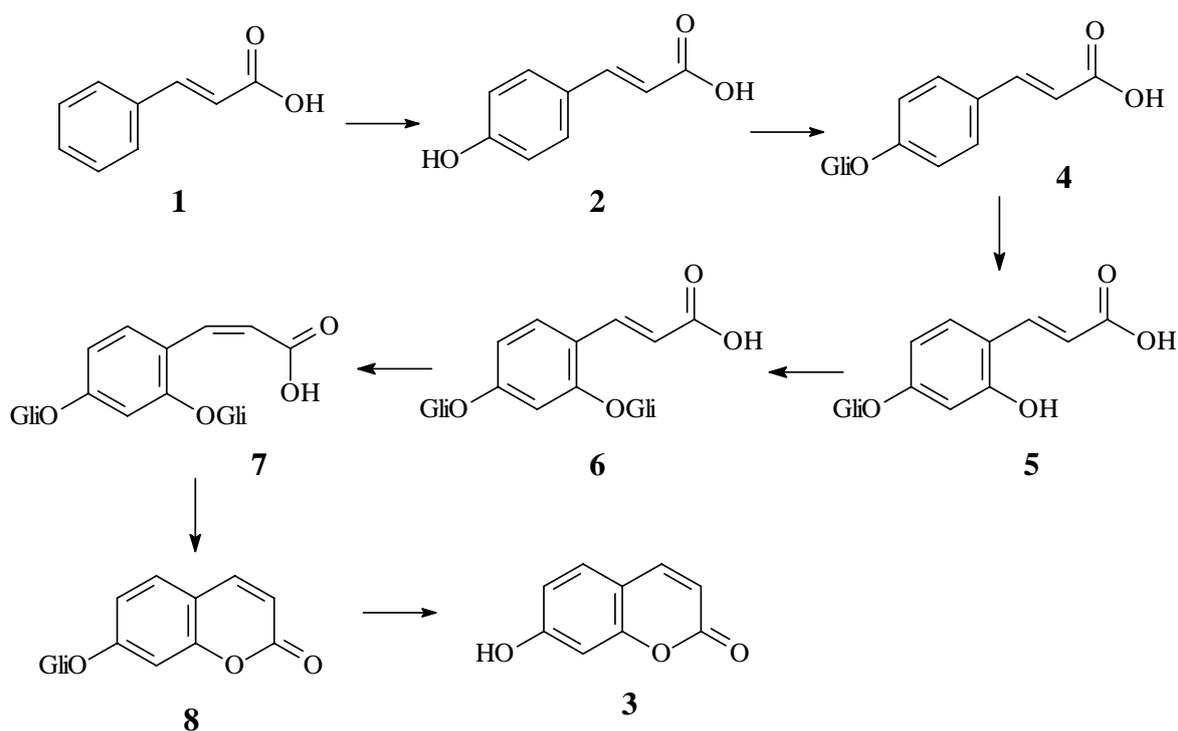


FIGURA 3.1: Biossíntese da cumarina Umbeliferona (3) a partir do Ácido cinâmico (1).

A isomerização do *trans*-2,4-di- β -D-glicosiloxicinâmico (6) ao *cis*- (7) ocorre rapidamente e o equilíbrio favorece a forma *cis*. Segundo NIELSEN (1970) essa isomerização *trans-cis* é uma reação catalizada pela luz e não enzimática, mas há também estudos que mostram uma conexão entre a formação do ácido *cis*-o- β -D-glicosiloxicinâmico em *Melilotus alba* e a intensidade de iluminação na planta, e também há algumas evidências para a presença de uma isomerase nessa mesma planta. O equilíbrio de uma mistura *cis-trans* de ácidos cinâmicos sem oxigenação na posição *orto*, favorece a forma *trans* (65-75%). A estabilidade do isômero *cis*-o- β -D-glicosiloxicinâmico é devido a uma ponte de hidrogênio entre o grupo carboxila e a 2-hidroxila da glicose, o que não é possível no isômero *trans* (NIELSEN, 1970).

Os experimentos realizados com Umbeliferona (**3**), ácido cinâmico (**1**) e ácido mevalônico marcados, em *Conium maculatum*, *Heracleum lanatum*, *Pastinaca sativa* e *Ruta graveolens*, indicaram que Umbeliferona (**3**) é o precursor mais eficiente das piranocumarinas xantiletina (**13**) e seselina (**16**), e que o anel pirano resulta de isoprenilação de umbeliferona. Essa isoprenilação pode ocorrer de duas maneiras diferentes, resultando na desmetilsuberosina (**9**), ou no ostenol (**10**), que são respectivamente os intermediários na biossíntese das piranocumarinas lineares e angulares. Em seguida desmetilsuberosina (**9**) e ostenol (**10**) sofrem uma epoxidação na cadeia lateral, resultando respectivamente 6-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**11**) (configuração R ou S) e 8-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**14**) (configuração R ou S). A hidrólise desses epóxidos conduz aos dióis, os quais possivelmente são artefatos formados durante o isolamento, segundo Grundon (1975). O mesmo autor sugere ainda que os próprios epóxidos, e não seus dióis participem na biossíntese das piranocumarinas, os quais podem sofrer ciclização para formar as diidropiranocumarinas sem afetar o centro quiral como a (S)-(+)-decursinol (**12**) a partir do (S)- 6-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**11**) ou (R)-(+)-lomatina (**15**) a partir do (R)- 8-(2',3'-epoxi-isopentil)-umbeliferona (**14**) (**FIGURA 3.2**, p. 121).

Os intermediários nas transformações das diidropiranocumarinas nas piranocumarinas não estão bem caracterizados. Admite-se nessa transformação uma eliminação da 3'-hidroxila da diidropiranocumarina, através de uma desidratação, a qual conduz a piranocumarina linear (Xantiletina **13**) ou angular (Seselina **16**).

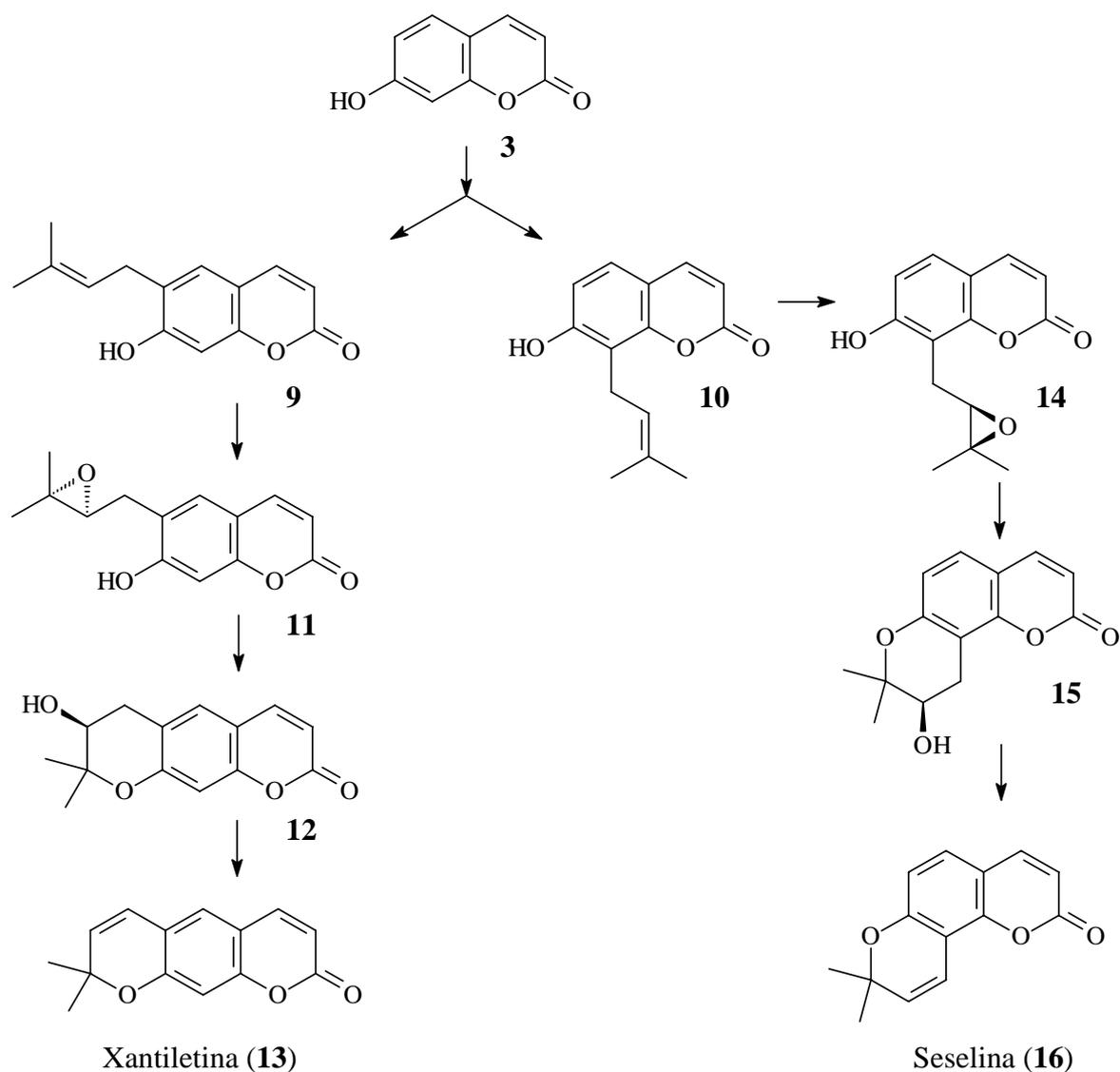


FIGURA 3.2: Biossíntese das piranocumarinas Xantiletina (13) e Seselina (16) a partir da cumarina Umbeliferona (3).

Na biossíntese das cumarinas discutidas acima, são mostrados os passos para a formação das piranocumarinas com a isoprenilação da umbeliferona, ou seja, como a transferência de uma unidade prenil (pirofosfato de dimetilalila - DMAPP) leva a formação dos precursores Desmetilsuberosina (9) ou Ostenol (10), que são respectivamente os intermediários na biossíntese das piranocumarinas lineares e angulares. Essa

isoprenilação das cumarinas é realizada por meio de enzimas que catalisam a adição do pirofosfato de dimetilalila na umbeliferona.

As enzimas são catalisadores biológicos encontrados em todas as células vivas, distinguindo-se dos não biológicos pela sua eficiência, especificidade e sensibilidade. Em geral são proteínas, especializadas pela catálise de reações biológicas no interior das células dos animais, vegetais e microorganismos (ROYER, 1982). São encontradas na natureza em misturas complexas, usualmente em células, as quais contêm cem ou mais enzimas diferentes além de outros componentes celulares (DIXON, 1964).

Primeiramente é necessário reconhecer a que classe pertence a enzima que está intermediando a reação de interesse. Entre elas, existem seis: (a) Oxidoredutases são enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons; (b) Hidrolases que catalisam reações de hidrólises de ligações covalentes; (c) Liases que catalisam a ruptura de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia ou gás carbônico; (d) Isomerases que catalisam reações de interconversão entre isômeros; (e) Ligases que catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes utilizando ATP; e por último, as de interesse para este trabalho, (f) Transferases que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais tais como amino, fosfato, acila, carboxila, isoprenila e etc (EISENTHAL, 1992).

Dentre o grupo das transferases, existem as preniltransferases que são enzimas responsáveis pela catálise nas reações de prenilação de inúmeros compostos e pode ser dividido em duas famílias: As difosfato de isoprenila sintase, que catalisam a condensação de unidades isoprênicas; e as preniltransferases que catalisam a adição de grupamentos isoprênicos, que são importantes para este estudo por catalisarem a adição do pirofosfato de dimetilalila na umbeliferona, como discutido anteriormente, e será o foco de estudo neste capítulo.

As enzimas preniltransferases, assim como outros tipos de enzimas, reagem segundo um meio sobre o qual deve-se tomar alguns cuidados para que seja conservada sua atividade. No interior das células, as enzimas encontram todas as condições necessárias para expressarem sua atividade, desta forma durante a incubação *in vitro* de uma enzima com determinado substrato, ela deve estar de acordo com o pH, temperatura, cofatores, etc. necessários para que a enzima exerça sua atividade.

O processo de extração enzimática de um material vegetal pode ser realizado considerando-se que as plantas possuem parede celular celulósica e vacúolos e a extração deve ser feita de tal forma que se evite o rompimento dos vacúolos que poderiam conduzir a liberação de proteinases e o abaixamento do pH do extrato se não for controlado com uma solução tampão. Durante o processo de extração ou durante os tratamentos seguintes, a atividade enzimática pode ser perdida e para isso EISENTHAL (1992) menciona algumas estratégias que permitem minimizar essa inatividade como:

- ✓ Controle do pH: a maioria das enzimas é ativa em apenas uma determinada faixa de pH, para isso deve-se estabelecer uma determinada solução tampão em um pH específico;
- ✓ Controle da temperatura: a temperatura não deve ultrapassar 4°C para que minimize a desnaturação da enzima. Desta forma se utiliza soluções e condições sob banho de gelo evitando o aumento da temperatura. A baixa temperatura também é utilizada com objetivo de diminuir a desnaturação das enzimas pela ação de proteinases (proteólise) endógenas durante e após a extração. Isso pode ser evitado também, por exemplo, para serinoprotease e cisteínoprotease (proteinases oriundas de tecidos vegetais), com adição de inibidores específicos de proteinases como pela adição de PMSF;

- ✓ Proteção os grupos tióis: os grupos tióis da cadeia lateral da cisteína podem ser oxidados pela ação do oxigênio. No interior da célula, a cadeia lateral é mantida na forma reduzida (-SH), mas com o rompimento da célula e exposição a oxigênio, há uma tendência da cadeia formar ligações dissulfeto ou espécies oxidadas como ácido sulfídrico;
- ✓ Controle de compostos fenólicos: As células apresentam alta concentração de compostos fenólicos, os quais na presença de oxigênio podem ser convertidos em pigmentos poliméricos, pela ação das fenoloxidasas. A inativação da enzima no extrato é proporcionada por esses pigmentos. Esses compostos fenólicos podem ser removidos do extrato por meio da complexação com polivinilpolipirrolidona (PVPP).

Com isso procede-se com o processo de extração da enzima como um dos três processos descritos por Bernard (1955), em que para extratos de folhas o procedimento é realizado por meio de trituração com nitrogênio líquido em gral e pistilo com solução tampão, com posterior centrifugação em centrífuga refrigerada a 4°C em tempo pré-estabelecido.

O estudo da enzima preniltransferase abordado neste capítulo não visa entender a biossíntese das piranocumarinas, pois estas já possuem estudos comprovando-as, como descritos ao longo deste capítulo. Na verdade, propõe-se verificar se há uma possível translocação da piranocumarina xantiletina (**12**), das raízes para as folhas em plantas enxertadas de laranja Pêra (*Citrus sinensis*) sobre limão Cravo (*C. limonia*), com base nos estudos biossintéticos já realizados.

O interesse de verificar a possível translocação advém, como já mencionado, dos estudos fitoquímicos onde a xantiletina foi isolada das raízes em uma quantidade muito maior em relação a que foi isolada nas folhas da mesma planta, e ainda pelo fato de que na parte inferior da planta (raízes e

caule inferior), praticamente todos os metabólitos isolados possuem uma unidade isoprênica em sua estrutura; já o estudo das partes superiores (caule superior e folhas), apenas dois únicos compostos, duas piranocumarinas. Esses resultados trazem evidências de que essas piranocumarinas estariam sendo metabolizadas nas partes inferiores da planta e posteriormente sendo translocadas para a parte superior da mesma.

Assim, neste capítulo mostra-se o estudo biossintético com a enzima preniltransferase com o objetivo de verificar a atividade da mesma em todas as partes da planta enxertada (laranja Pêra sobre limão Cravo), raiz, caule inferior e superior e folhas, e com isso afirmar se estas piranocumarinas podem estar sendo translocadas.

3.1 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 - Materiais e reagentes utilizados

- Centrífugas:
 - Centrífuga refrigerada Sorvall RC 5C Plus;
 - Microcentrífuga Denver.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Varian Prostar equipado com sistema quaternário de bombas 240; Injetor auto sampler 410 e detector de ultravioleta diode Array 230;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-10Avp equipado com auto injetor e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 6AV;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Shimadzu LC- 10Avp equipado com auto injetor SIL 10AF e detector de ultravioleta Shimadzu SPD 10AV.

- Espectrômetro:
 - Perkin Elmer (Lambda 6, UV/VIS spectrophotometer.

- Coluna para CLAE:
 - Coluna analítica Hypersil ODS (C₁₈) (ϕ x h = 4,6mm x 25cm).

- Contador de radioisótopo:
 - .Cintilador BECKMAN COULTER – LS 6500 Multi-purpose Scintillation Counter.

- Solução cintilante:
 - Solução cintilante EcoLume-ICN.

- Reagentes para ensaio enzimático:
 - PVPP;
 - Polietilenoglicol;
 - EDTA;

- Sacarose;
 - Cisteína;
 - Ácido ascórbico;
 - Tampão fostato pH 8,0;
 - Cloreto de magnésio e manganês 0,5 M;
 - Ácido clorídrico 5M;
 - Acetato de etila.
-
- Eletroforese:
 - Cuba Mighty Small SE 250/SE 260 mini-vertical UNIT;
 - Fonte Eletrophoresis Power Supply EPS 301.
-
- Reagentes para eletroforese:
 - Tampão de separação pH 8,8 (Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%);
 - Tampão de concentração pH 6,8 (Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%);
 - Acrilamida-Bis (30-8%), Bisacrilamida (2%);
 - Persulfato de amônio (10%);
 - TEMED;
 - Glicina;
 - SDS;
 - Glicerol;
 - EDTA;
 - Mationina;
 - Azul de bromofenol;
 - Ácido tricloroacético (TCA) (10%);
 - DTT;
 - Nitrato de prata (0,1%);

- Carbonato de sódio (3%);
- Acetaldeído (0,085%);
- Ácido cítrico 2,3M.

3.1.2 - Coleta do material botânico

O material vegetal utilizado foram plantas obtidas do enxerto de *Citrus sinensis* (laranja Pêra) sobre *C. limonia* (limão Cravo) com 3 a 5 meses após a enxertia e foram coletadas no Centro Avançado de Pesquisas Tecnológicas do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

3.1.3 – Protocolo para avaliação da atividade da enzima preniltransferase

O experimento foi realizado segundo o protocolo publicado por Zuurbier (1998) com a utilização de 10g de material vegetal fresco, mantido em casa de vegetação do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, sendo submetido para os ensaios da atividade da enzima preniltransferases:

- ✓ Triturar o material vegetal em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo;
- ✓ Ao material triturado adicionar 20mL de tampão fosfato pH 8,0 que foi anteriormente agitado com 1,7 g de PVPP por cerca de 30-50 minutos; Ao tampão adiciona-se também 435 mg de polietilenoglicol, 5,58 mg de EDTA, 3,0 mg de sacarose, 263,4 mg de cisteína e 1,05 g de ácido ascórbico;
- ✓ Filtrar em gaze e recolher o filtrado em tubo de centrífuga em banho de gelo;

- ✓ Centrifugar em centrífuga refrigerada a 4°C por 30 minutos a 10.000g e depois o sobrenadante foi novamente centrifugado por 2 horas a 16.000g;
- ✓ Solubilizar o precipitado (fração microsomal) em 3,0 mL de tampão fosfato pH 8,0 obtendo-se assim o extrato enzimático;
- ✓ Ensaiair em eppendorff, os seguintes reagentes:
 - 25 µL Precursor (Umbeliferona / Herniarina) (0,15 mg/mL);
 - 25 µL DMAPP (10 mM);
 - 5 µL Cofator (MgCl₂ ou MnCl₂ 0,5 M);
 - 235 µL Extrato enzimático
- ✓ Colocar para incubação por 30 minutos a 30°C em banho de aquecimento e iniciar a contagem do tempo a partir o momento em que se adiciona o extrato enzimático;
- ✓ Parar a reação com adição de 10 µL de HCl (5 M) e 450 µL de AcOEt;
- ✓ Centrifugar em microcentrífuga por 5 minutos a 7 RPM;
- ✓ Retirar 300 µL do sobrenadante e evaporar;
- ✓ Suspender em 70 µL e analisar via CLAE.

3.1.4 – Protocolo de incorporação de precursores marcados com radioisótopos

As plantas enxertadas de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, foram utilizadas como matrizes nos experimentos de incorporação com o pirofosfato de isopentenila [IPP-1-¹⁴C]. Este experimento foi realizado com o objetivo de se confirmar a translocação de cumarinas preniladas das raízes para as folhas nos enxertos de *Citrus*.

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo:

- ✓ Colocar em eppendorff 100 μ L da solução com o reagente marcado com ^{14}C ;
- ✓ O precursor foi administrado numa concentração de 4 $\mu\text{Ci/planta}$;
- ✓ Limpar as raízes da planta e colocar as raízes no eppendorff com a solução do reagente marcado;
- ✓ Após absorvido a solução, adicionar mais 100 μ L de água ao eppendorff para evitar o ressecamento da planta;
- ✓ Colocar as plantas em tubo de ensaio com água;
- ✓ Retirar a planta ao final de 1, 2 e 3 dias;
- ✓ Separar as raízes, caule inferior e superior e folhas. Extrair em AcOEt, concentrar e suspender em 3 mL de MeOH. Retirar 50 μ L para contagem no cintilador;
- ✓ Para contagem, adicionar 2 mL de solução cintilante;
- ✓ Injetar 50 μ L em CLAE, coletar frações de 1 mL pó 50 minutos e fazer contagem no cintilador.

3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação da atividade da enzima preniltransferase foi avaliada por meio de experimentos de prenilação de dois precursores, a Umbeliferona (**a**) e Herniarina (**b**) utilizando-se como substrato o DMAPP e extratos enzimáticos obtidos das frações microssomais das raízes, caule inferior e superior e folhas obtidas do material vegetal, sendo monitorado a produção de Desmetilsuberosina (**c**) e Suberosina (**d**) e Ostenol (**e**) e Ostol (**f**) (**FIGURA 3.3**, p. 131).

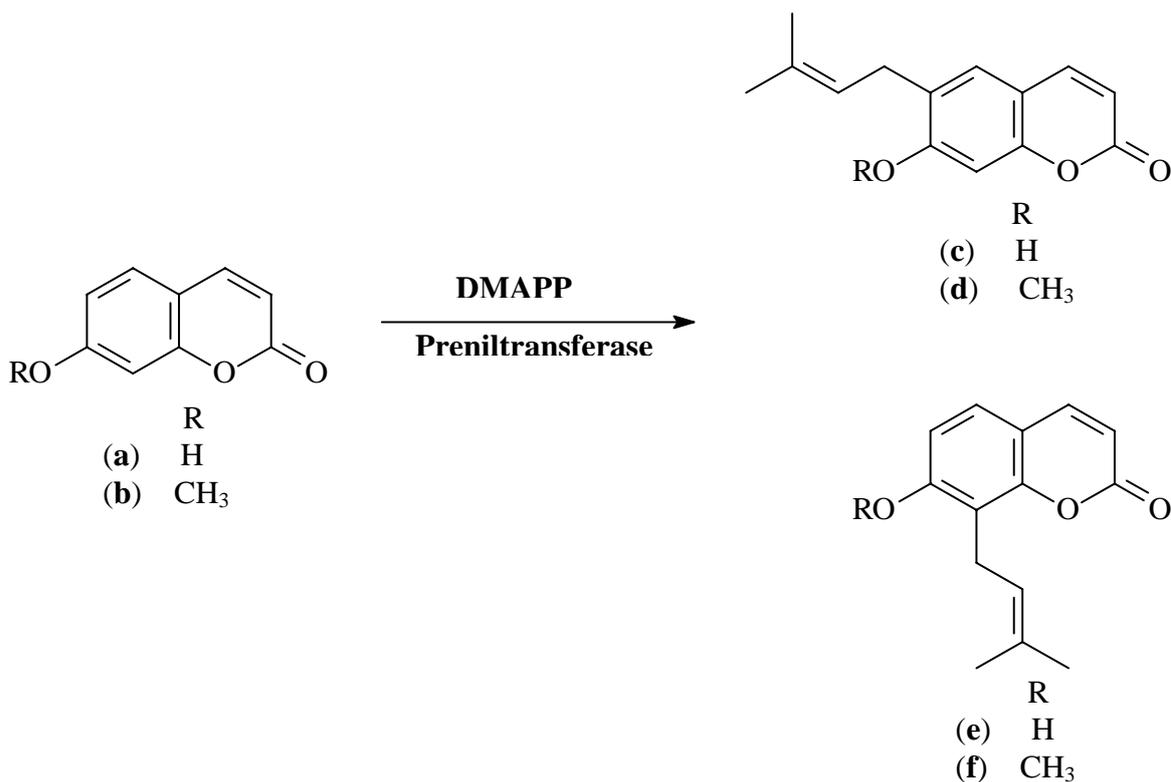


FIGURA 3.3: Reação de prenilação da Umbeliferona (a) e Herniarina (b).

Inicialmente foram analisados via CLAE os precursores Umbeliferona (a) e Herniarina (b) e apenas um dos produtos, a Suberosina (d), pois era o único à disposição, em condições pré-estabelecidas utilizando-se como fase móvel MeOH/H₂O (6:4) e uma coluna analítica C₁₈ (ϕ x h = 4,6 mm x 25 cm) em 220 nm. Os cromatogramas para a, b e d são mostrados a seguir (FIGURA 3.4, p. 132).

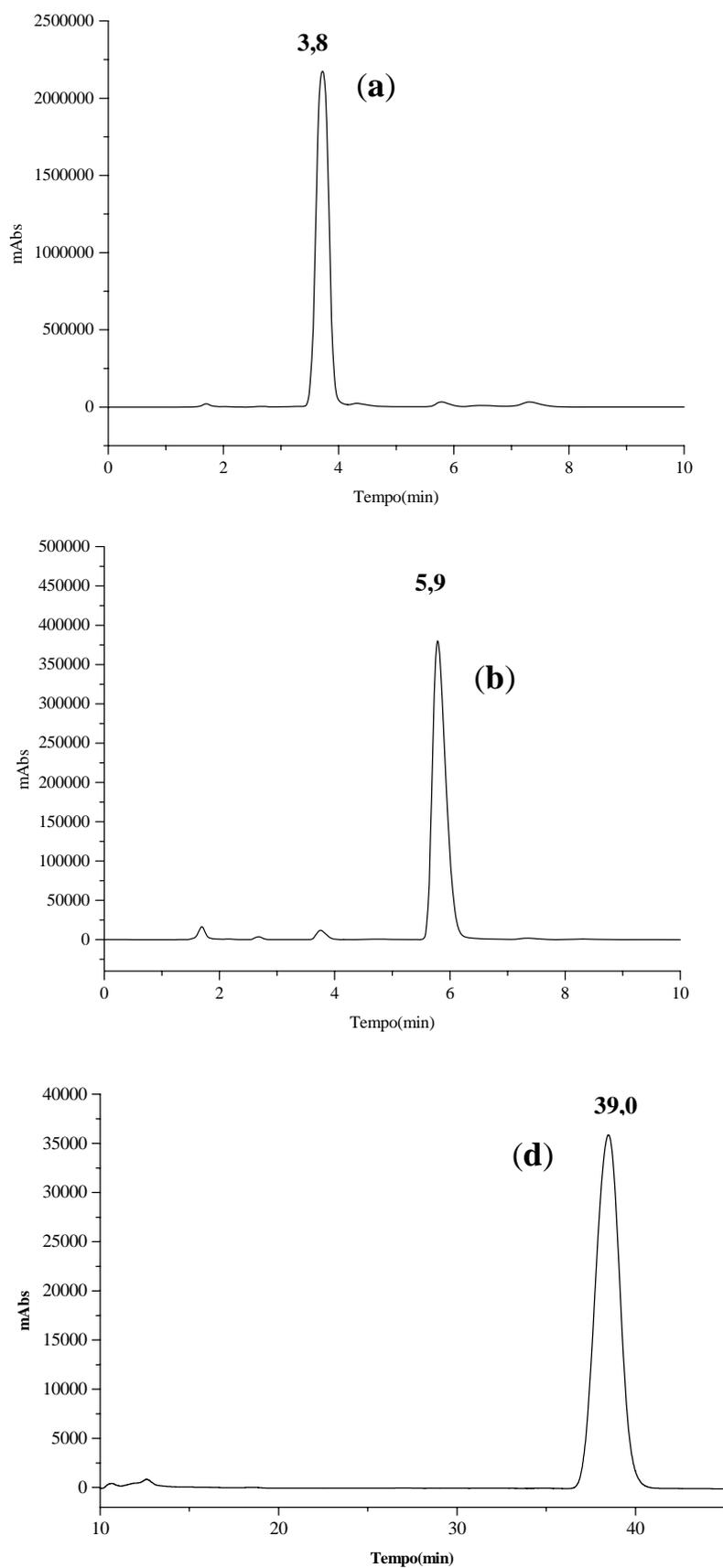


FIGURA 3.4: Cromatogramas da Umbeliferona (a), Herniarina (b) e Suberosina (d).

Foram monitorados também os compostos que são obtidos das partes inferiores (raiz e caule inferior) em grande quantidade, as piranocumarinas Xantiletina (**g**) e Seselina (**h**) visto que por ser um extrato enzimático bruto poderia haver outro tipo de enzima como, por exemplo, a ciclase, que estaria levando à formação de piranocumarinas, ou seja, cumarinas com a unidade prenila ciclizada. Os cromatogramas para as piranocumarinas Xantiletina e Seselina são mostrados na **FIGURA 3.5**, na página 133.

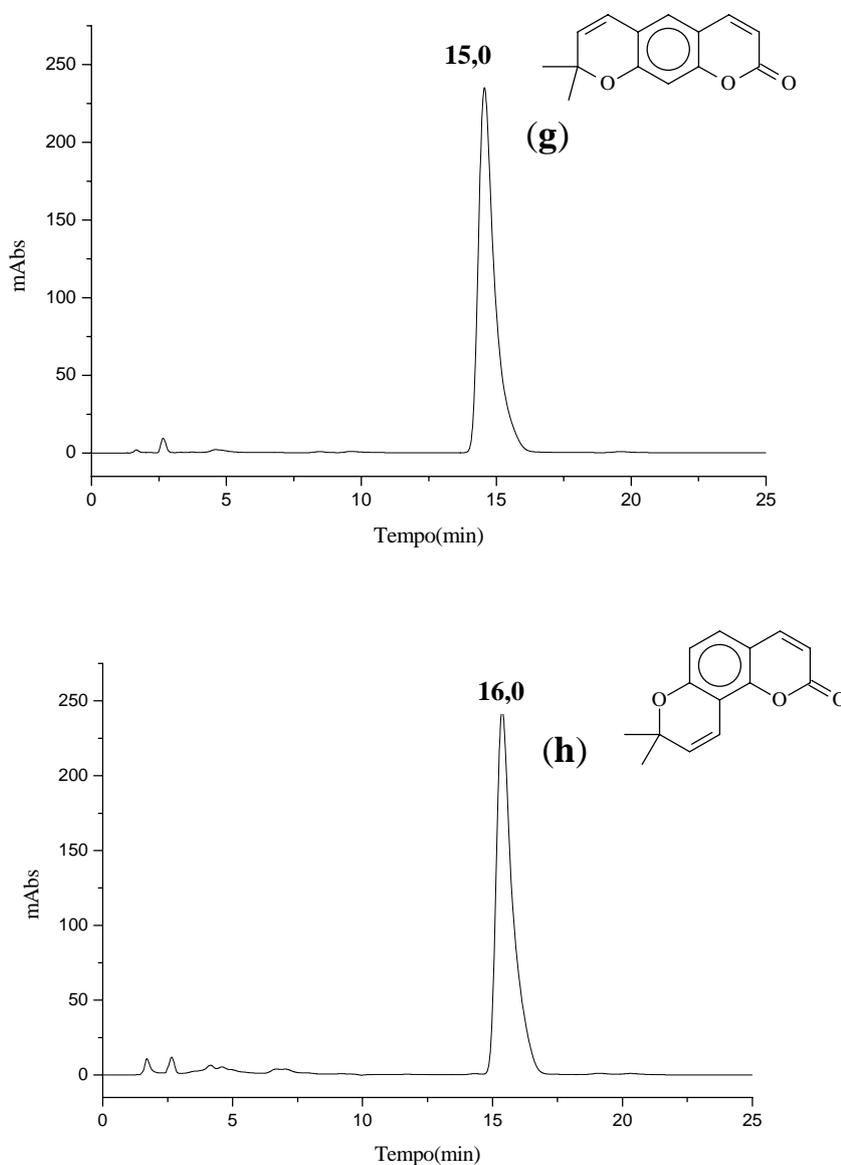


FIGURA 3.5: Cromatogramas da Xantiletina (**g**) e Seselina (**h**).

Depois de ter estipuladas as condições analíticas e determinados os tempos de retenções dos compostos, iniciou-se os experimentos com a realização dos ensaios primeiramente com as raízes e depois com as outras partes da planta.

Foram utilizados como branco, ensaios com omissão de precursor (Umbeliferona e Herniarina), cofatores, DMAPP e com desnaturação da enzima por ultrasom. Os experimentos eram realizados em triplicada para um resultado mais confiável (TABELA 3.1, p. 132).

TABELA 3.1: Experimentos de reação de prenilação.

Exper.	Tampão	DMAPP (μL)	Precursor a (μL)	Precursor b (μL)	MgCl ₂ (μL)	MnCl ₂ (μL)	Enzima (μL)	Temp. (°C)	Tempo (min)
1	40	-	-	-	-	-	325	30	30
2	25	10	-	25	5	-	325	30	30
3	25	10	25	-	5	-	325	30	30
4	10	-	25	-	5	-	325	30	30
5	10	-	-	25	5	-	325	30	30
6	-	10	25	-	5	-	325	30	30
7	-	10	-	25	5	-	325	30	30
8	-	10	25	-	5	-	325	30	30
9	-	10	25	-	-	5	325	30	30
10	-	10	-	25	5	-	325	30	30
11	-	10	-	25	-	-	325	30	30
12*	-	10	25	-	5	-	325	30	30
13*	-	10	-	25	5	-	325	30	30

* ensaio com enzima desnaturada.

A seguir é mostrado um cromatograma de um experimento (branco) em que se utilizou apenas tampão e extrato enzimático (FIGURA 3.6, p. 135). Pode-se observar que no branco já tem os produtos **d**, **g** e **h** como endógenos. Desta forma, os experimentos serão avaliados em relação à porcentagem de aumento de área dos picos em relação ao branco.

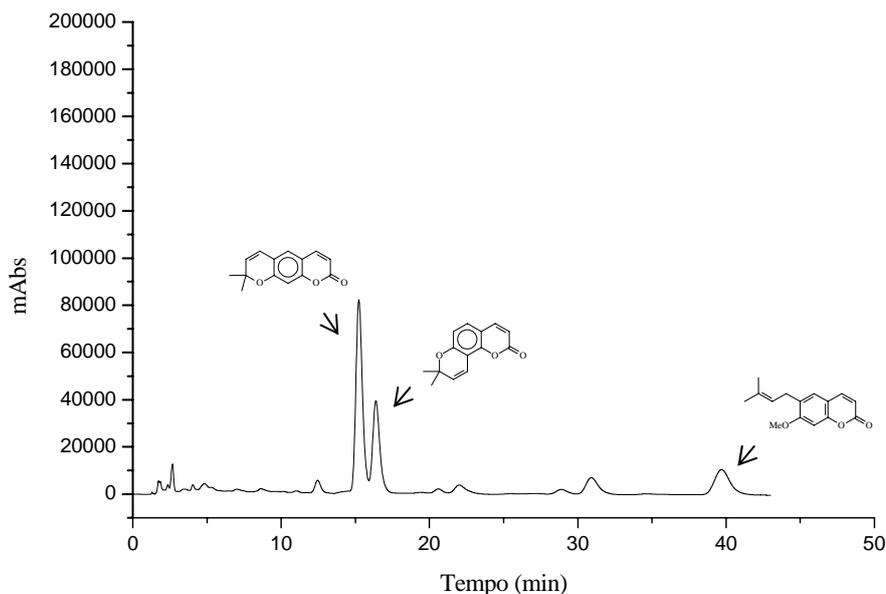


FIGURA 3.6: Cromatograma de um branco com presença de endógenos.

Esses picos foram comparados utilizando o tempo de retenção de cada padrão determinado anteriormente (**FIGURAS 3.4 e 3.5**, p. 132 e 133) e avaliados por meio de CLAE acoplado a espectrometria de massas (modo positivo) e assim foi possível afirmar sobre qual substância se refere (**FIGURAS 3.7 e 3.8**, p. 135 e 136). Os picos **1** e **2** apresentaram o *íon quasi molecular* $[M+H]^+$ com m/z igual a 229 que está de acordo com a fórmula molecular ($C_{14}O_3H_{12}$) das Xantiletina e Seselina. O pico **3** apresentou o *íon quasi molecular* $[M+H]^+$ com m/z igual a 245, referente à fórmula molecular ($C_{15}O_3H_{16}$) da Suberosina.

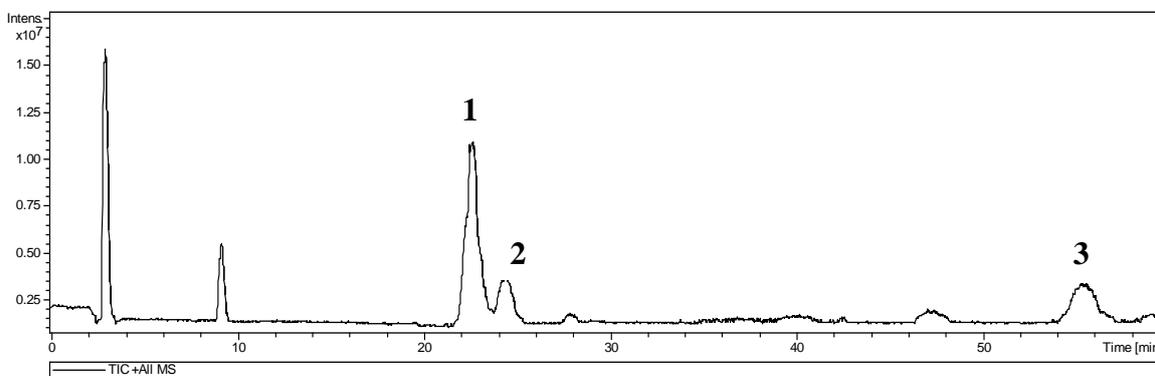


FIGURA 3.7: Cromatograma da reação de prenilação obtido por CLAE-MS.

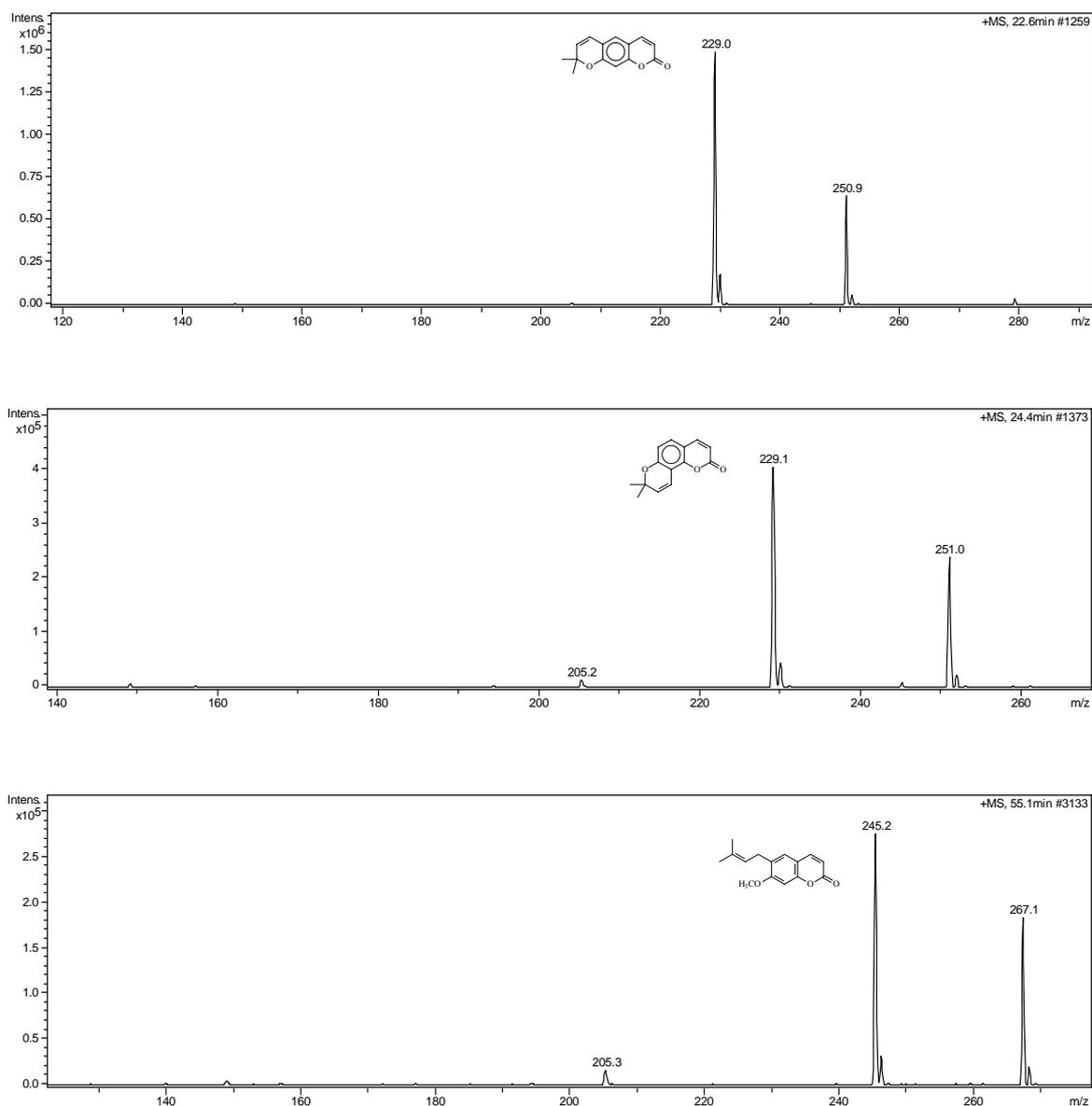


FIGURA 3.8: Fragmentogramas dos picos **1** (Xantiletina), **2** (Seselina) e **3** (Suberosina).

Os experimentos com os precursores umbeliferona e herniarina apresentaram formação dos produtos xantiletina e seselina, ou seja, as cumarinas com a prenila ciclizada, em uma proporção em relação ao branco de aproximadamente 20% (**FIGURA 3.9**, p. 137). Esse resultado indica que há no meio reacional a presença da enzima preniltransferase, e ainda, da

enzima ciclase. Dado este que justificaria a alta proporção das piranocumarinas encontradas nas raízes.

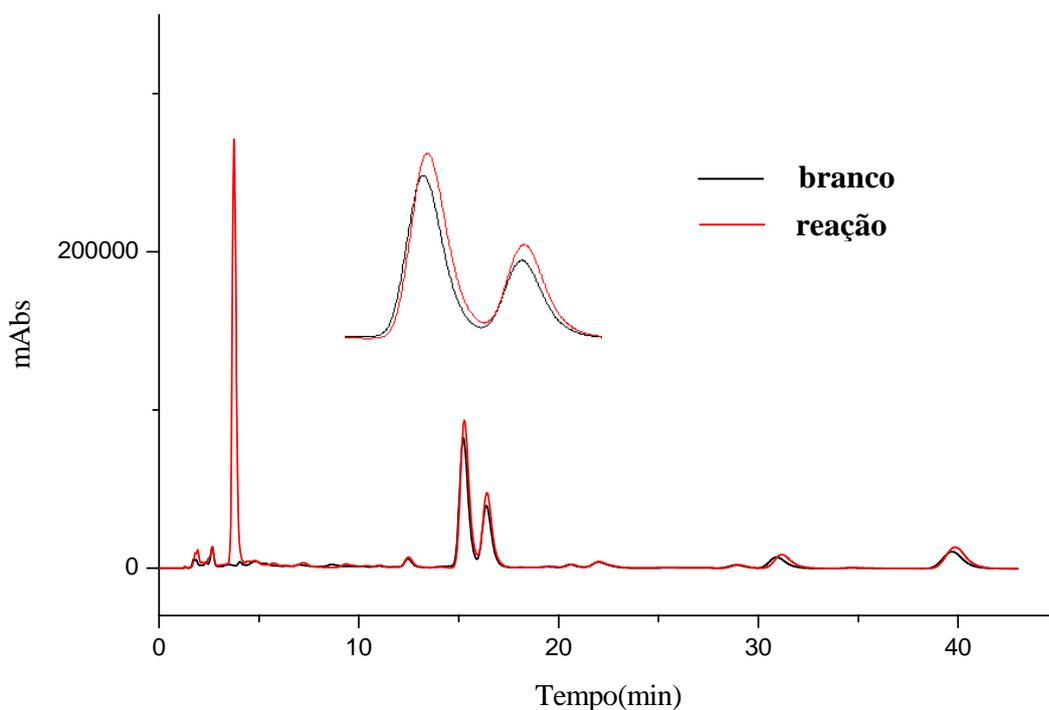


FIGURA 3.9: Cromatograma de uma reação de prenilação com precursor Umbeliferona e cofator $MgCl_2$ sobreposto ao branco.

Foram realizados outros experimentos variando o tempo de reação de 30 minutos para 1 hora, com o objetivo de verificar uma maior formação dos produtos formados e os resultados foram muito semelhantes. Em seguida procurou-se uma alternativa que foi de realizar os ensaios no período noturno, visto que há relatos (HAMERSKI, 1990; MORANDIM, 2005) de melhor atividade da enzima preniltransferase dentro deste período. Desta forma realizou-se ensaios nos horários de 19:00 / 23:00 / 3:00 e 6:00 horas.

A **FIGURA 3.10**, na página 138 mostra o resultado da reação de prenilação no horário de 23:00h, o qual foi o que apresentou maior expressão, com a formação das piranocumarinas em 15 e 16 minutos, numa proporção de

aproximadamente 100% em relação ao branco, e ainda foi possível observar em 41 minutos a formação da cumarina Suberosina, ou seja, o produto sem que houvesse a ciclização.

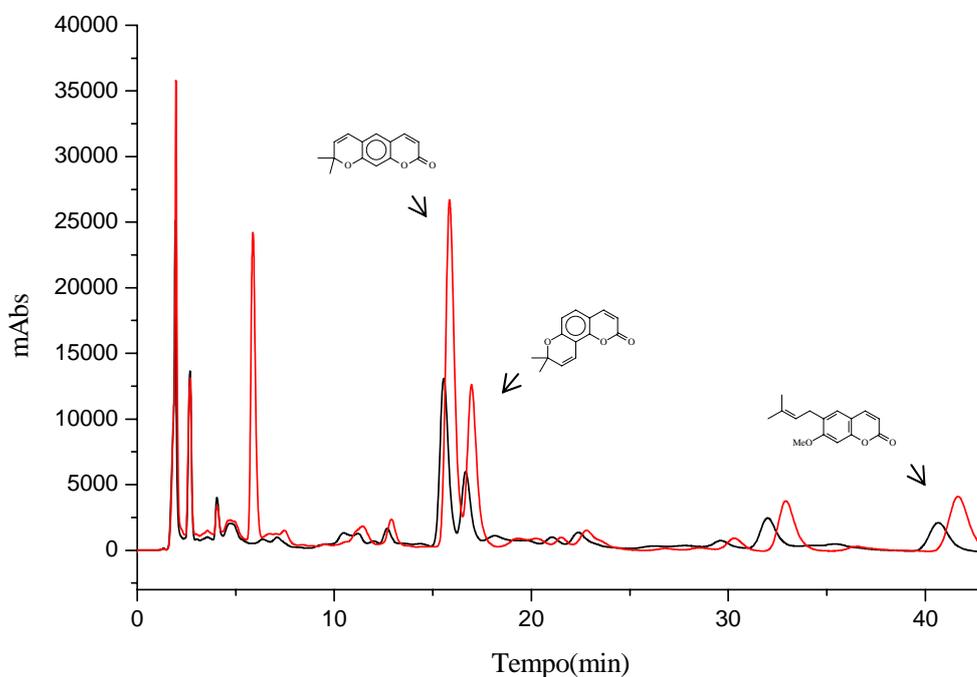


FIGURA 3.10: Cromatograma da reação de prenilação realizada às 23:00h, com precursor Herniarina e cofator MgCl₂ sobreposto ao branco.

Os resultados quando se utiliza a Umbeliferona ou a Herniarina como precursores, são bem semelhantes, porém o horário da reação para realização do ensaio é fundamental na atividade da enzima preniltransferase, como pode ser observado nos **GRAFICOS 3.1, 3.2 e 3.3**, nas páginas 139 e 140, quando se compara a formação das cumarinas com o precursor e o horário da reação. Os dados mostram também que o precursor Umbeliferona apresenta um resultado mais interessante, visto que tanto às 23:00h como 6:00h houve formação dos três produtos em uma proporção de aproximadamente 100%, com exceção para a formação da suberosina que às 6:00h sua porcentagem aumenta para 120%, e quando se utiliza a Herniarina como precursor, a variação na formação é sempre diminuída em

aproximadamente 20% no mínimo. Os valores de porcentagens de formação dos três produtos em relação ao horário da coleta são mostrados na **TABELA 3.2**, na página 140.

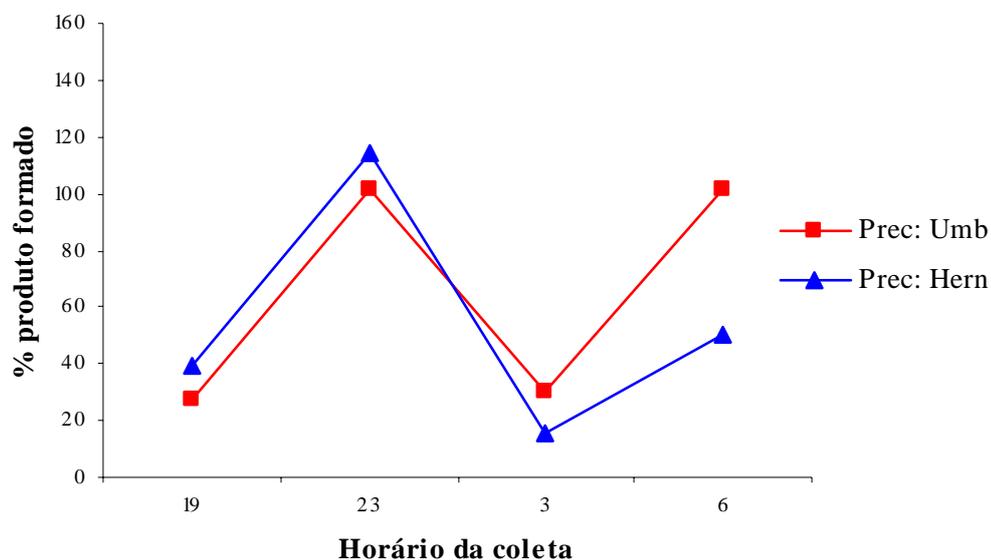


GRÁFICO 3.1: Comparação da formação da Xantiletina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

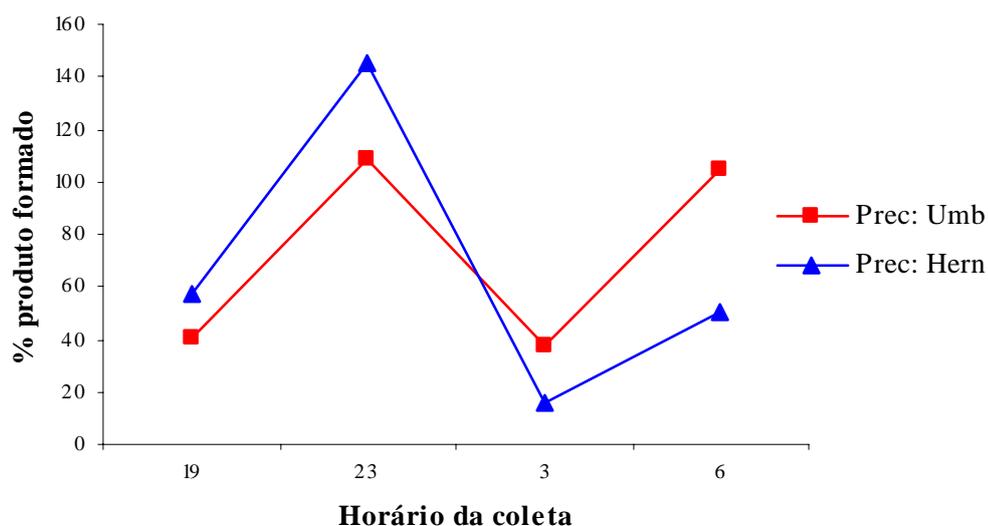


GRÁFICO 3.2: Comparação da formação da Seselina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

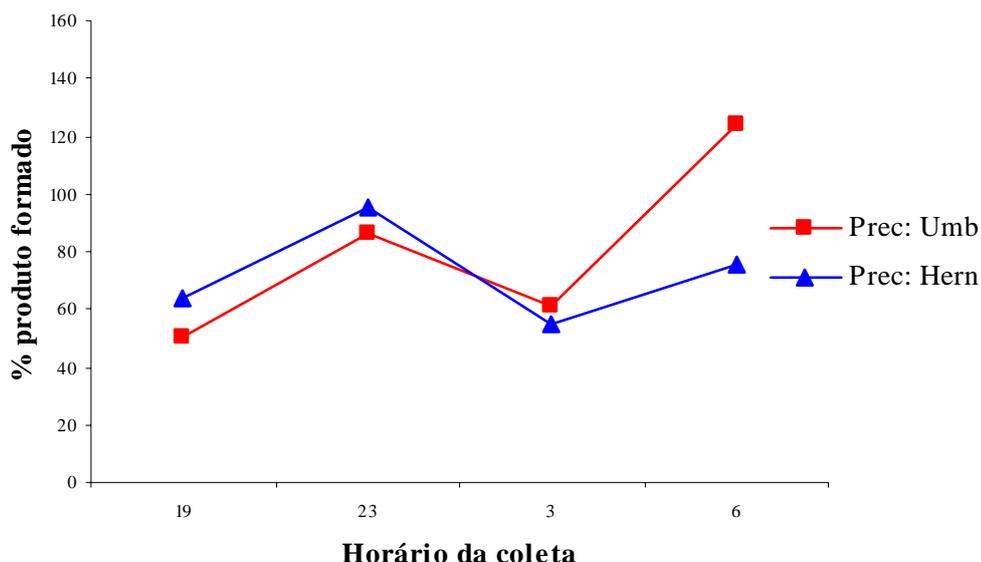


GRÁFICO 3.3: Comparação da formação da Suberosina com o horário de reação, utilizando a Umbeliferona e a Herniarina como precursores.

TABELA 3.2: Análise circadiana da formação dos produtos Xantiletina, Seselina e Suberosina com os precursores Umbeliferona e Herniarina.

Horário (h)	Xantiletina (Umb)(%)	Seselina (Umb)(%)	Suberosina (Umb)(%)	Xantiletina (Hern)(%)	Seselina (Hern)(%)	Suberosina (Hern)(%)
19:00	27,7	40,2	50,4	39,5	56,9	63,9
23:00	101,3	109,0	86,2	114,7	144,9	95,2
3:00	30,0	37,8	60,7	15,1	15,9	54,6
6:00	101,8	105,0	124,0	50,4	50,0	75,6

Todos os dados mostrados anteriormente foram de ensaios em que se utilizou o mesmo cofator $MgCl_2$. Partindo-se de dados (CORSINO, 2000) que relatam a atividade da enzima ciclase expressada pela utilização do $MgCl_2$ como cofator, porém sendo inativa quando se utiliza $MnCl_2$ como cofator. Desta forma, prosseguiu-se os ensaios com o $MnCl_2$ com o objetivo de se observar a formação apenas do produto suberosina e inibir da formação

dos produtos xantiletina e seselina, ou seja, inibindo a ciclase observar-se-ia apenas o produto com a prenila aberta, e assim os resultados apresentados estariam sendo apenas em relação à enzima preniltransferase, sem a atividade de uma outra enzima, como neste caso a ciclase. Os resultados (**GRÁFICO 3.4**, p. 141) mostraram que há uma certa inibição dos produtos ciclizados, porém não são totalmente inibidos.

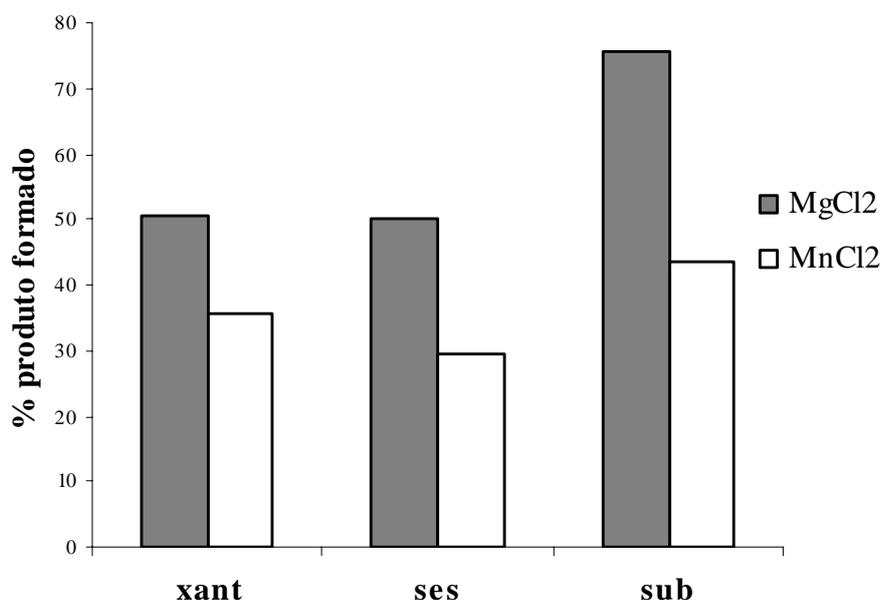


GRÁFICO 3.4: Comparação da formação da Xantiletina, Seselina e Suberosina com cofator MgCl₂ e MnCl₂, utilizando como precursor a herniarina.

Em seguida foram realizados ensaios com todas as partes da planta com o objetivo de verificar a ocorrência de compartimentalização da enzima preniltransferase em raízes, caule inferior e superior e folhas de plantas enxertadas (*C. sinensis* sobre *C. limonia*) (**FIGURAS 3.11-3.13**, p. 142 e 143).

Pode-se verificar que não houve formação dos produtos esperados nos ensaios com o caule inferior e superior e com as folhas, sugerindo que haja uma compartimentalização enzimática nas raízes.

Isso vem somar aos dados mencionados na introdução e confirmar que deve estar havendo a translocação de metabólitos prenilados das raízes para as folhas no enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, já que, se não há atividade da enzima responsável pela formação desses metabólitos prenilados (cumarinas) nas partes superiores do enxerto, essas cumarinas estão sendo metabolizadas nas raízes, onde há atividade da preniltransferase, e translocadas para as folhas.

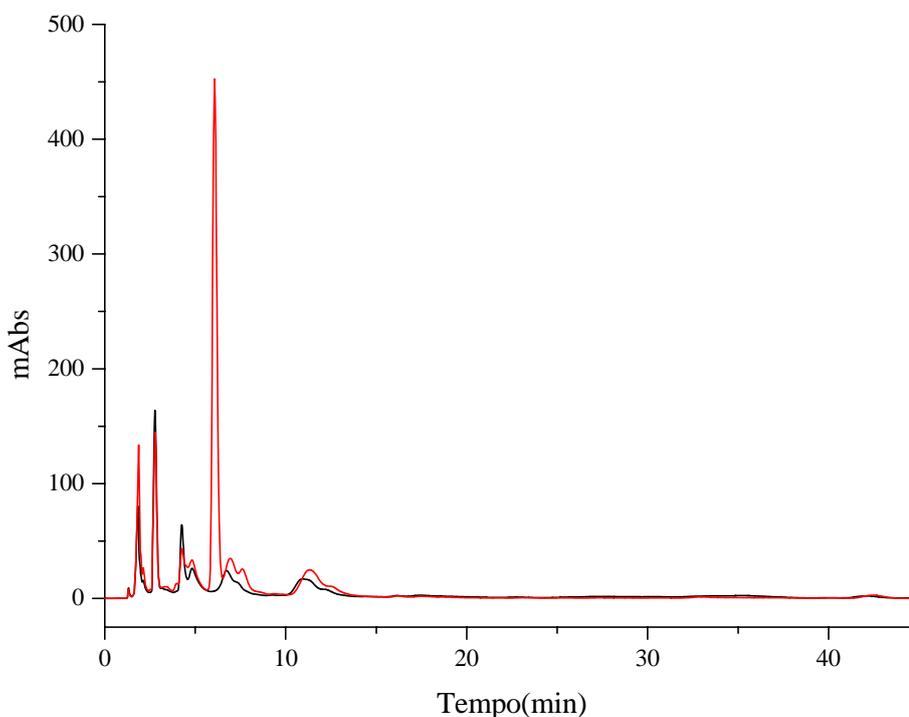


FIGURA 3.11: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule inferior sobreposto ao branco.

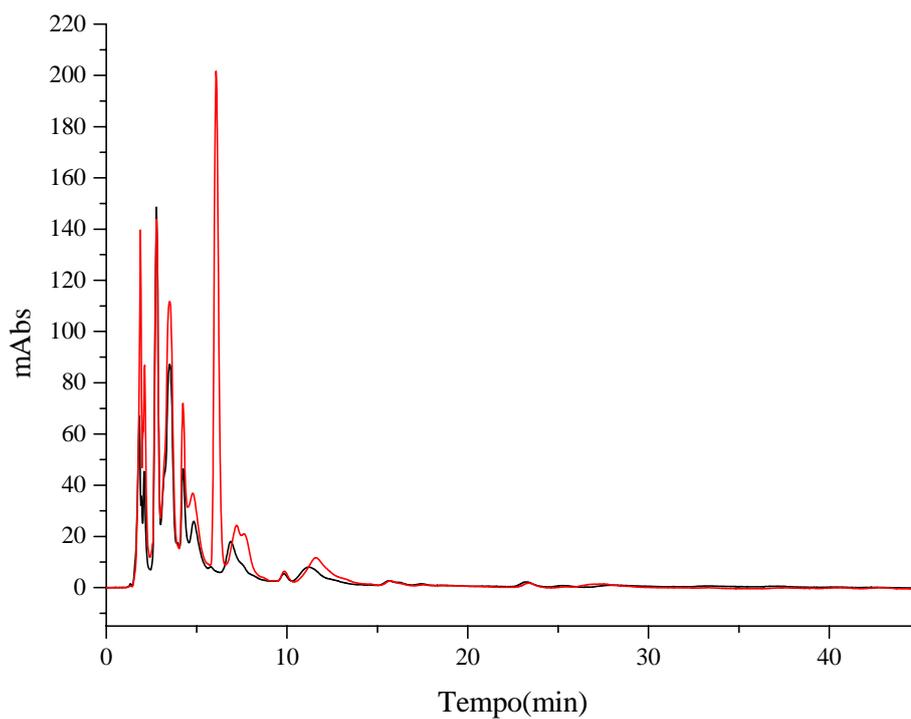


FIGURA 3.12: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático do caule superior sobreposto ao branco.

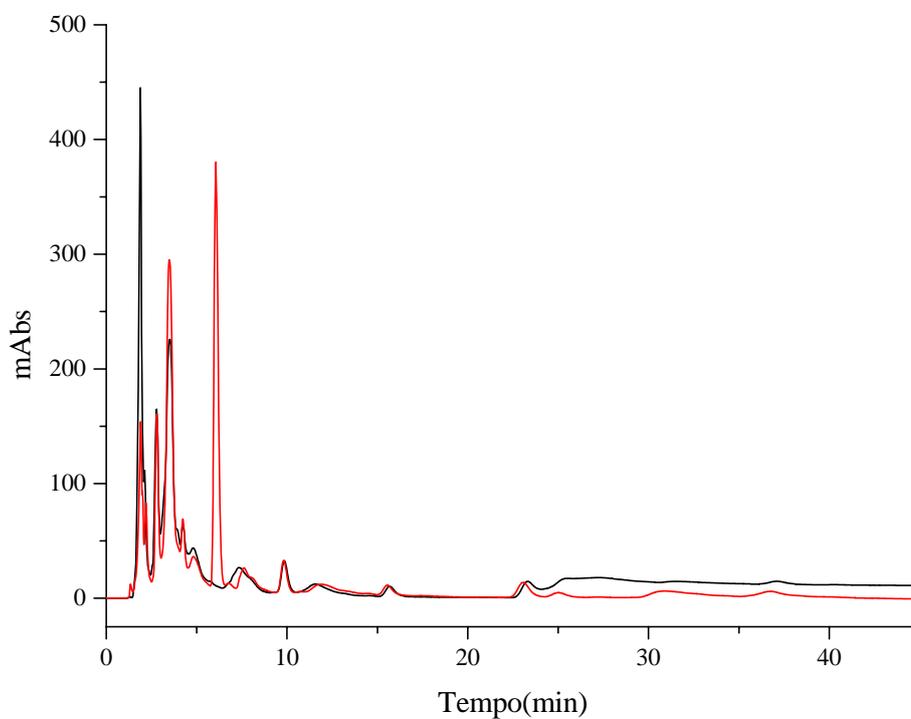


FIGURA 3.13: Cromatograma da reação de prenilação realizada com o extrato enzimático das folhas sobreposto ao branco.

3.2.1 – Dosagem protéica do extrato enzimático das raízes

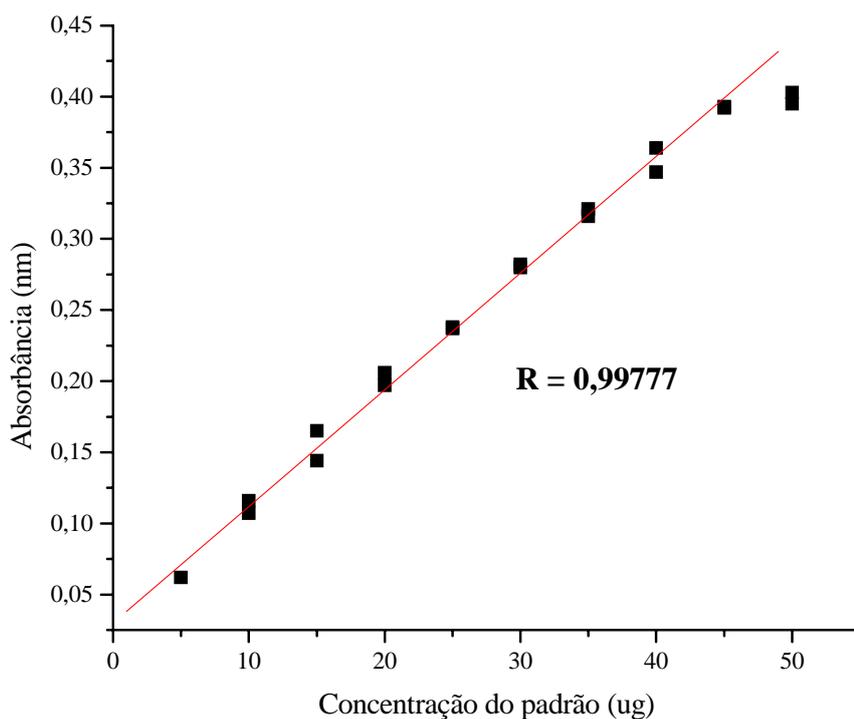
Utilizou-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976) para a determinação da concentração de proteína presente no extrato enzimático das diferentes partes da planta enxertada (*C. sinensis* sobre *C. limonia*). O teste foi realizado utilizando-se 50 µL da amostra, (800 – 50) µL de água e 200 µL do reagente Coomassie Blue. A solução foi agitada e transferida para uma cubeta de 1 cm e realizada a leitura da absorbância em 595 nm.

A determinação é realizada utilizando-se as medidas de absorções, obtidas em um espectrofotômetro no UV, de soluções em diferentes concentrações de ovoalbumina e traçado sua curva padrão. Primeiramente foi preparado uma solução em 0,50 mg/mL de ovoalbumina e em seguida a mesma foi diluída em diferentes concentrações. Suas absorções foram medidas em 595 nm.

Depois de obtido os valores de absorções, traçou-se uma curva padrão da absorbância pela concentração protéica (**GRAFICO 3.5**, p. 145). A partir da equação da reta obtida do gráfico, foram calculadas as concentrações dos extratos enzimáticos das raízes, caule inferior e superior e folhas da planta enxertada (**TABELA 3.3**, p. 145).

TABELA 3.3: Dados para determinação da curva padrão da ovoalbumina.

Ovoalbumina (μL)	Água (μL)	Concentração protéica (mg/mL)	Absorbância (nm)
0	50	0	0
5	45	0,05	0,0570
10	40	0,10	0,1115
15	35	0,15	0,1545
20	30	0,20	0,2015
25	25	0,25	0,2375
30	20	0,30	0,2810
35	15	0,35	0,3185
40	10	0,40	0,3555
45	5	0,45	0,3925
50	0	0,50	0,3990

**GRÁFICO 3.5:** Curva padrão da ovoalbumina.

A **TABELA 3.4**, na página 146 apresenta os valores de concentração protéica dos extratos enzimáticos das raízes, caule inferior e

superior e folhas da planta enxertada, obtidas a partir da equação da reta da curva padrão da ovoalbumina.

TABELA 3.4: Concentrações de proteínas dos extratos enzimáticos da planta enxertada.

Extrato	Volume de amostra (µL)	Volume de água (µL)	Absorbância (nm)	Concentração protéica (µg/mL)
Raiz	50	50	0,0706	4,97
Caule inferior	50	50	0,0523	2,74
Caule superior	50	50	0,1166	10,77
Folhas	50	50	0,2250	23,77

* as medidas foram feitas em duplicata.

3.2.2 – Eletroforese em Gel

Após avaliada a dosagem protéica dos extratos enzimáticos, os mesmos foram aplicados em gel de poliacrilamida junto com padrões que continham enzimas de pesos moleculares conhecidos como a fosforilase b (97.4000 daltons), albumina sérica (66.200) e inibidora de tripsina (21.500).

O gel foi colocado em cuba para eletroforese e aplicado uma corrente de 20 mA e uma voltagem de 120 V até que as amostras atingissem o final do gel. Em seguida foi submetido a revelação sob agitação segundo a seqüência mostrada a seguir:

- 1 – Fixação com ácido tricloroacético por pelo menos 1 h, descartar;
- 2 – Lavar 1 vez com água deionizada por 15 a 30 minutos, descartar;
- 3 – Redução com DTT por 30 minutos, descartar;

- 4 – Adicionar AgNO_3 por 15 a 30 minutos, descartar;
- 5 – Lavar 2 vezes com água por 5 a 1 minutos;
- 6 – Revelar com Na_2CO_3 e formaldeído adicionando 3 vezes: 10-30 seg / 1-2 min e 5-10 min
- 7 – Adicionar ácido cítrico por no mínimo 5 minutos;
- 8 – Lavar com água.

Depois de revelado o gel (**FIGURA 3.14**, p. 147), observa-se bandas presentes, e comparando com os padrões é possível estimar aproximadamente o peso molecular enzima preniltransferase presente no extrato das raízes com sendo entre 97400 - 66200 daltons.

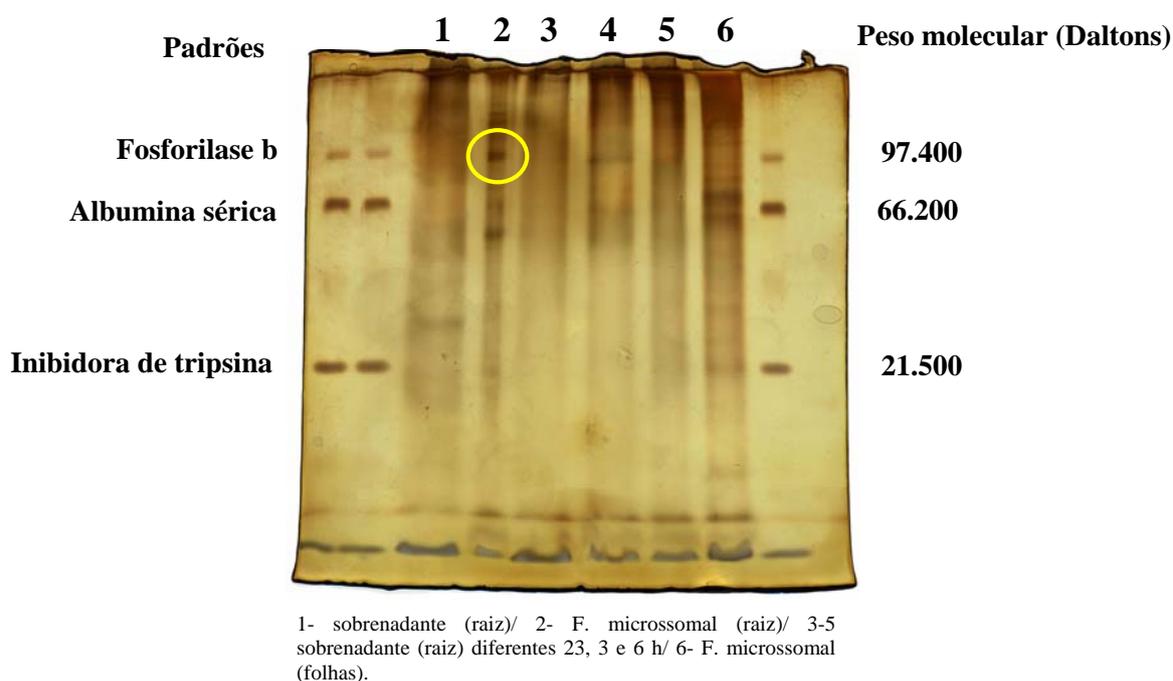


FIGURA 3.14: Eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos das raízes e folhas.

3.2.3 – Quantificação dos produtos da reação de prenilação

Após avaliada a formação dos três produtos formados a partir da reação de prenilação às 23:00 h, o passo seguinte foi quantificá-los e para tal foram feitas as curvas de calibrações para cada um dos três produtos prenilados, as cumarinas Xantiletina, Seselina e Suberosina. As curvas de calibrações foram obtidas a partir de concentrações de 60 / 40 / 20 / 10 / 5 / 3 e 1 µg/mL para as cumarinas Xantiletina e Seselina, e de 40 / 20 / 10 / 5 / 1 e 0,5 µg/mL para a Suberosina. Cada uma das concentrações foi feita em triplicata (**GRÁFICOS 3.6-3.8**, nas páginas 148 e 149).

Por meio das curvas de calibrações foi possível determinar as concentrações de cada uma das três cumarinas produzidas na reação de prenilação. Na **TABELA 3.5**, na página 149, são mostrados os valores da Xantiletina, Seselina e Suberosina produzidas pela reação de prenilação com extrato enzimático das raízes da planta enxertada, utilizando como precursores a Umbeliferona e a Herniarina, como cofator a MgCl₂, no horário de 23:00h.

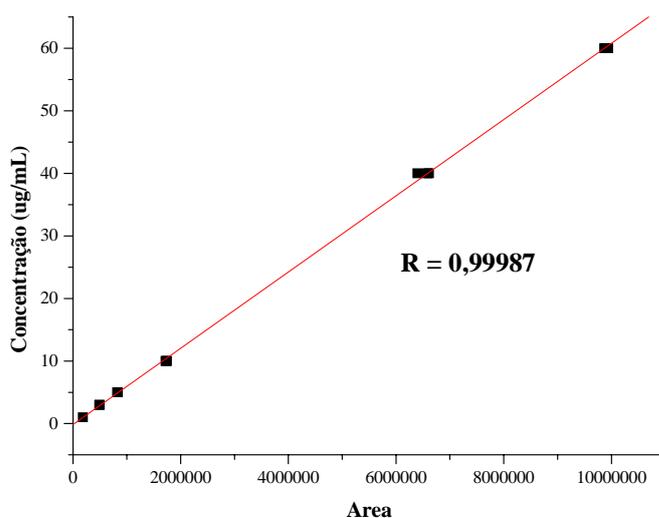


GRÁFICO 3.6: Curva de calibração da Xantiletina.

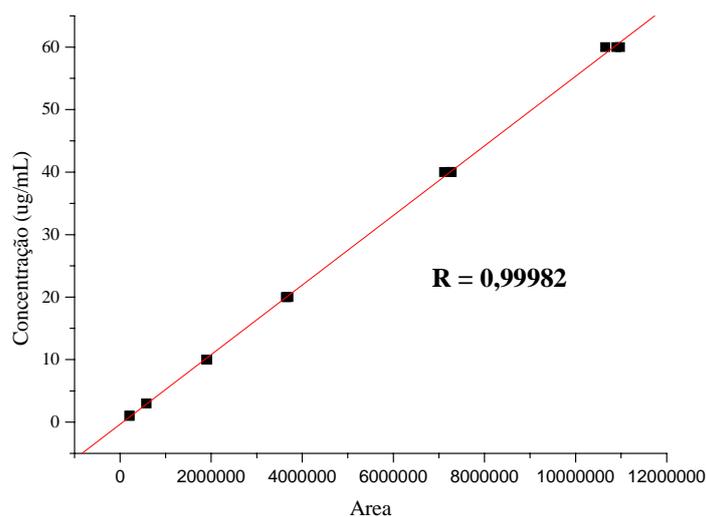


GRÁFICO 3.7: Curva de calibração da Seselina.

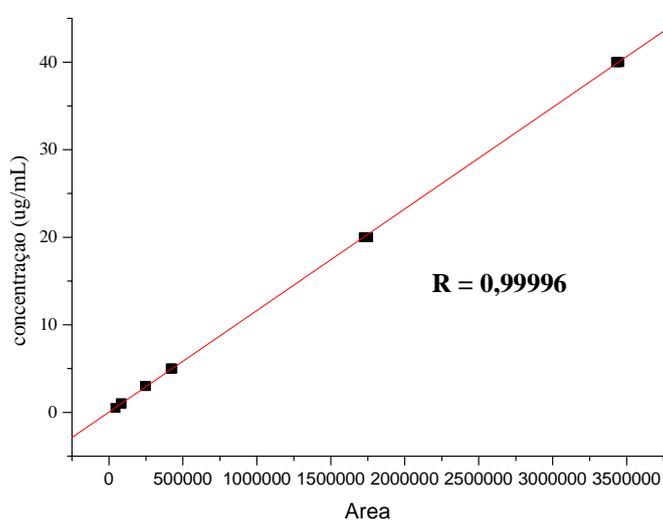


GRÁFICO 3.8: Curva de calibração da Suberosina.

TABELA 3.5: Concentrações dos produtos da reação de prenilação.

Precursor	Xantiletina ($\mu\text{g/mL}$)	Seselina ($\mu\text{g/mL}$)	Suberosina ($\mu\text{g/mL}$)
Umbeliferona	2,40	1,15	0,71
Herniarina	2,71	1,53	0,78

Pode-se observar que a quantidade de um dos produtos formados a partir da reação de prenilação realizada às 23:00 h, a piranocumarina Xantiletina é mais expressiva do que a Seselina e a Suberosina, o que está de

acordo com os dados fitoquímicos obtidos, que mostram uma maioria desta mesma em relação às outras. Com isso observa-se que além da Xantiletina estar em maior quantidade na planta (dados fitoquímicos) em relação aos outros metabólitos, também é produzida em maior quantidade pela reação enzimática com a preniltransferase.

3.2.4 – Experimento de incorporação de IPP-¹⁴C

Foi realizada a incorporação *in vivo* do pirofosfato de isopentenila [IPP-1-¹⁴C] administrado nas raízes da planta enxertada de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (**FIGURA 3.15**, p. 150) com o objetivo de se confirmar a translocação das piranocumarinas avaliadas nos ensaios enzimáticos com a preniltransferase.

Essa confirmação é feita encontrando nas raízes e nas folhas a piranocumarina xantiletina com a marcação do ¹⁴C, visto que nas folhas não há atividade da enzima preniltransferase e se a mesma estiver marcada neste órgão, então conclui-se que teria sido translocada.

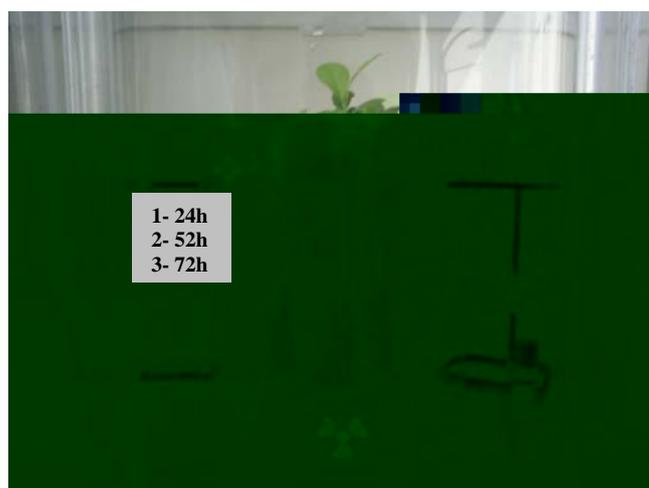


FIGURA 3.15: Foto do experimento de incorporação do IPP-¹⁴C nas raízes do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia*.

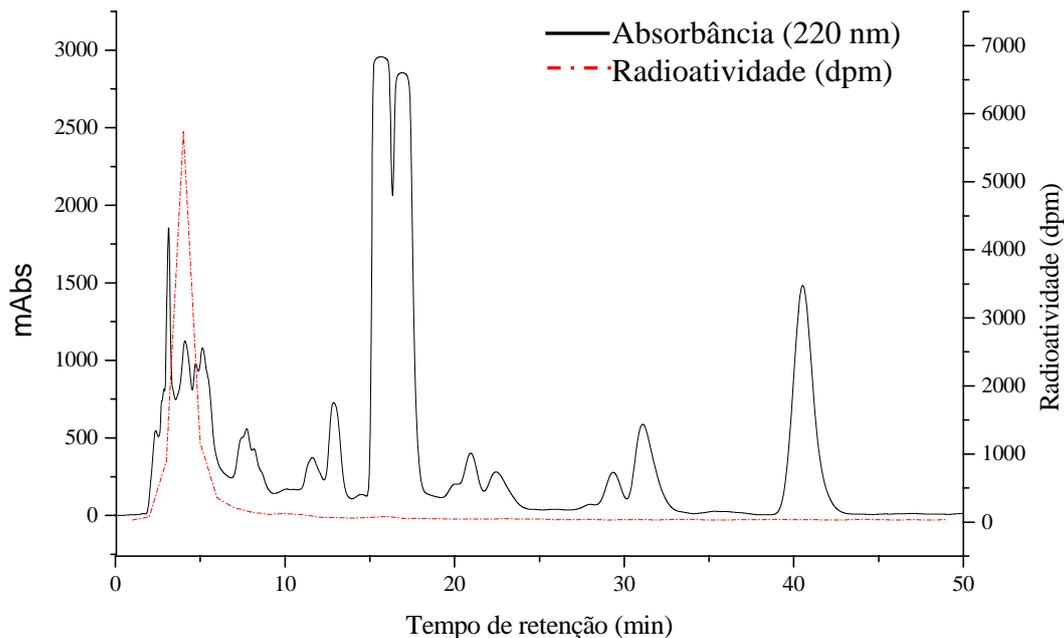


GRÁFICO 3.9: Incorporação do IPP-¹⁴C obtido do extrato das raízes após 52 h.

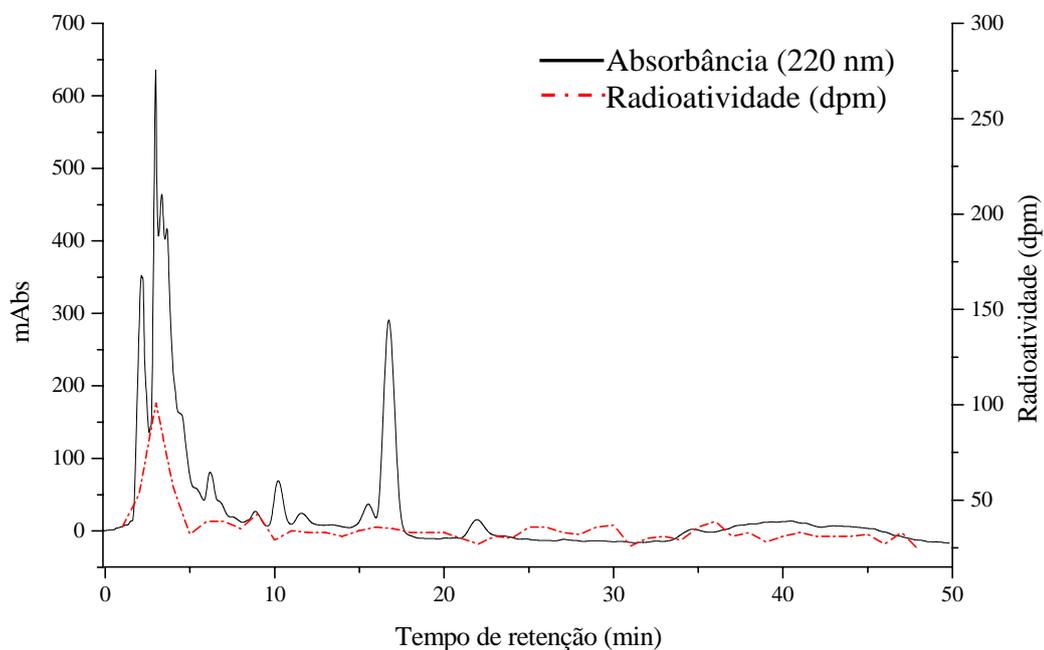


GRÁFICO 3.10: Incorporação do IPP-¹⁴C obtido do extrato das folhas após 52 h.

Os resultados mostrados foram realizados com as raízes e folhas com 52 h de metabolização e mostram que houve absorção do radioisótopo pela planta. Isso pode ser visto nos gráficos **GRÁFICOS 3.9** e **3.10**, na página 151, que houve leitura de radioatividade nas raízes e folhas, mas o reagente radiativo eluiu da coluna no volume morto (entre 3-5 min), caracterizando que ele foi absorvido, porém a planta não conseguiu metabolizá-lo para formação da piranocumarina. Com isto, infelizmente não foi possível confirmar se a enzima encontra-se ativa apenas nas raízes. Contudo, este experimento será otimizado e concluído por um segundo aluno do grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

CAPÍTULO 4

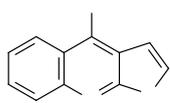
4 - ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Nycticalanthus speciosus*

Nycticalanthus speciosus

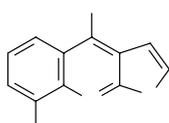
Nycticalanthus

Nycticalanthus speciosus

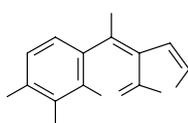
Nycticalanthus speciosus



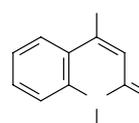
Dictamina



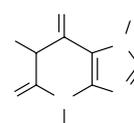
γ-Fagarina



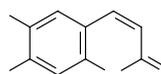
Esquimianina



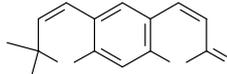
4-metoxi-2-quinolona



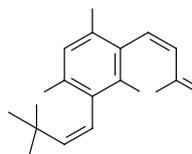
Cafeína



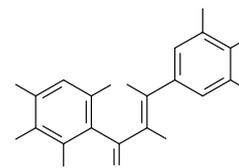
Escopoletina



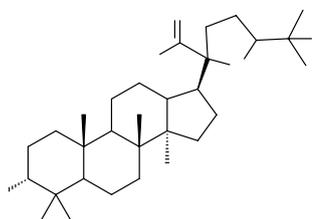
Xantiletina



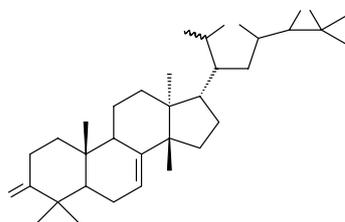
5-metoxiseselina



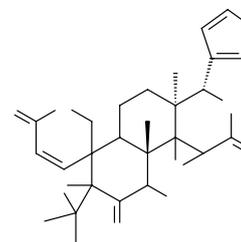
3',4',5',3,5,6,7-metoxiflavona



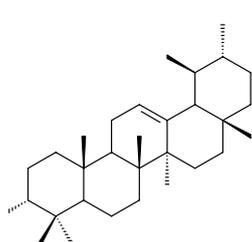
25-hidroxi-21-carboxi-3-octilonol



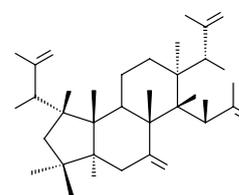
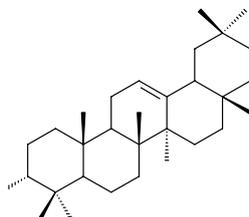
α,β-melianona



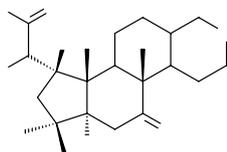
4,5-14,15-diepoxi-6-oxo-ichangino



α. e β-amirina



**2-acetoxi-6-desoxi-7-oxo-17-carboxi-
21,22,23-trinorciclocalamino**



QUADRO 4.1

Nycticalanthus speciosus

Nycticalanthus speciosus

•

•

•

μ

•

•

•

μ φ

•

•

•

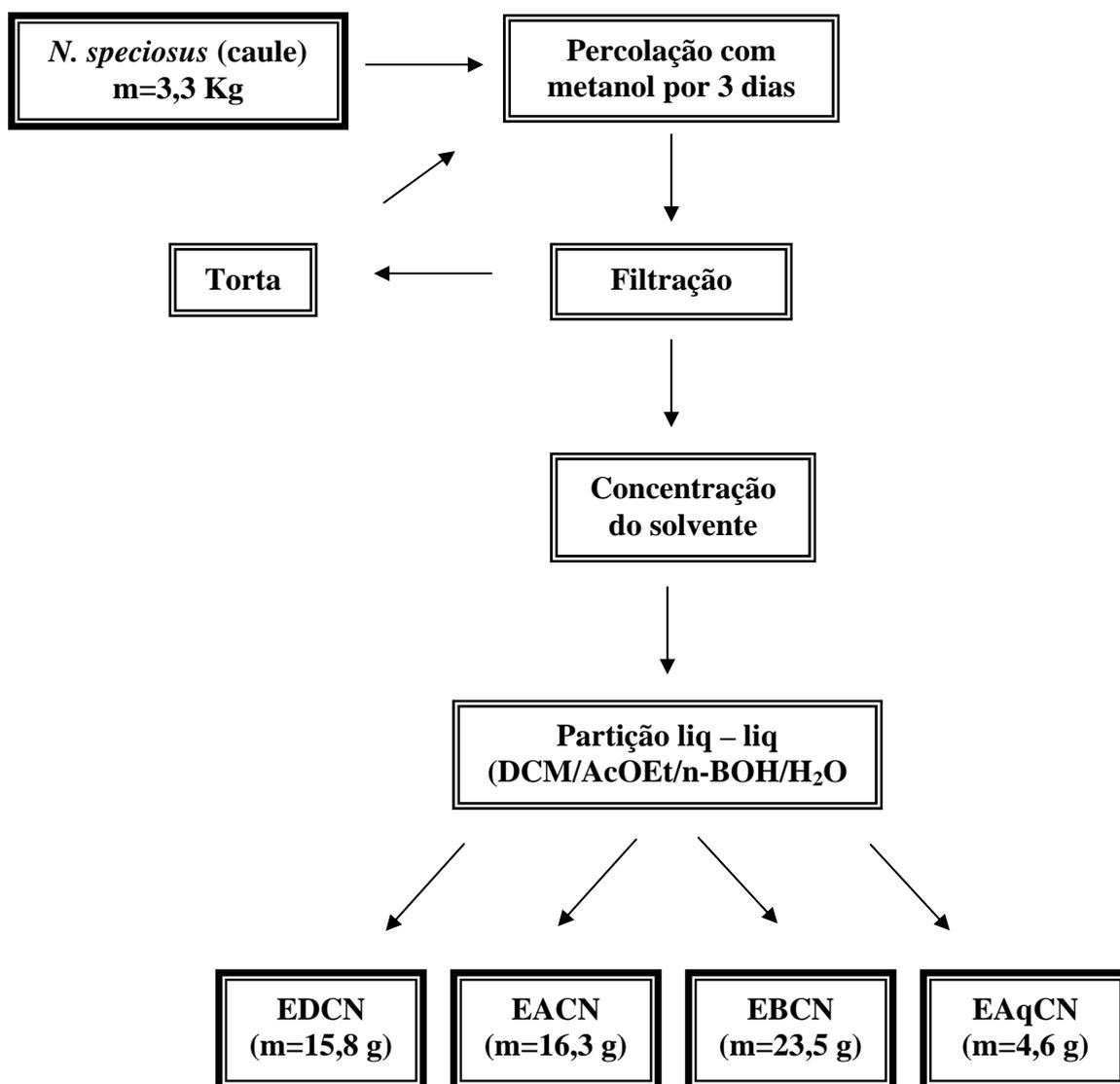
•

Nycticalanthus speciosus

N. speciosus

ESQUEMA 4.1

N. speciosus



ESQUEMA 4.1:

N.

speciosus

N. speciosus

FH FD FA FM

FA

A.31

A.31.66

A.31.71

A.31.71.3

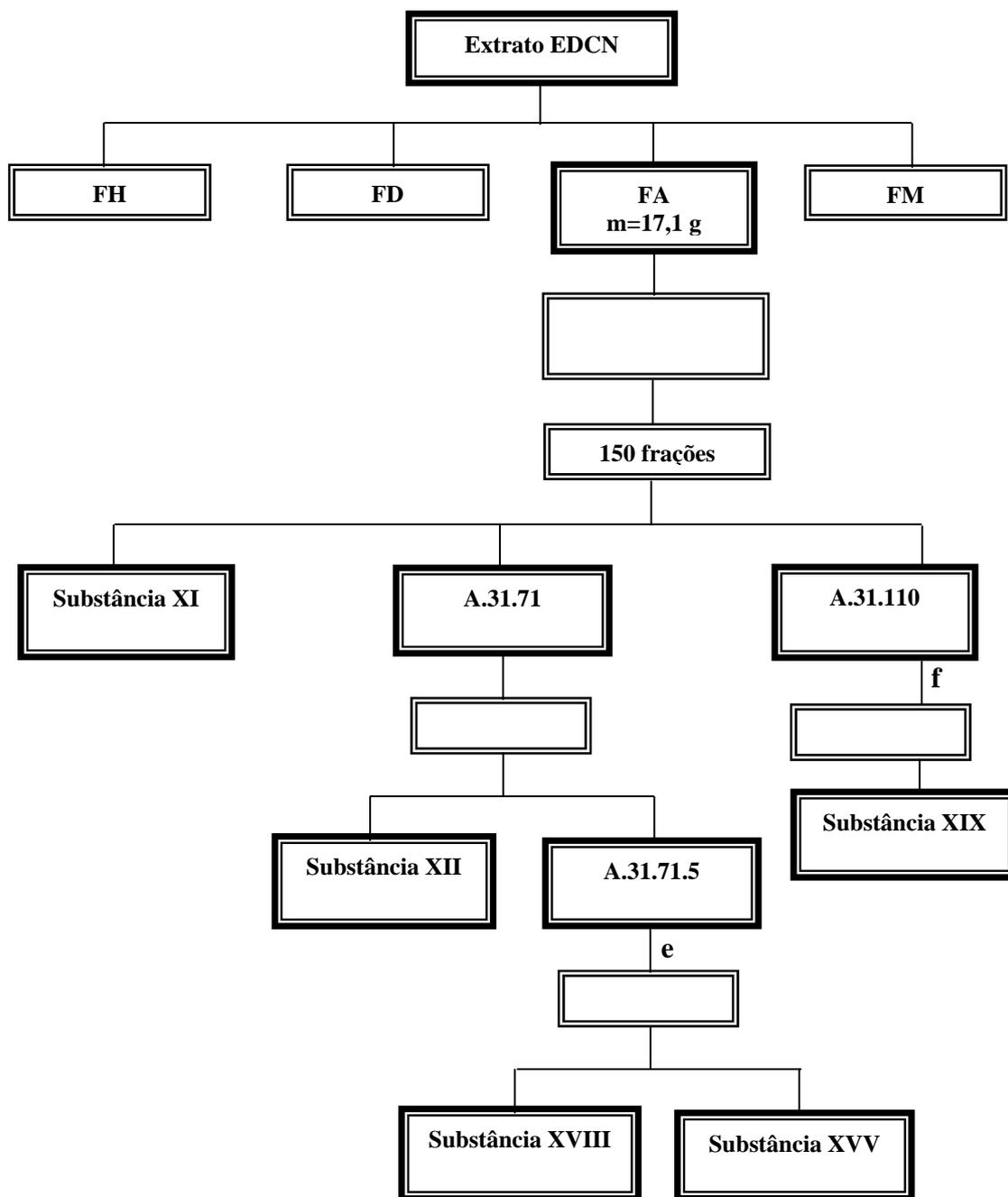
A.31.71.5

A.31.71.5.2 A.31.71.5.3

A.31.110

A.31.110.4

ESQUEMA 4.2



ESQUEMA 4.2

N. speciosus

B.4

B.4.20

B.4.20.2

B.8

B.8.29

B.8.29.1 B.8.29.3

B.9

B.9.2

B.9.11

B.15

B.15.3

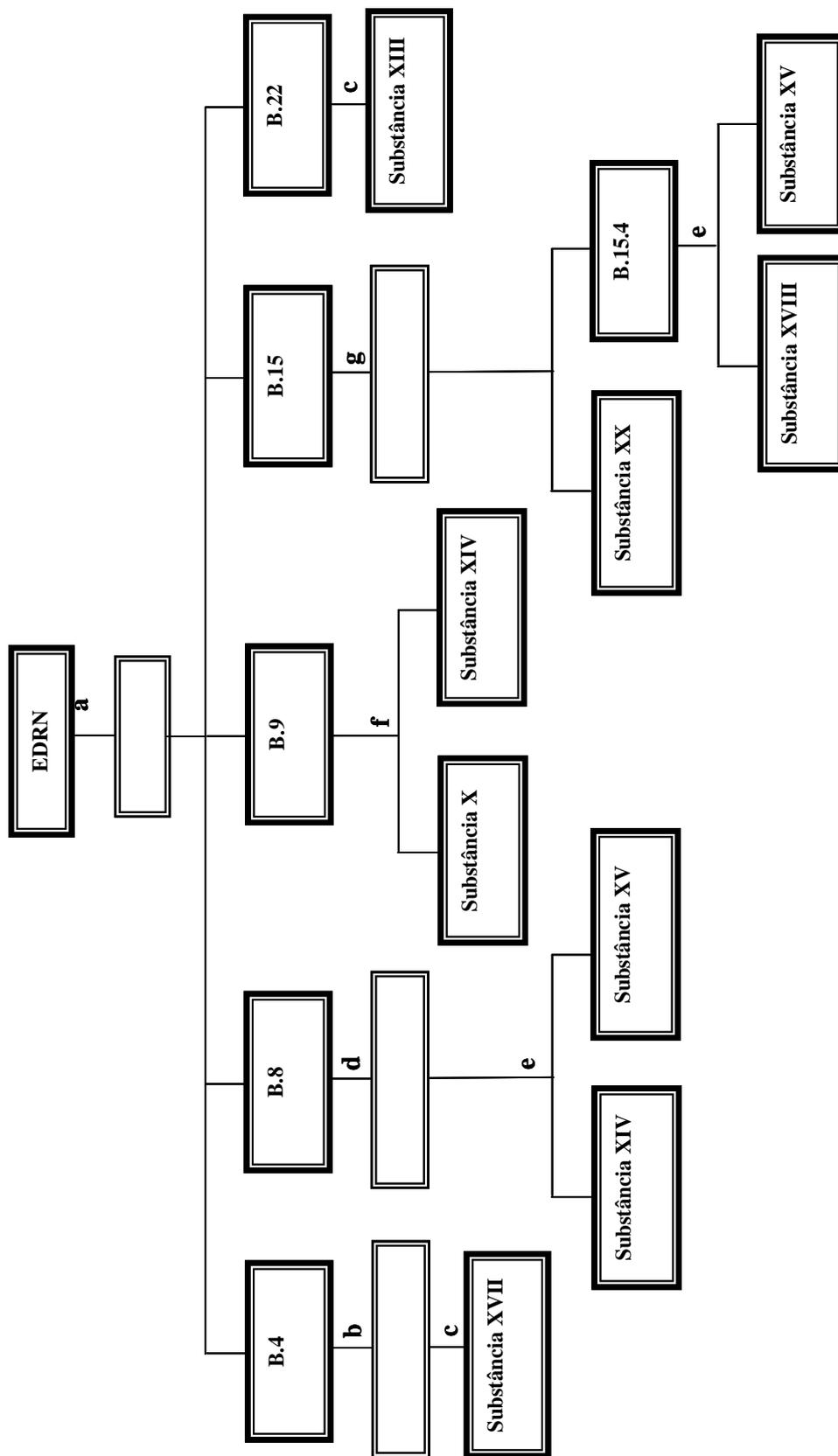
B.15.4

B.15.4.2 B.15.4.5

B.22

B.22.2

ESQUEMA 4.3



ESQUEMA 4.3

speciosus

Nycticalanthus

FIGURA 4.1

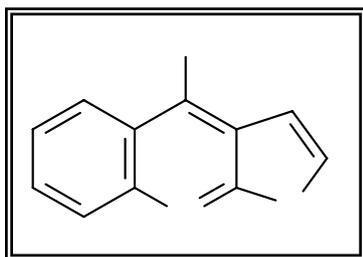
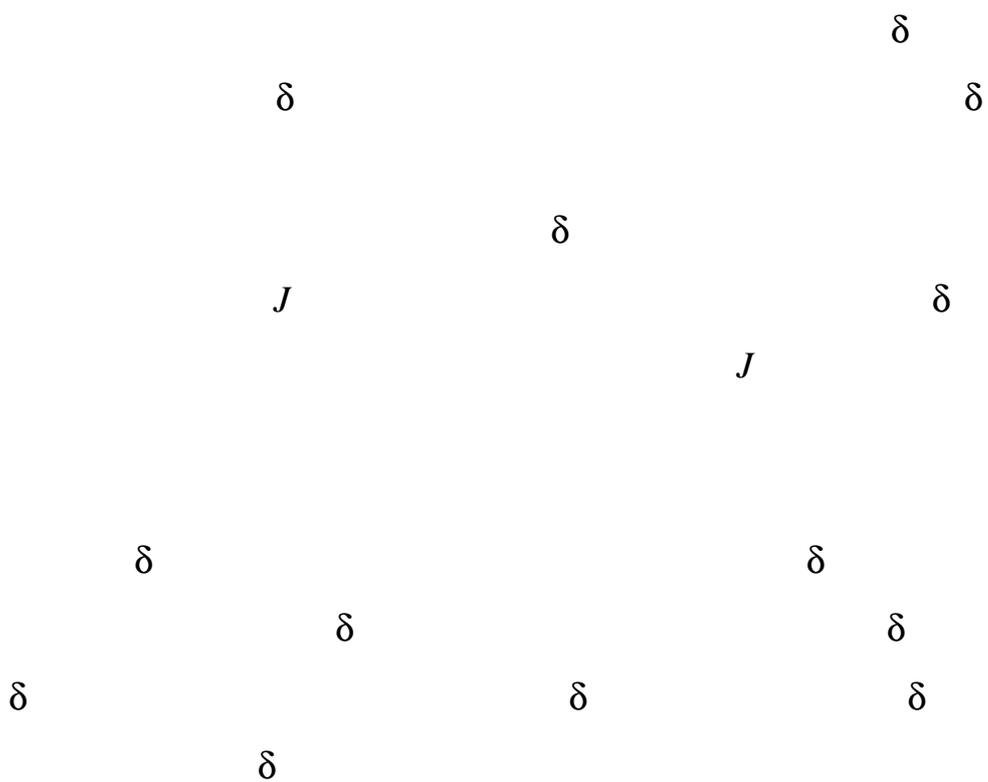


FIGURA 4.1

FIGURA 4.2

δ
J
 δ

FIGURA 4.3



TABELAS 4.1 4.2

δ

δ

FIGURA 4.4

DICTAMINA

TABELA 4.1

Hidrogênio	Dictamina isolada	Dictamina (literatura)
	<i>dl</i>	<i>ddd</i>
	<i>ddd</i>	<i>ddd</i>
	<i>ddd</i>	<i>ddd</i>
	<i>dl</i>	<i>ddd</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.2

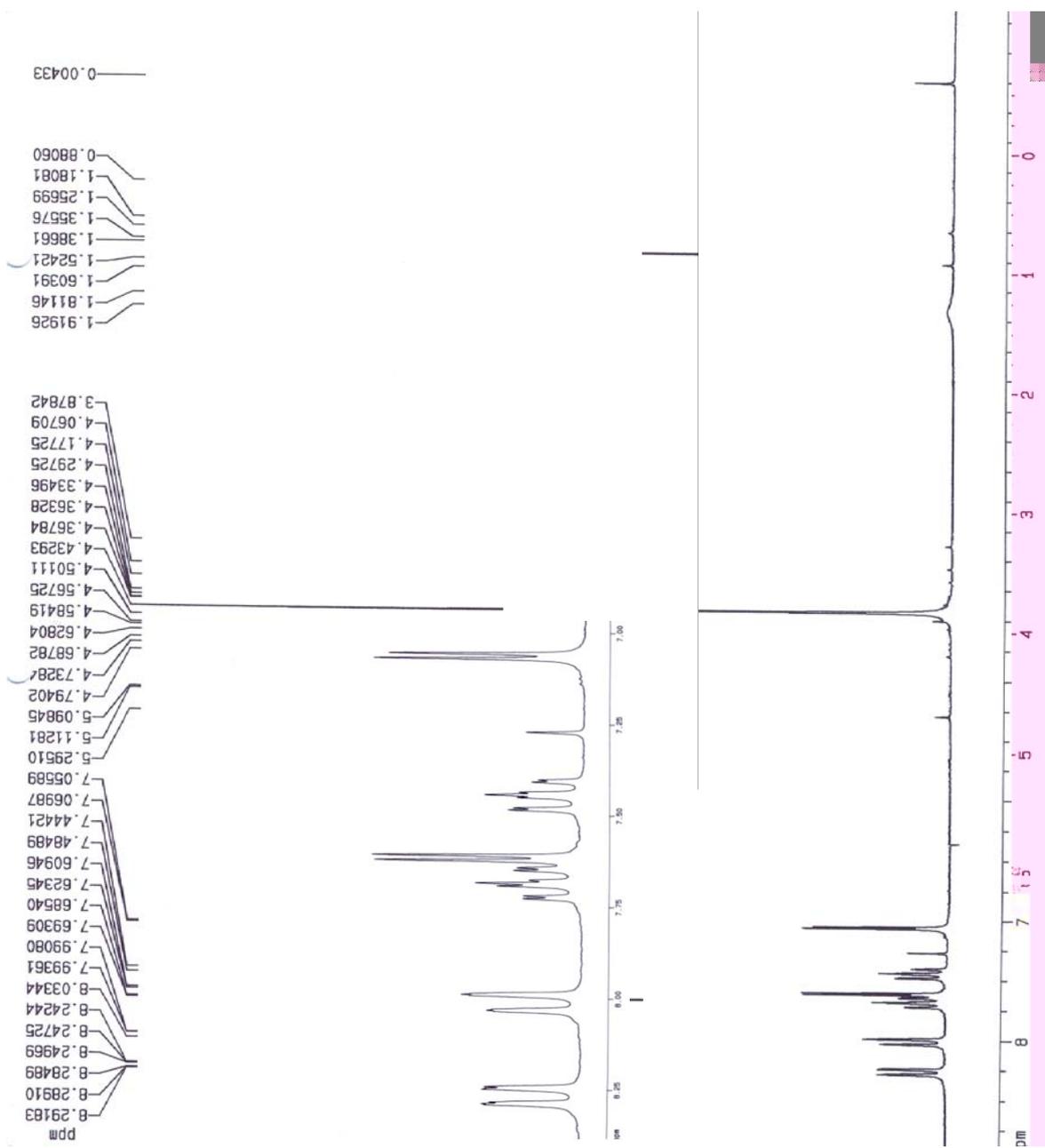


FIGURA 4.2:

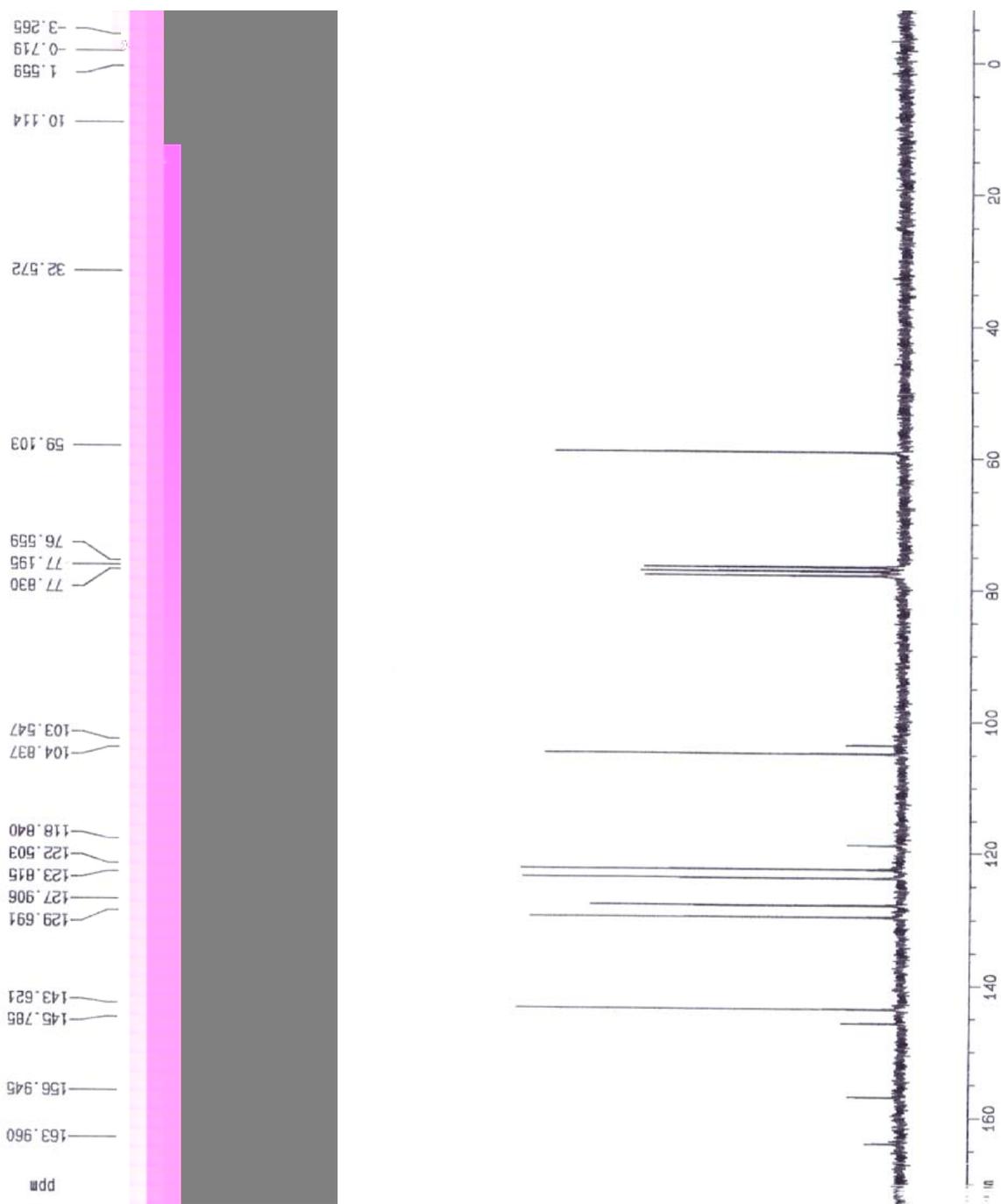


FIGURA 4.3:

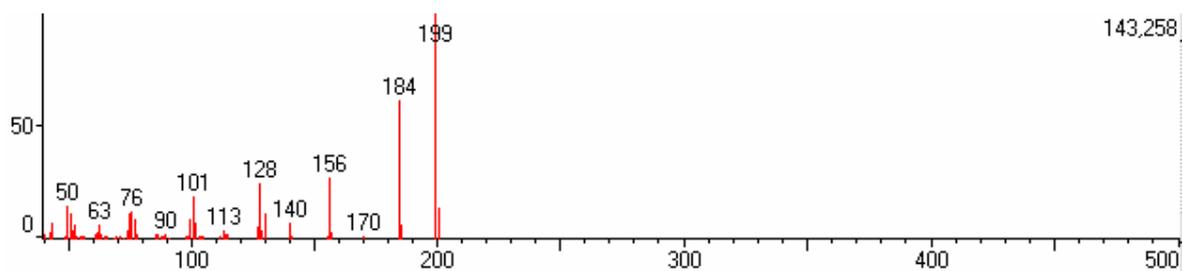


FIGURA 4.4

γ

FIGURA 4.5

γ

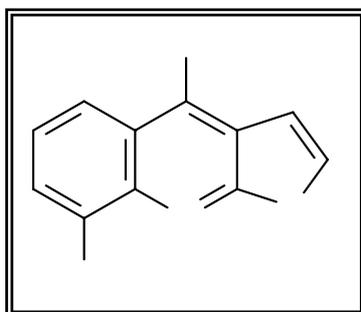


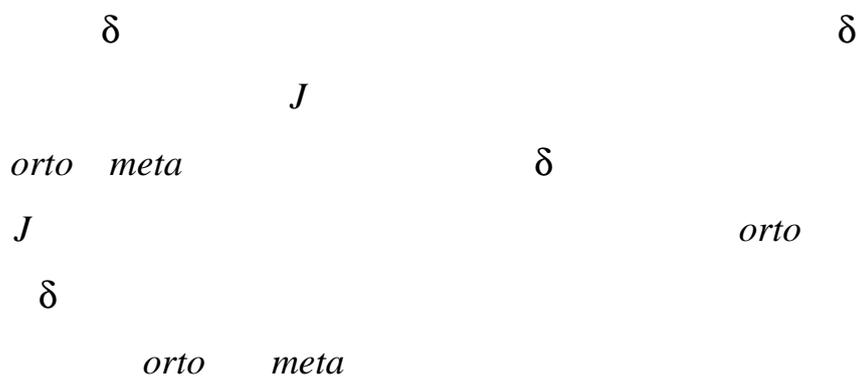
FIGURA 4.5

γ

FIGURA 4.6

δ

J



TABELAS

4.3 4.4

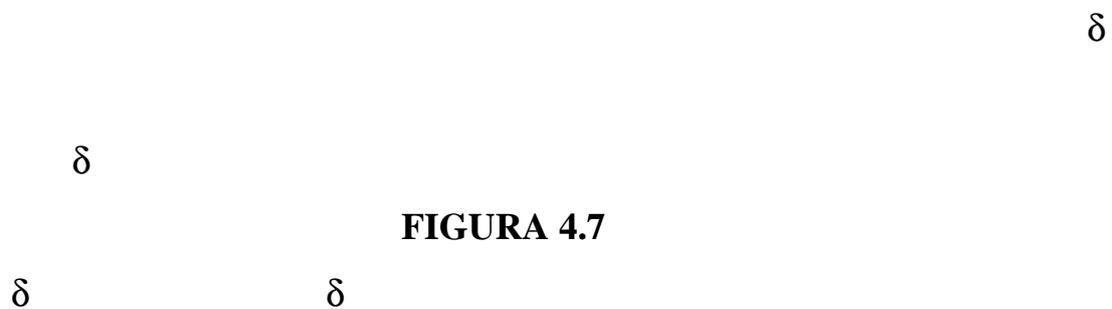


FIGURA 4.7

γ
FIGURA 4.8

γ -FAGARINA

TABELA 4.3

 γ

Hidrogênio	γ -fagarina isolada	γ -Fagarina (literatura)
	<i>dd</i>	<i>dl</i>
	<i>dd</i>	<i>ddd</i>
	<i>dd</i>	<i>dl</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.4

 γ

	γ
--	----------

 δ

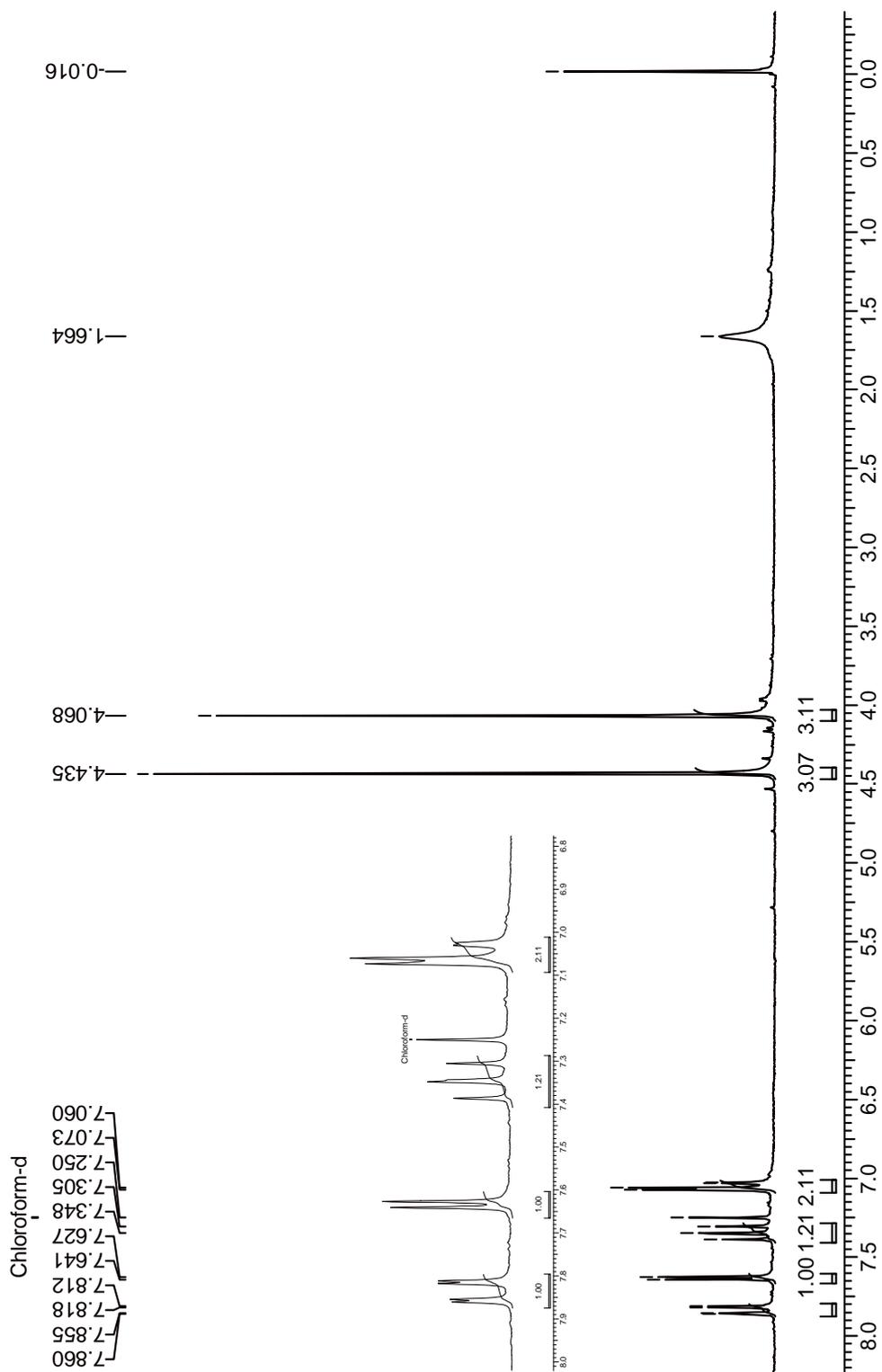


FIGURA 4.6:

γ

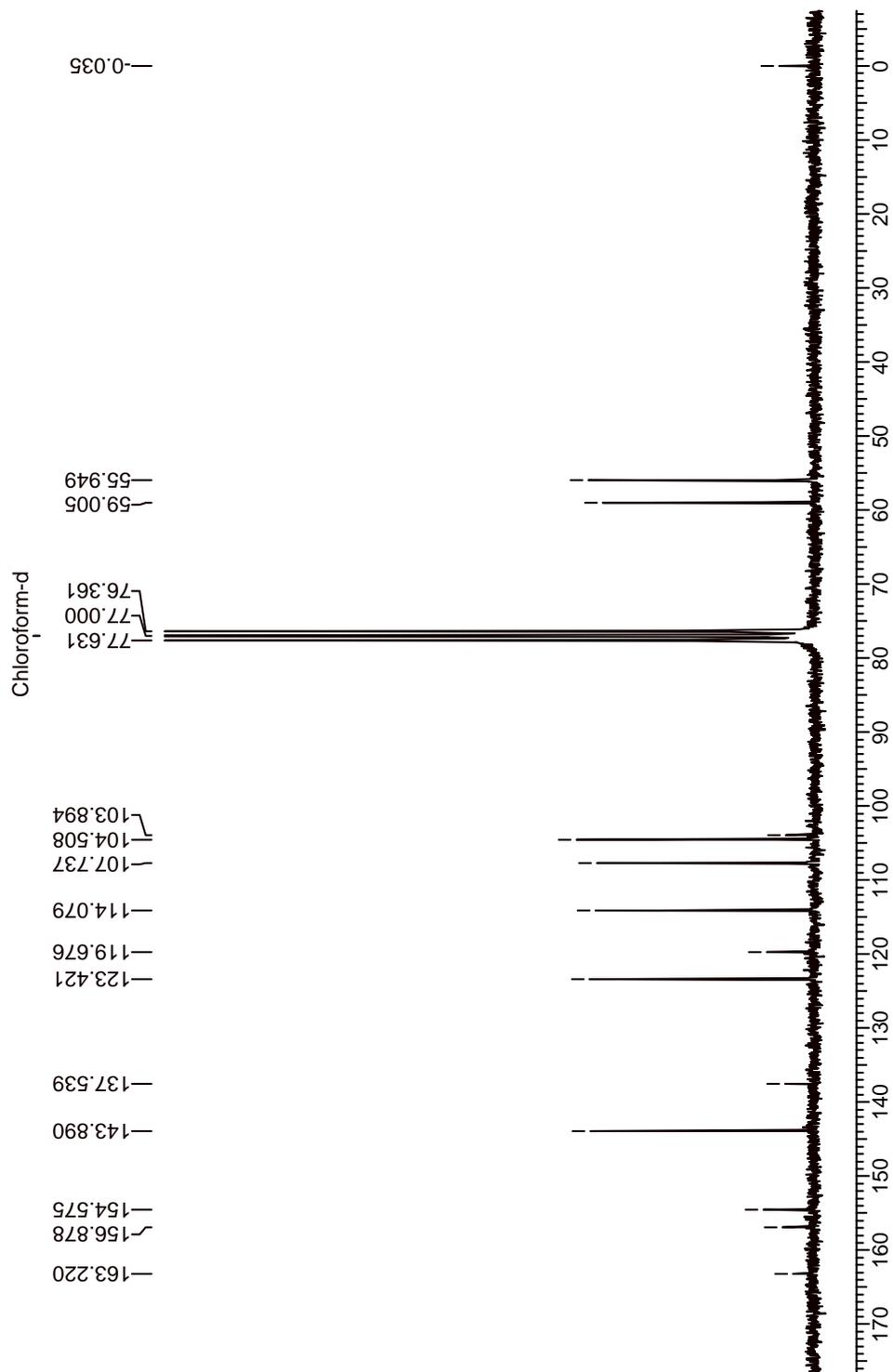


FIGURA 4.7:

γ

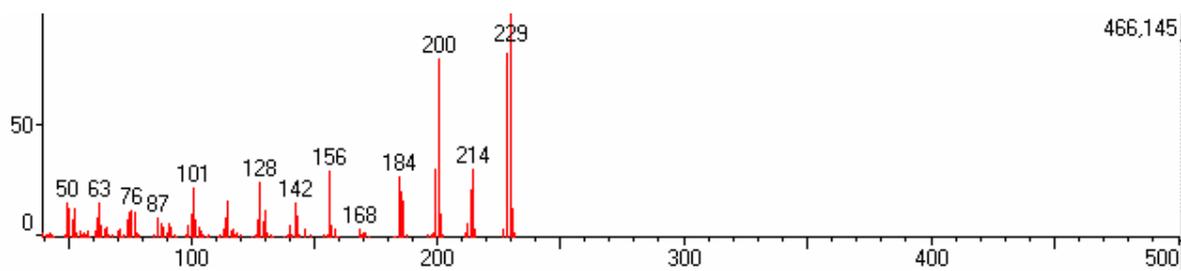


FIGURA 4.8

γ

FIGURA 4.9

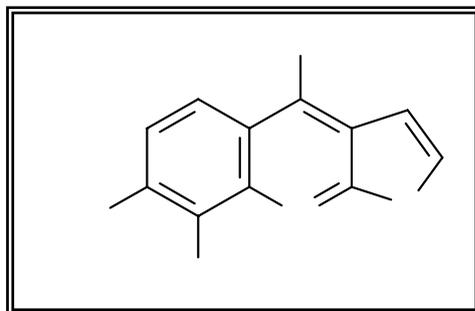


FIGURA 4.9

FIGURA 4.10

γ

δ

J

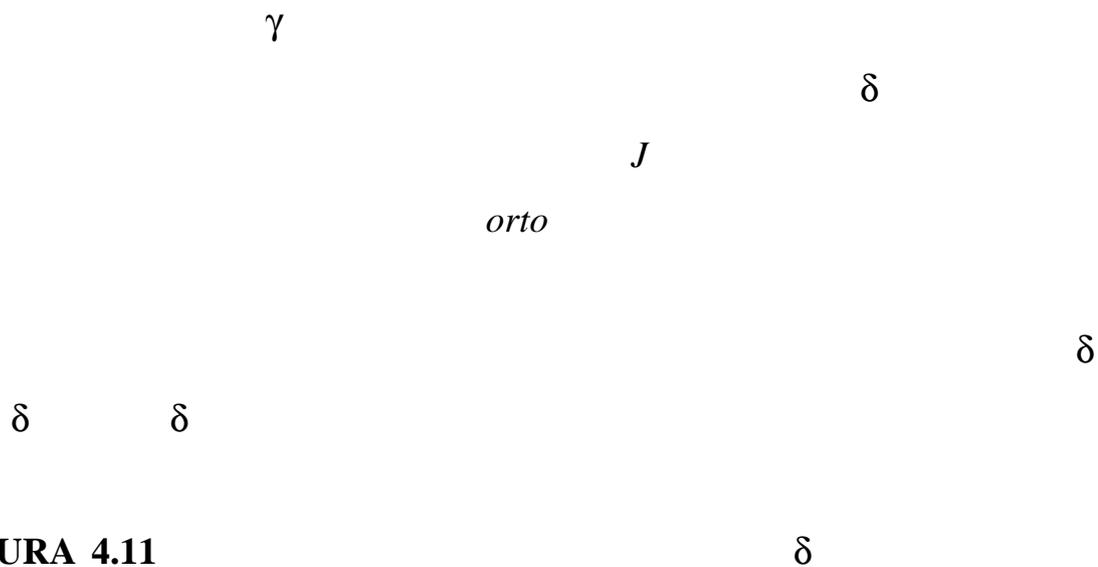


FIGURA 4.11

4.5 4.6

TABELAS

FIGURA 4.12

ESQUIMIANINA

TABELA 4.5

Hidrogênio	esquimianina isolada	Esquimianina (literatura)
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.6

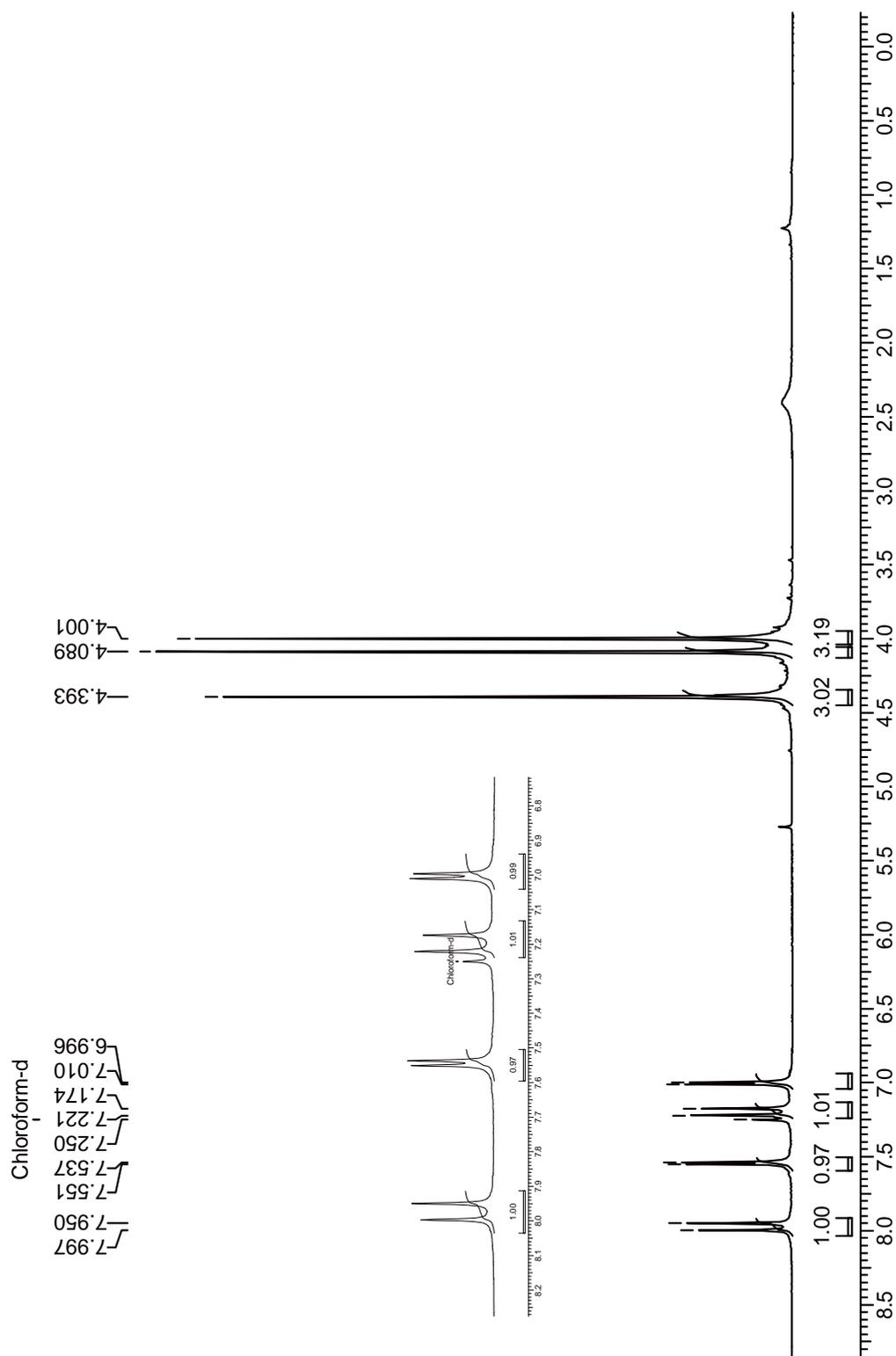


FIGURA 4.10

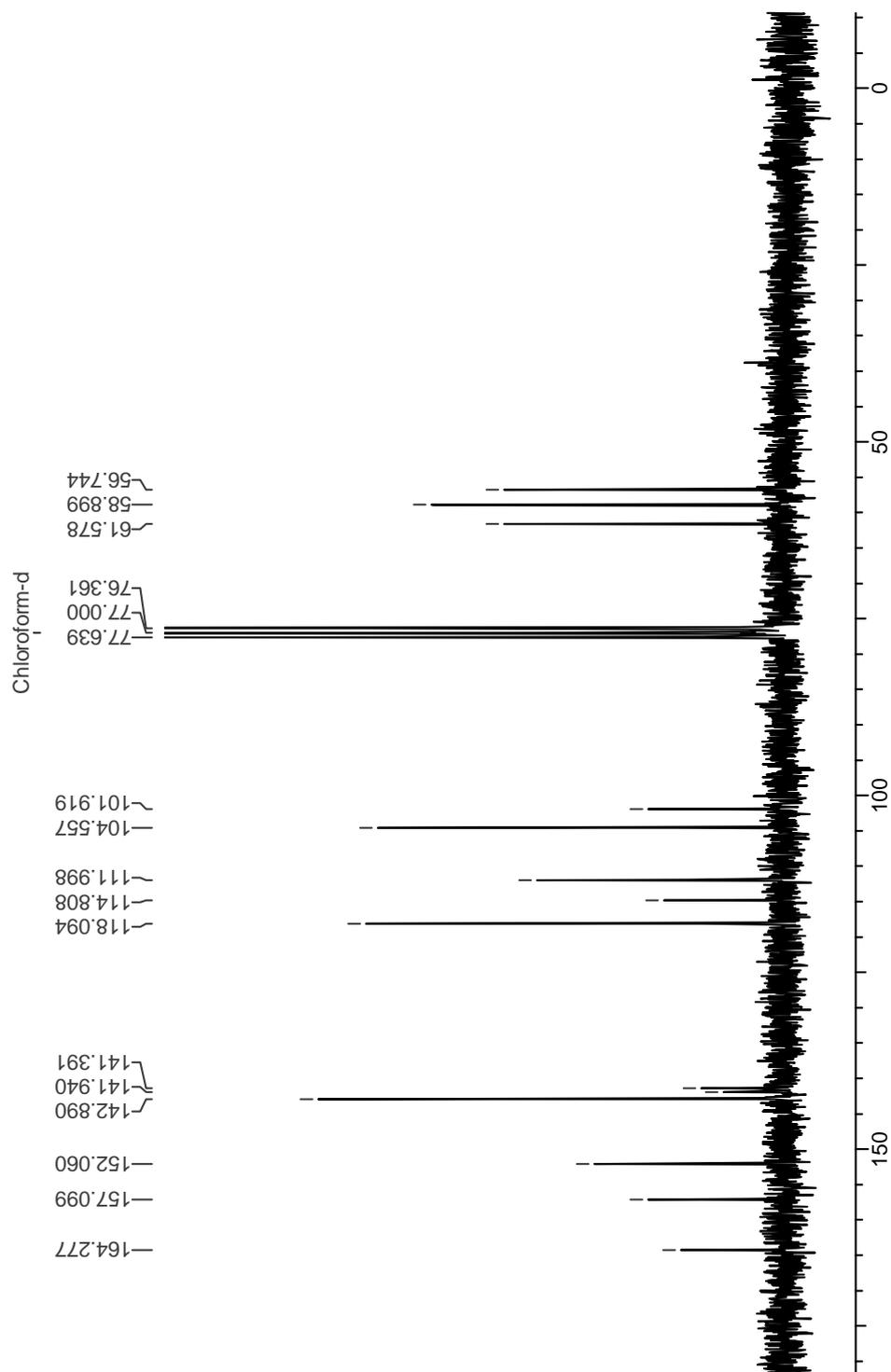


FIGURA 4.11:

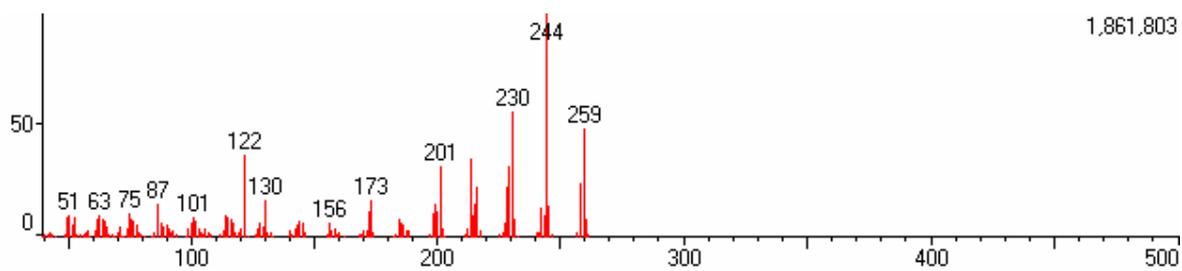


FIGURA 4.12

FIGURA 4.13

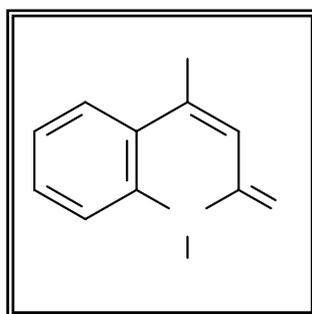


FIGURA 4.13

FIGURA 4.14

	δ	J
δ		J
	δ	J

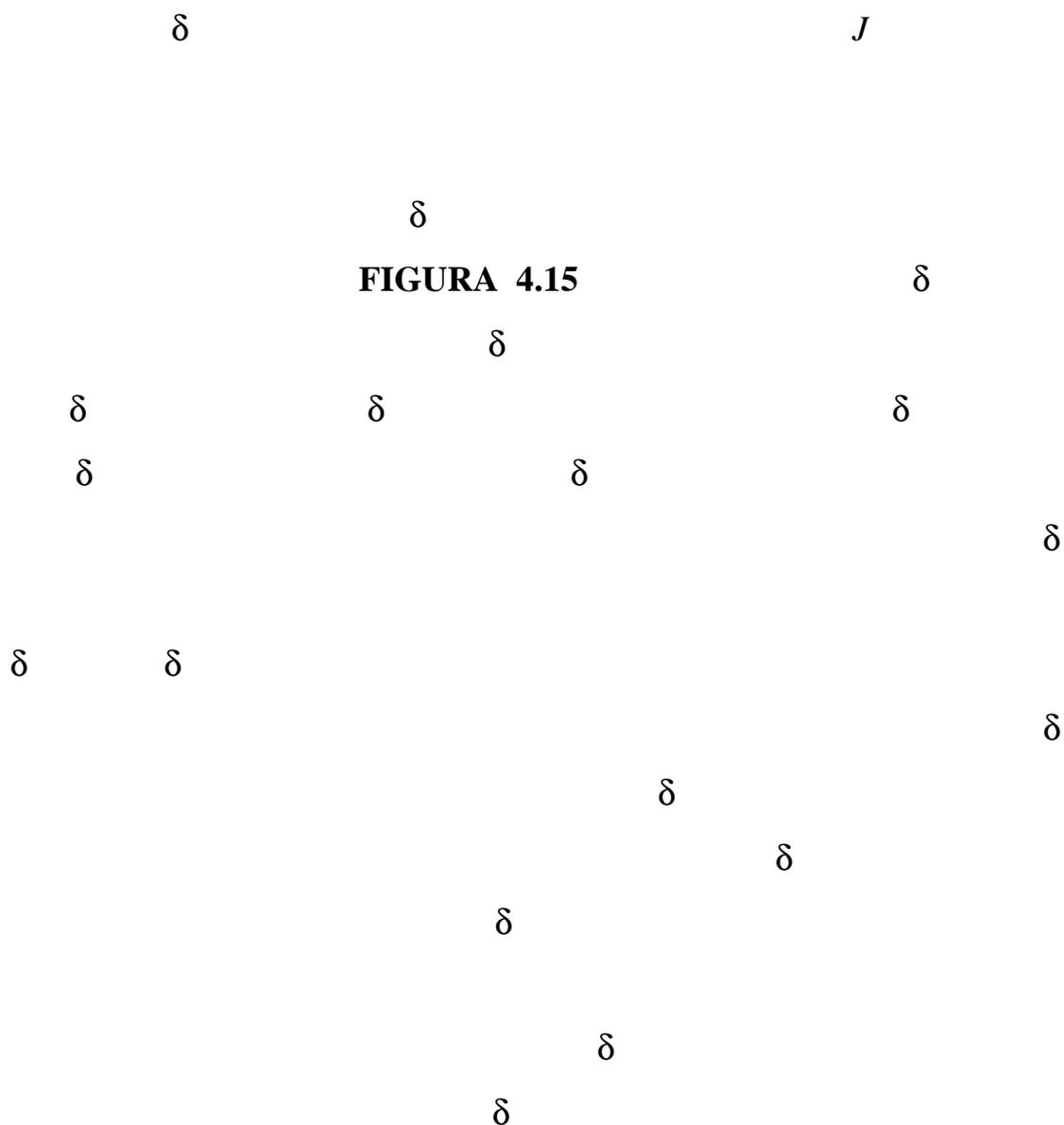


FIGURA 4.15

TABELAS

4.7 4.8

FIGURA 4.16

4-METOXI-2-QUINOLONA

1-METIL-

TABELA 4.7

Hidrogênio	1-metil-4-metoxi-2-quinolona isolada	1-metil-4-metoxi-2-quinolona (literatura)
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>dd</i>	<i>dd</i>
	<i>ddd</i>	<i>ddd</i>
	<i>ddd</i>	<i>ddd</i>
	<i>dl</i>	<i>dl</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.8

Carbono	1-metil-4-metoxi-2-quinolona isolada
	δ

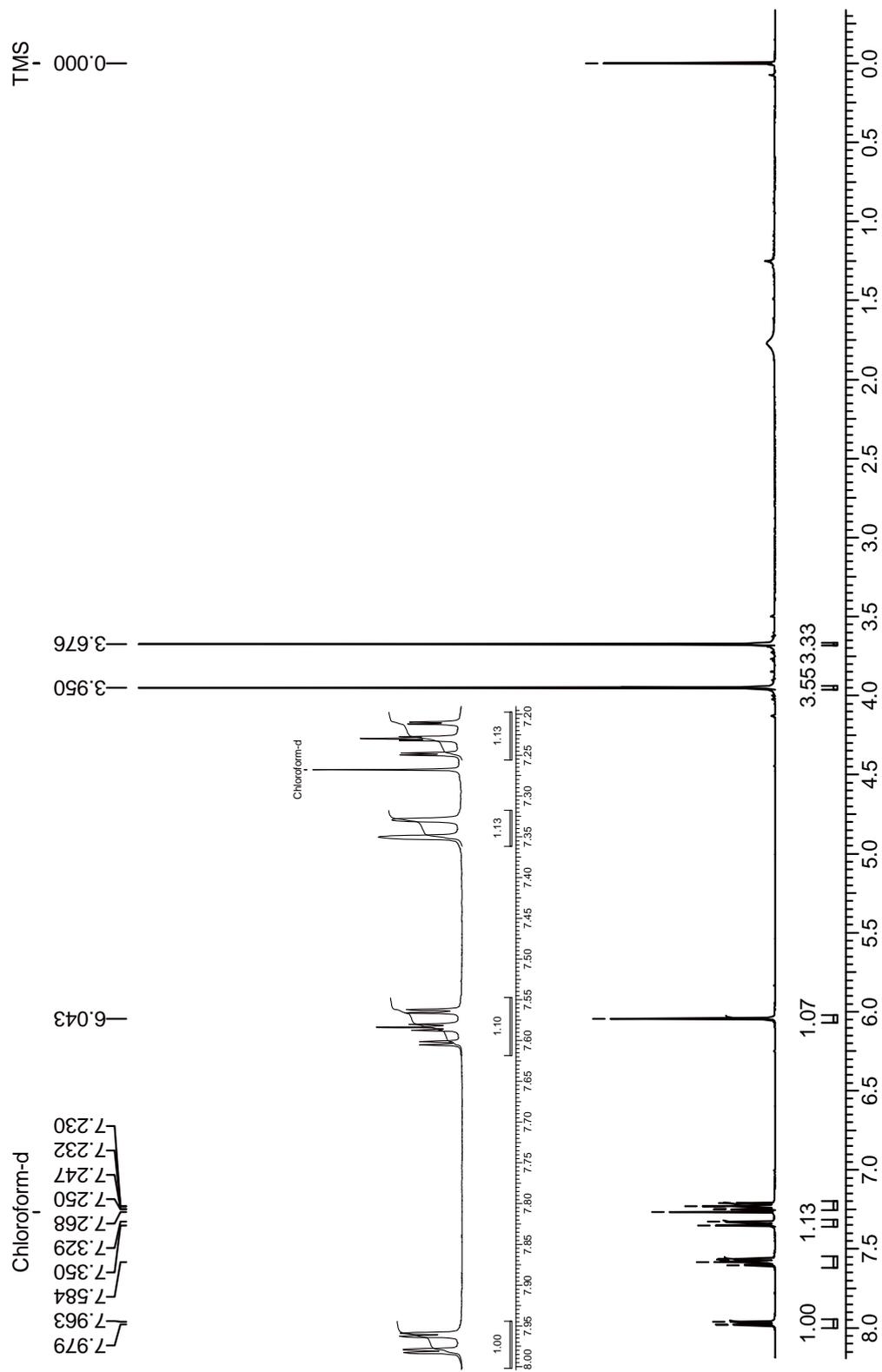


FIGURA 4.14

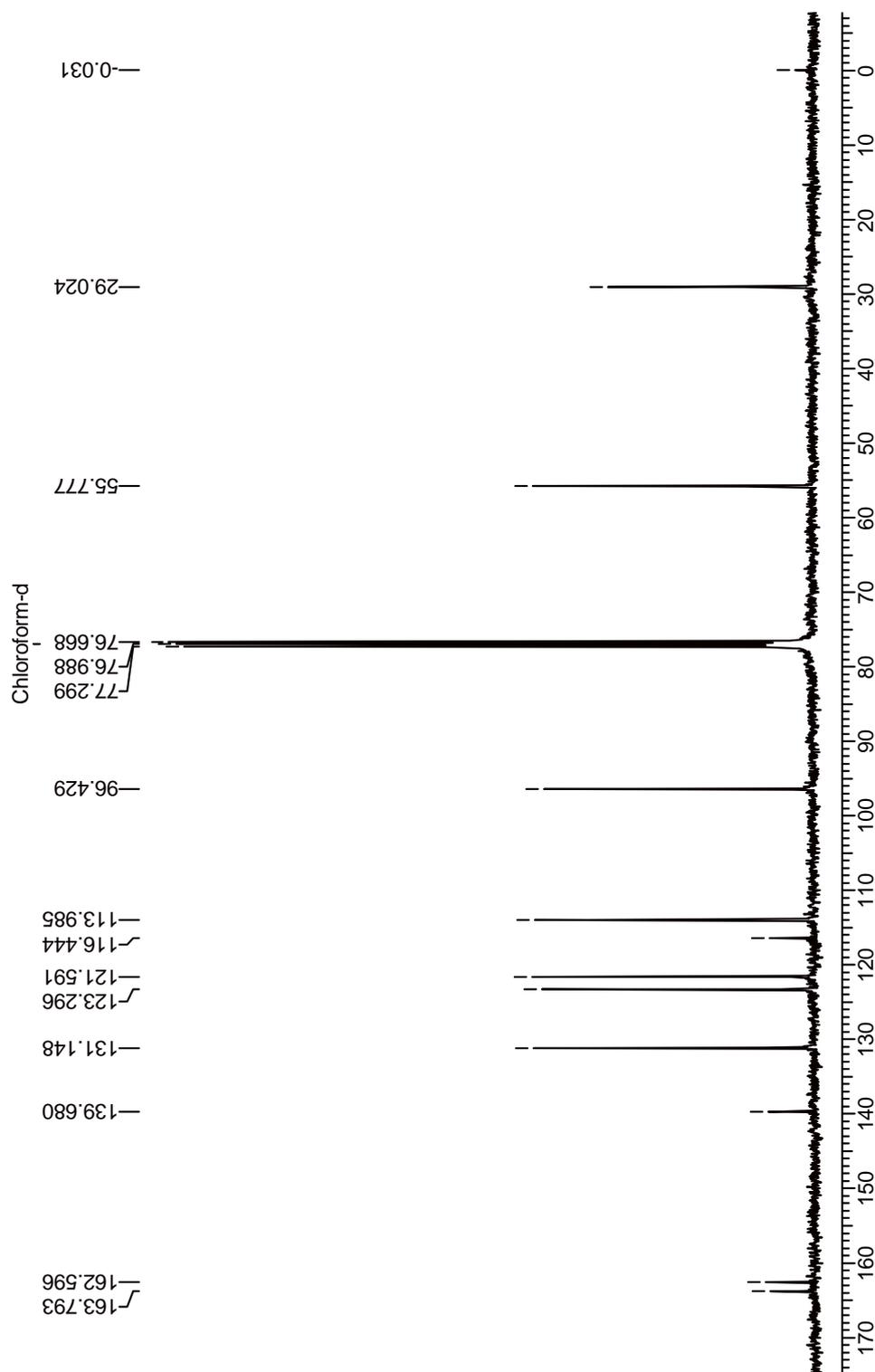


FIGURA 4.15:

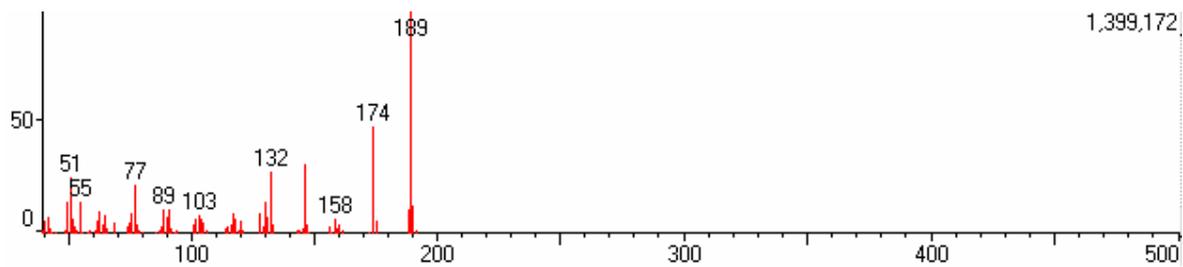


FIGURA 4.16

FIGURA 4.17

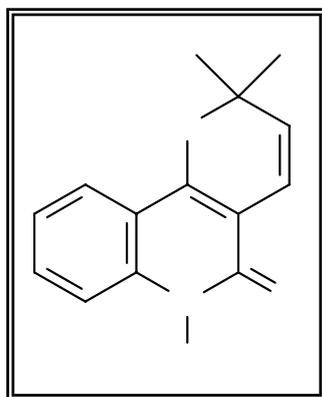


FIGURA 4.17

FIGURA 4.18



δ *J*

δ

δ

J

δ

FIGURA 4.19

δ

δ

δ

TABELAS

4.9 4.10

FIGURA 4.20

N-

METILFLINDERSINA

TABELA 4.9

Hidrogênio	N-metilflindersina isolada	N-metilflindersina (literatura)
	<i>dl</i>	<i>dl</i>
	<i>ddd</i>	<i>tl</i>
	<i>ddd</i>	<i>ddd</i>
	<i>dd</i>	<i>dd</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>d</i>	<i>d</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.10

Carbono	N-metilflindersina isolada
δ	

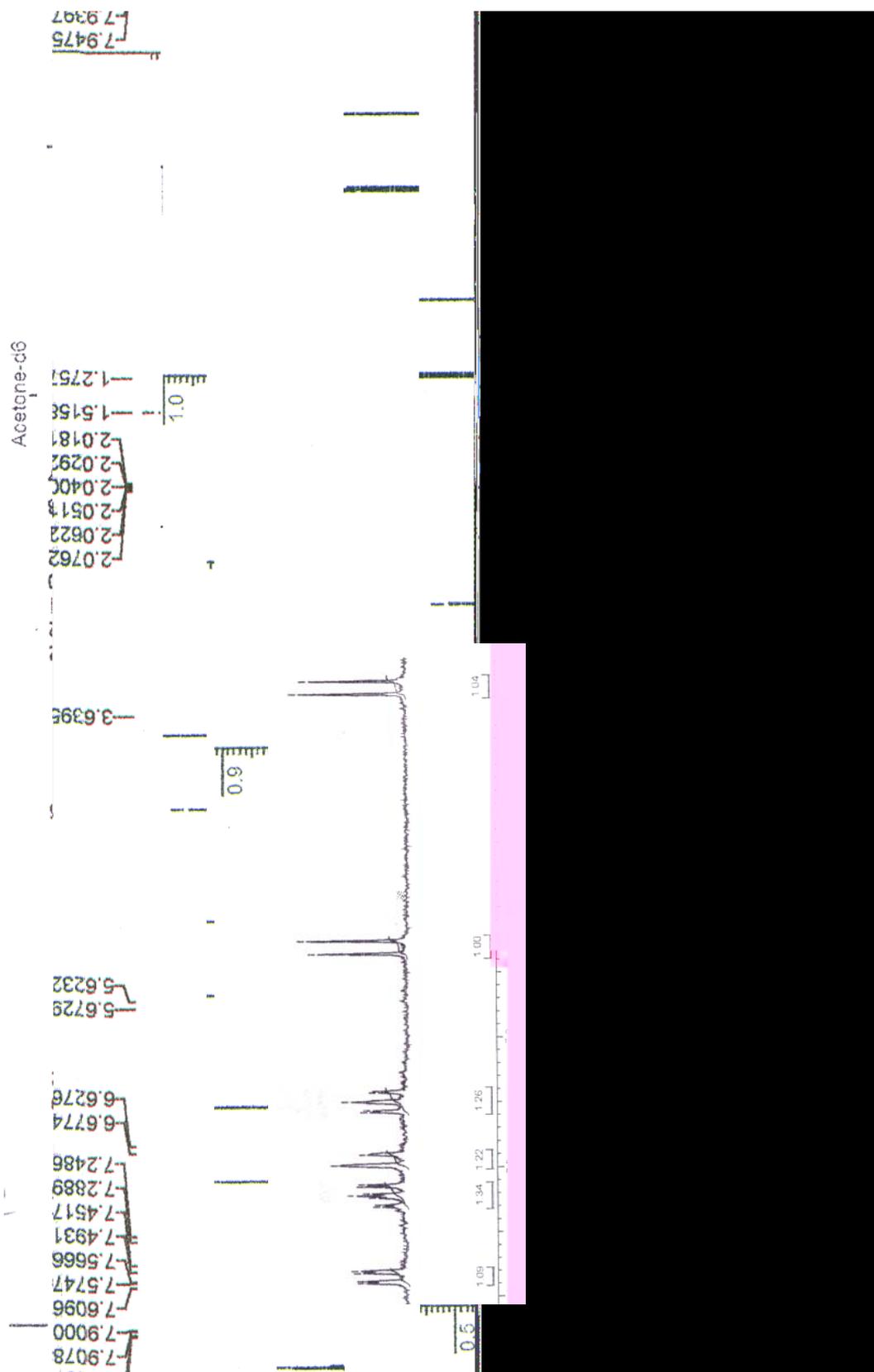


FIGURA 4.18

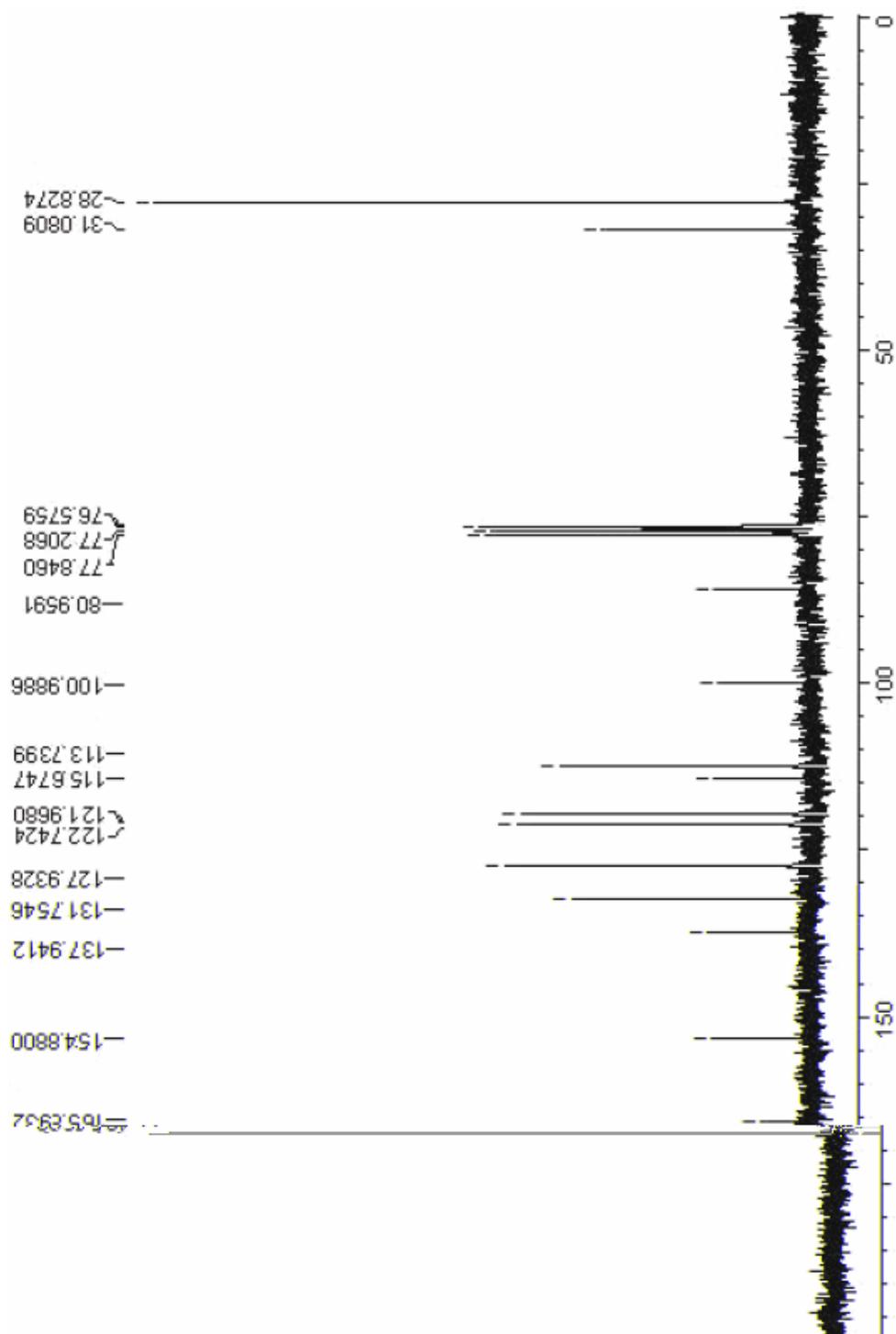


FIGURA 4.19:

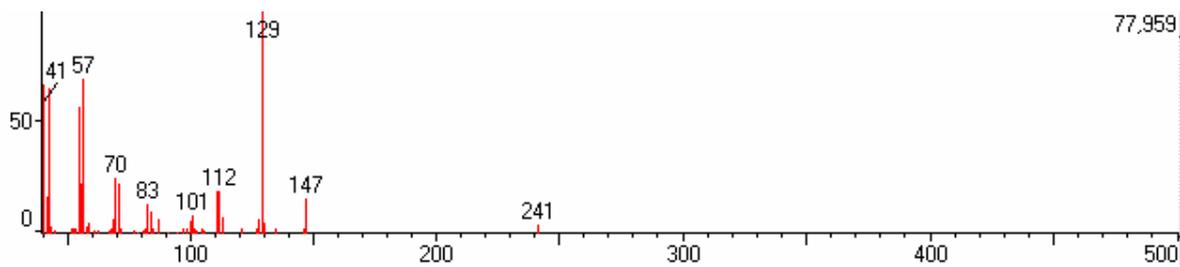


FIGURA 4.20

FIGURA 4.21

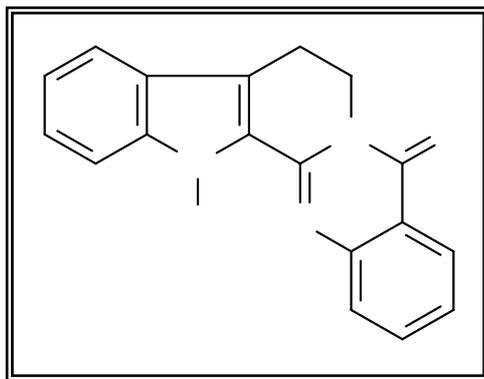


FIGURA 4.21

FIGURA 4.24

δ

J

FIGURA 4.25

δ

δ *J*

orto meta

FIGURA 4.26

δ *J*

δ *J*

δ

δ

δ

J

δ

δ

δ

δ

δ

δ

δ

FIGURA 4.27

δ

δ

δ

TABELA 4.11

Hidrogênio	Rutaecarpina isolada	Rutaecarpina (literatura)
	<i>dl</i>	
	<i>dd</i>	
	<i>dd</i>	
	<i>ddd</i>	
	<i>t</i>	<i>t</i>
	<i>t</i>	<i>t</i>
	<i>dd</i>	
	<i>ddd</i>	
	<i>ddd</i>	
	<i>ddd</i>	
	<i>s</i>	<i>s</i>
	δ	<i>J</i>

TABELA 4.12

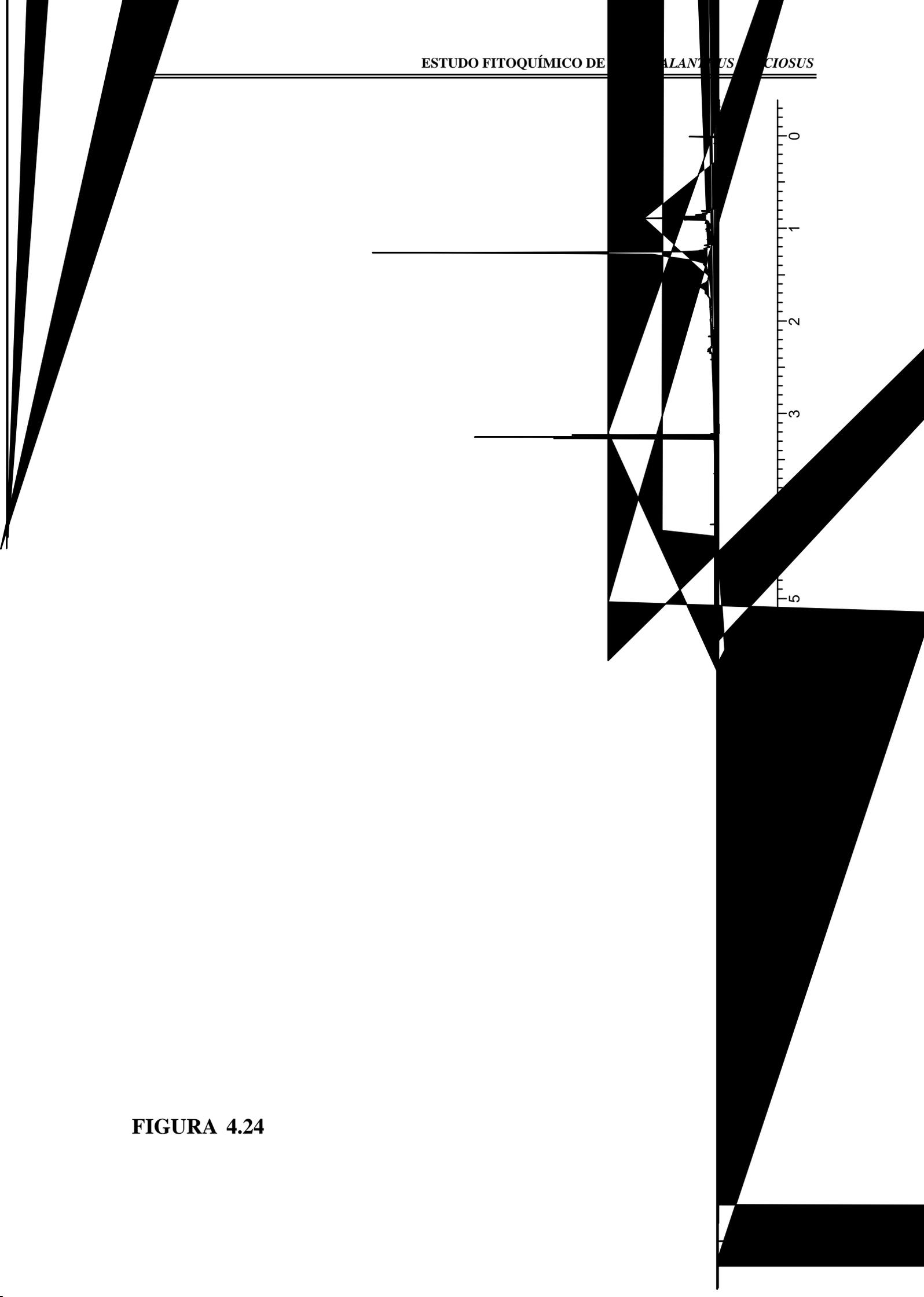


FIGURA 4.24

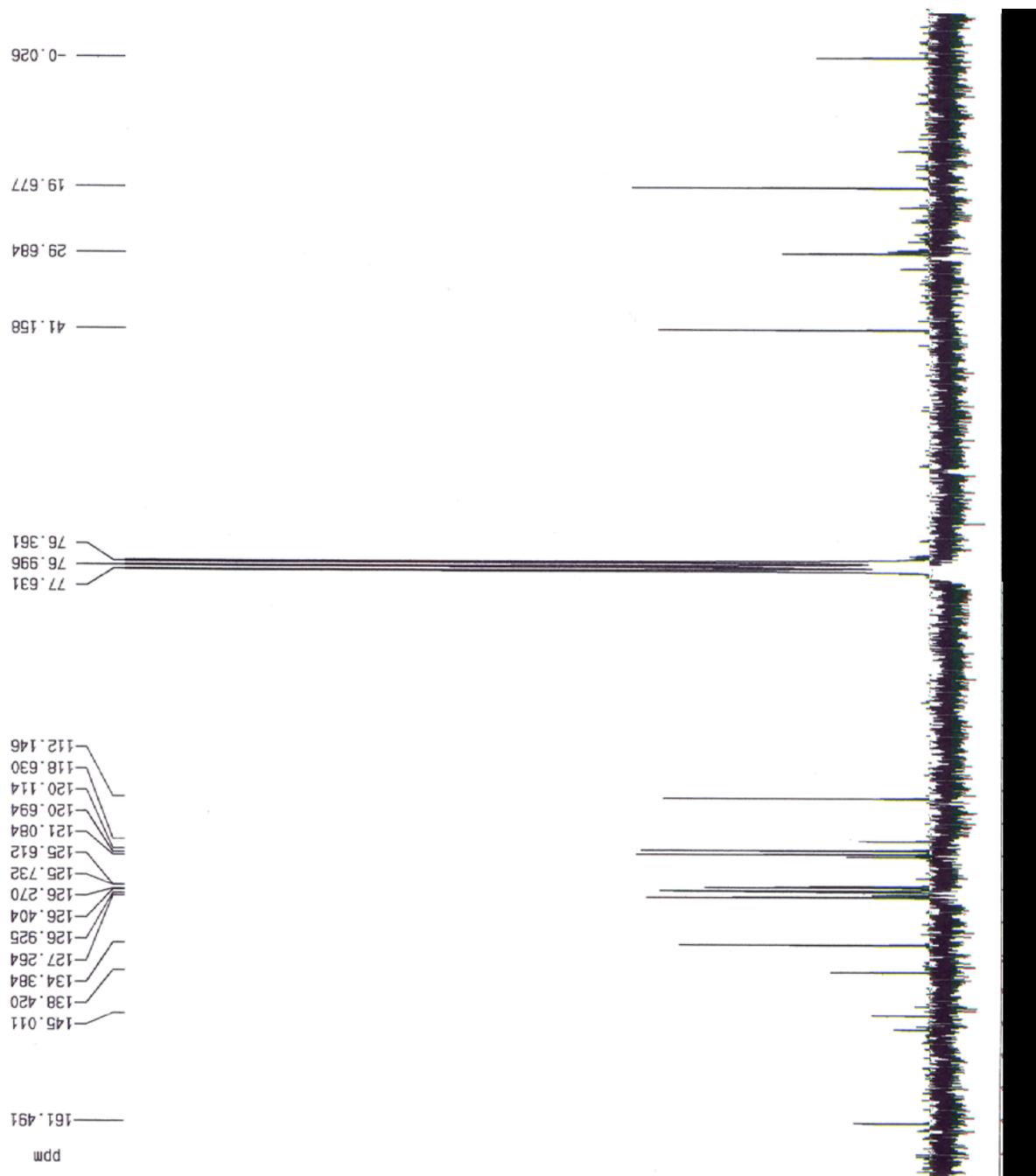


FIGURA 4.25:

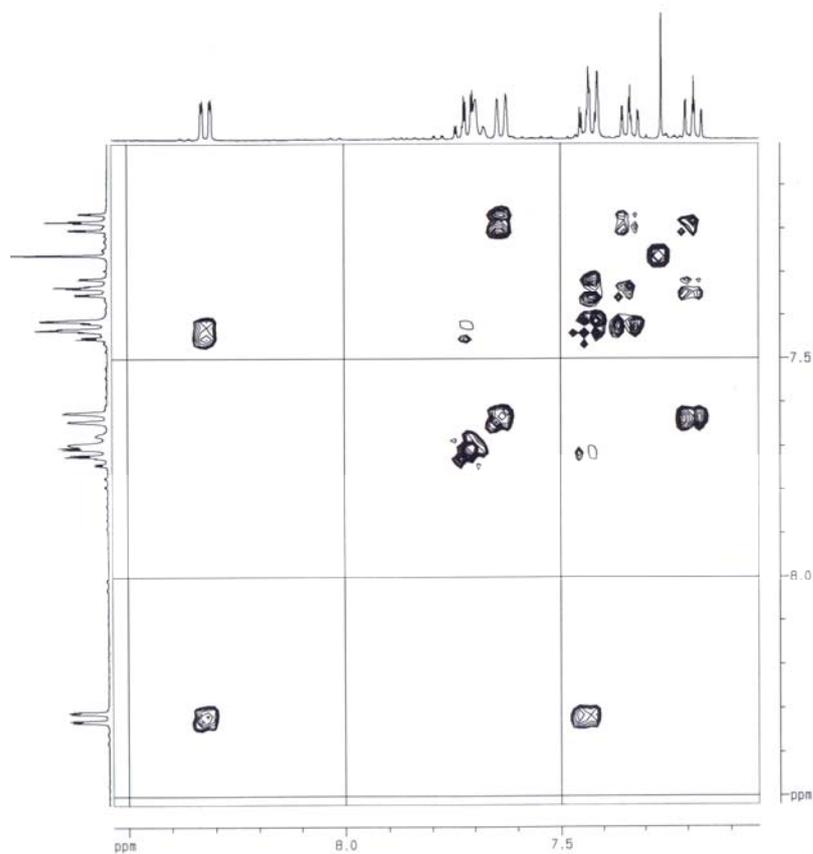
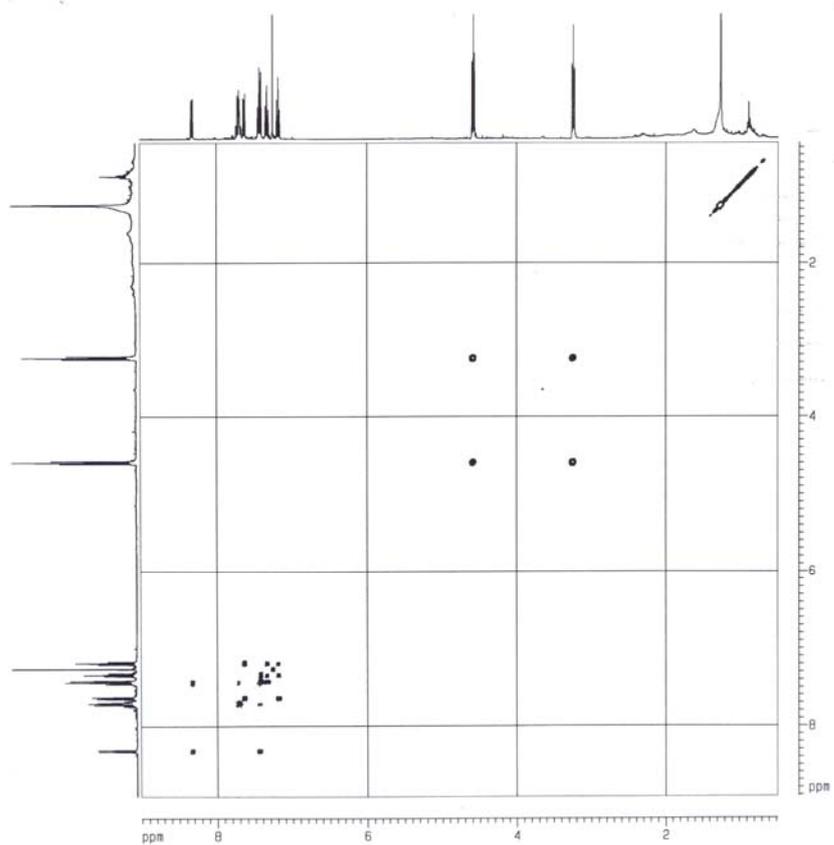


FIGURA 4.26:

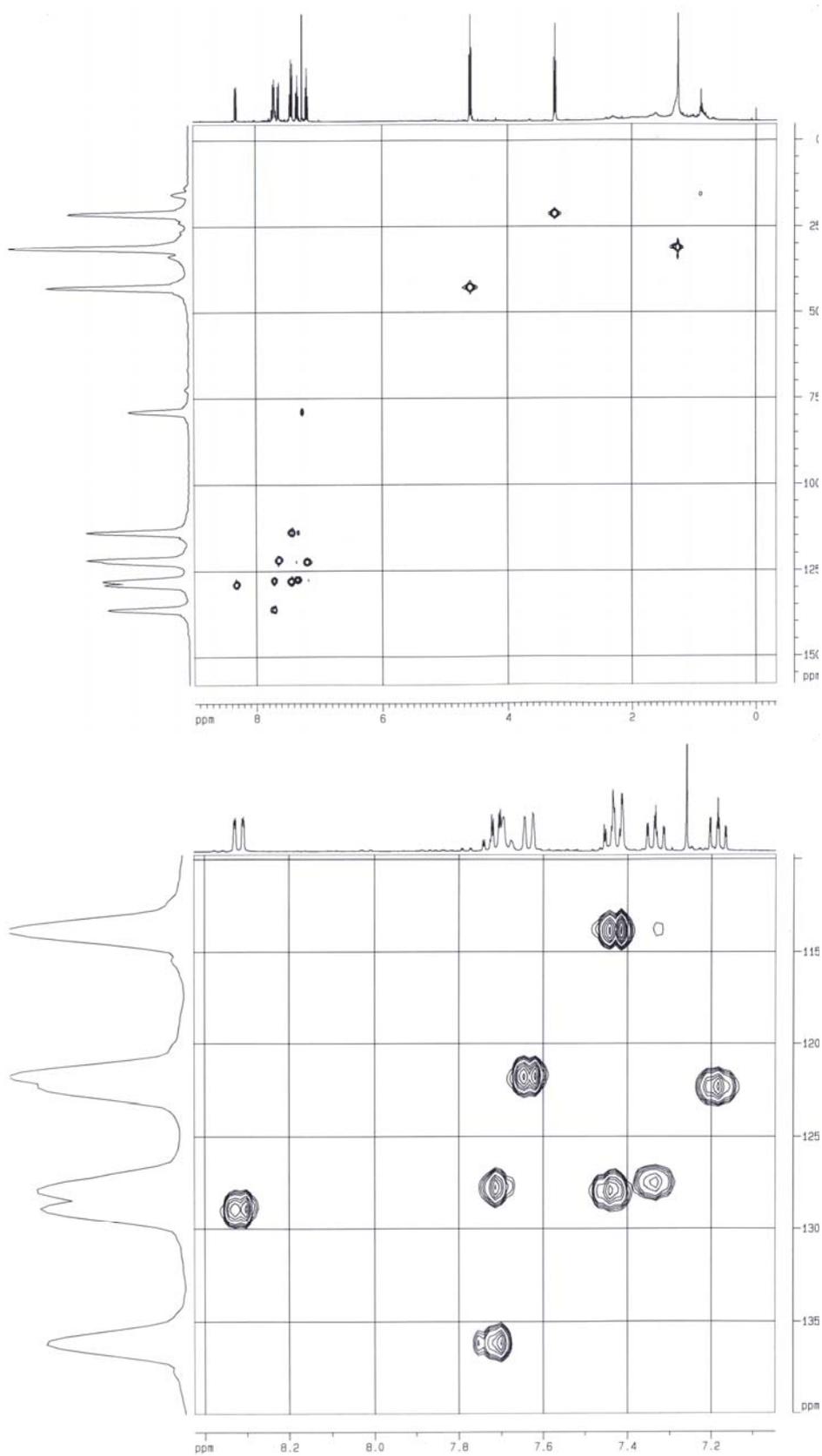


FIGURA 4.27:

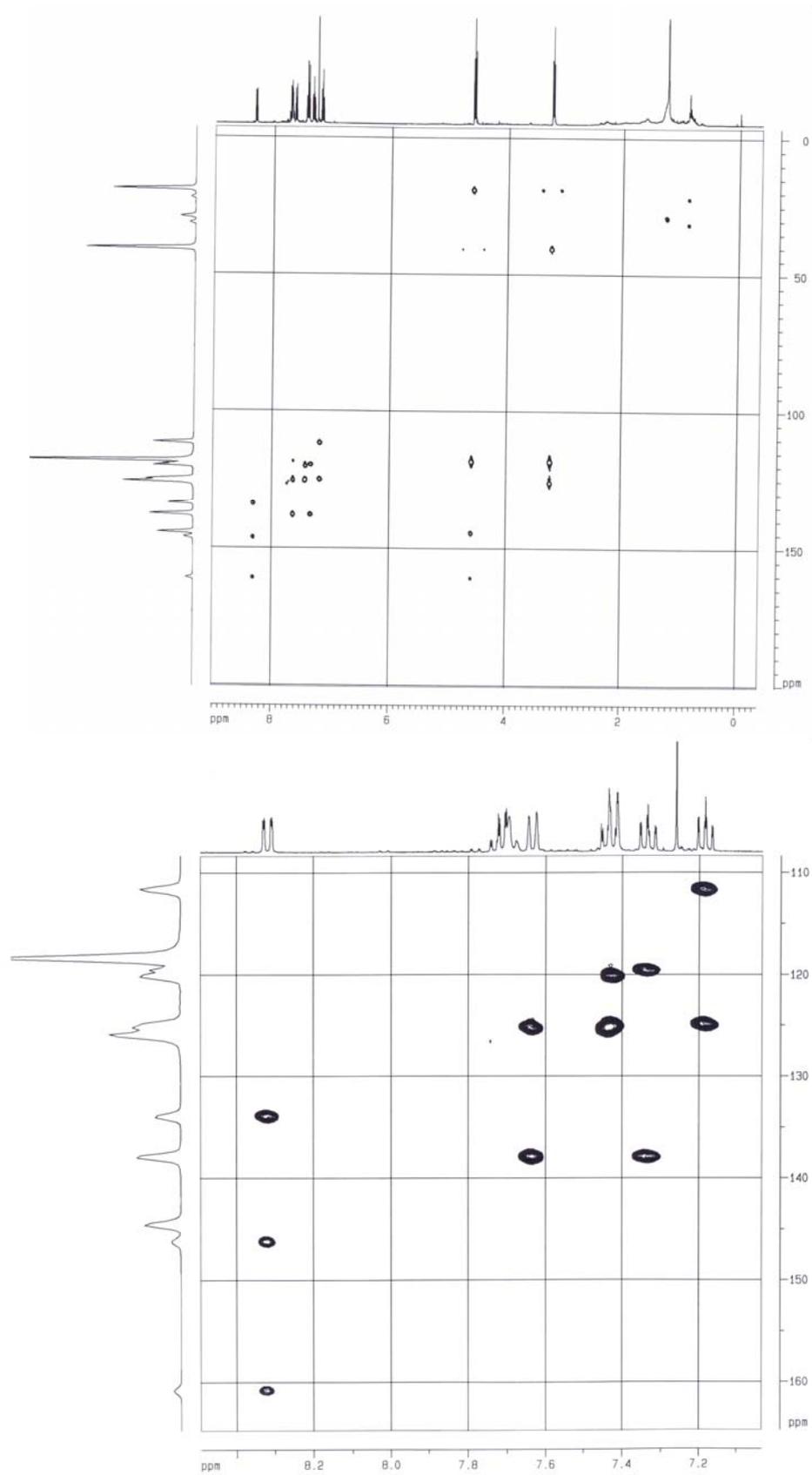


FIGURA 4.28:

FIGURA 4.29

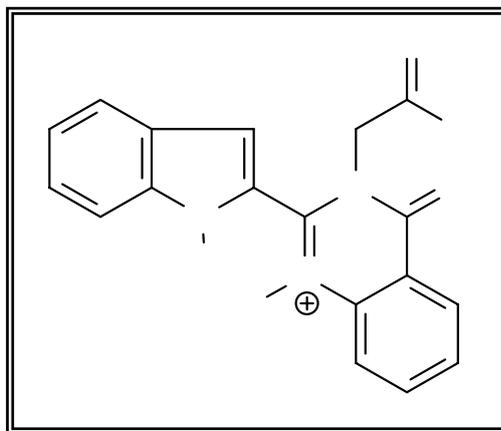


FIGURA 4.29

FIGURA 4.35

δ *J*

orto

FIGURA 4.36

δ

FIGURA 4.37

δ *J*

orto

δ

δ

FIGURA 4.38

δ

δ

δ

δ

δ

δ

FIGURA 4.30

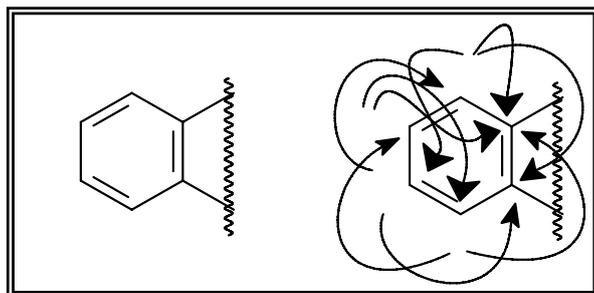


FIGURA 4.30

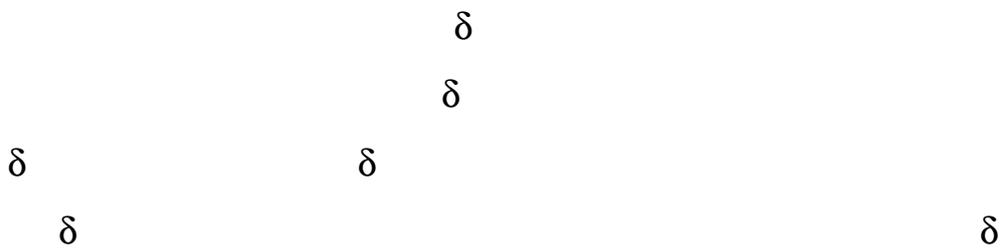


FIGURA 4.31

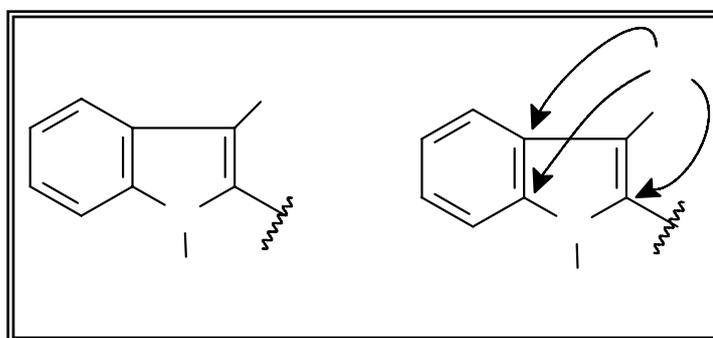


FIGURA 4.31

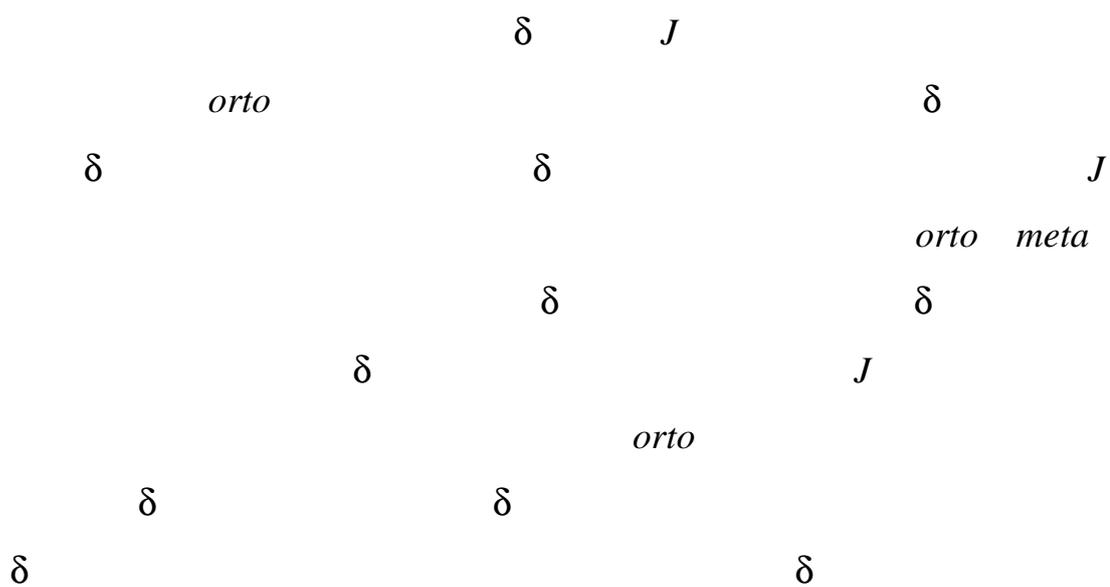


FIGURA 4.32

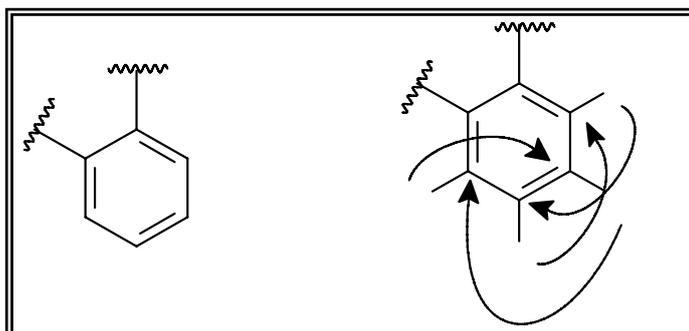


FIGURA 4.32

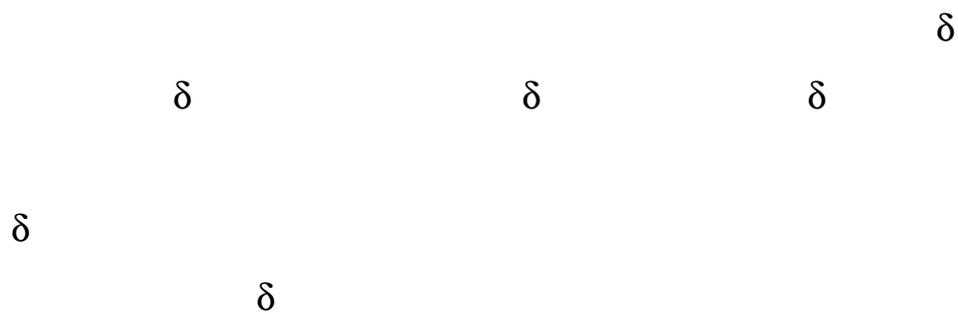


FIGURA 4.33

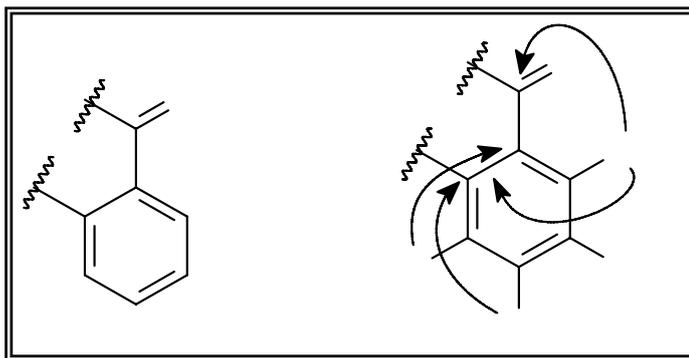


FIGURA 4.33

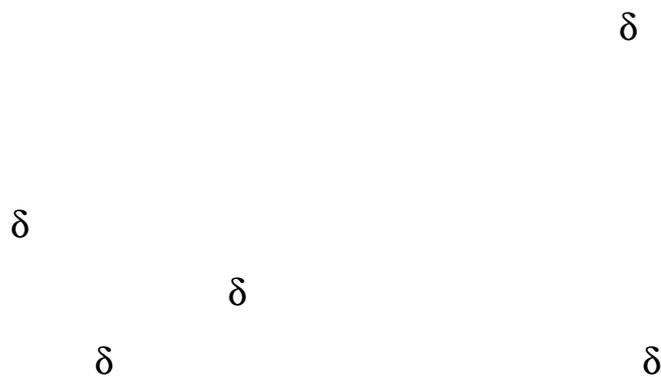


FIGURA 4.34

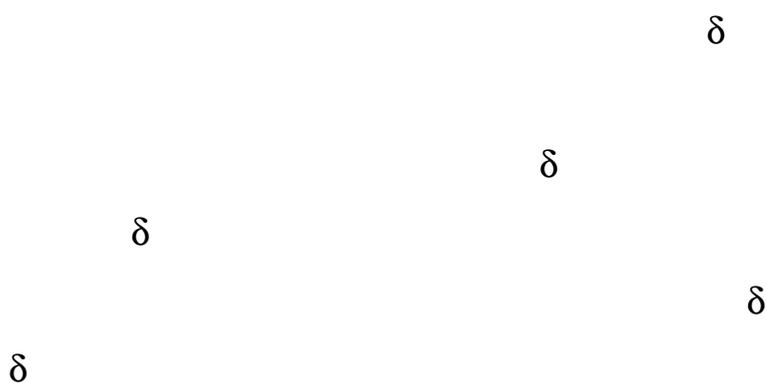


FIGURA 4.34

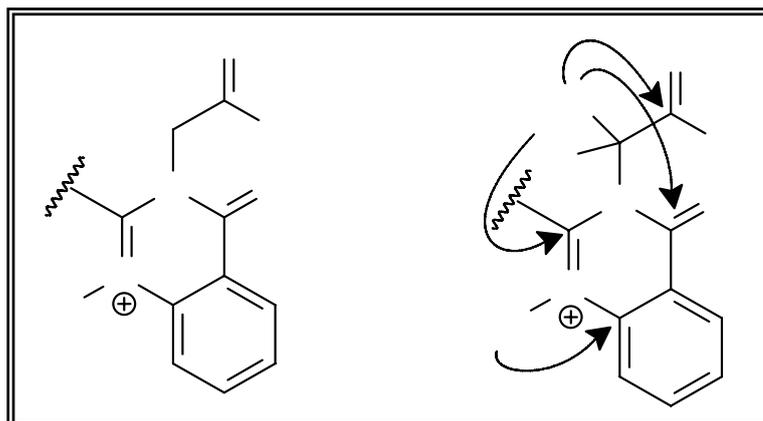


FIGURA 4.34

δ

δ

FIGURA 4.39

TABELAS 4.13 4.15

8,8a-SECO-8-CARBOXI-14-N-METILRUTAECARPINA

TABELA 4.13

Hidrogênio	8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina isolada
	<i>tl</i>
	<i>ddd</i>
	<i>tl</i>
	<i>d</i>
	<i>s</i>
	<i>d</i>
	<i>d</i>
	<i>tl</i>
	<i>tl</i>
	<i>tl</i>
	<i>s</i>
	<i>s</i>
δ	<i>J</i>

TABELA 4.14

Carbono	8,8a-seco-8-carboxi-14-N-metilrutaecarpina isolada
δ	

TABELA 4.15

δ

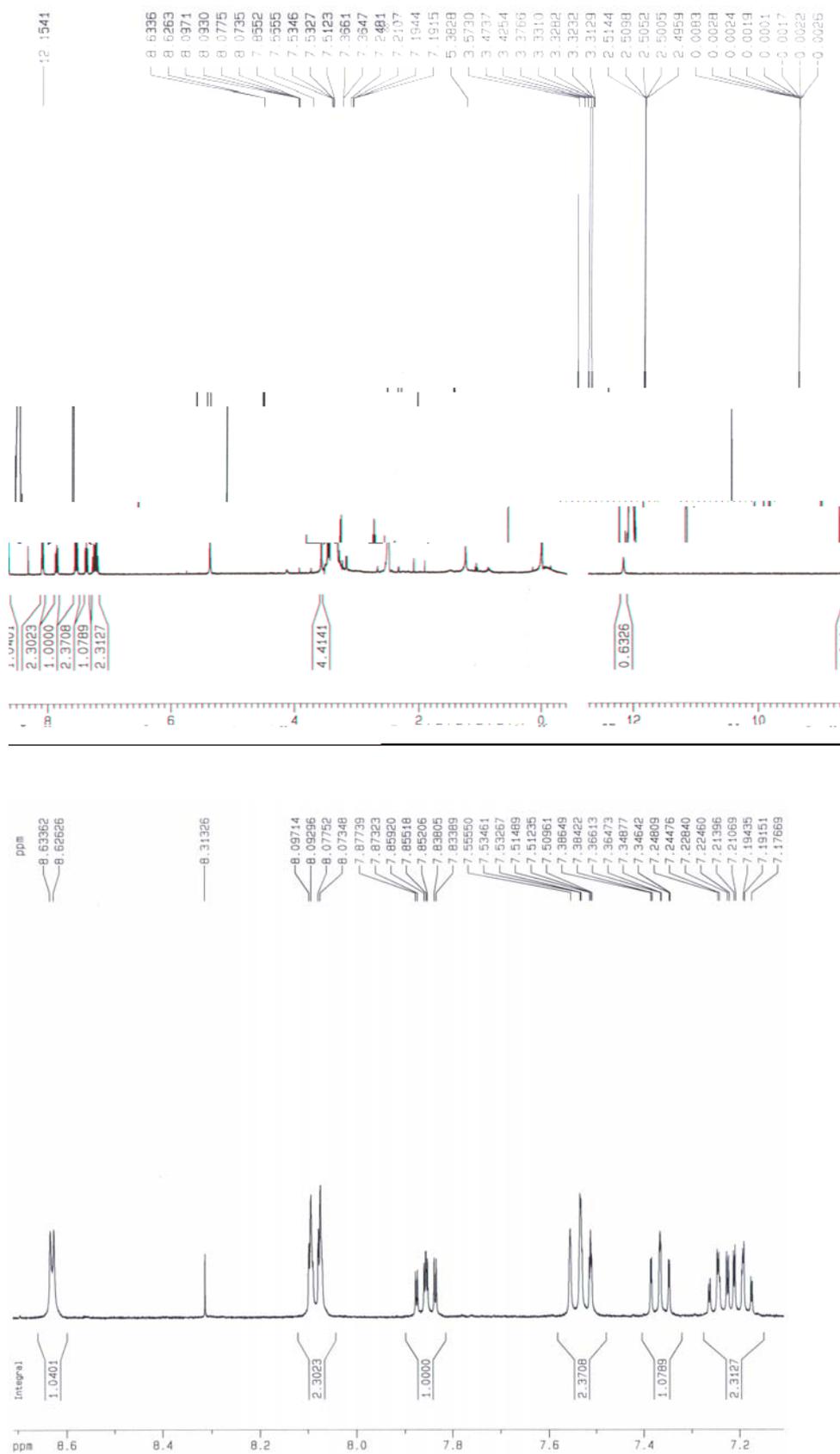


FIGURA 4.35:

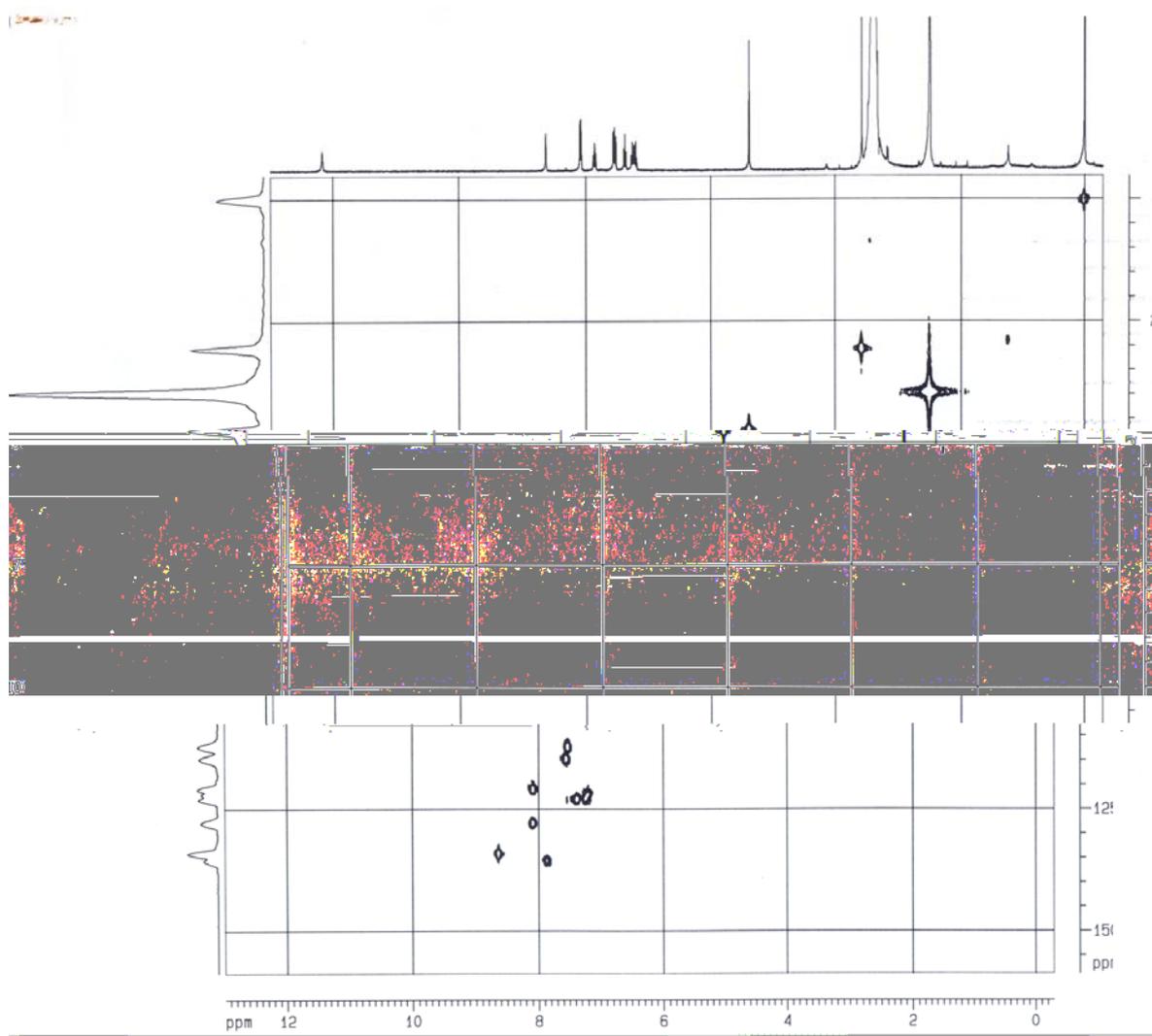


FIGURA 4.36:

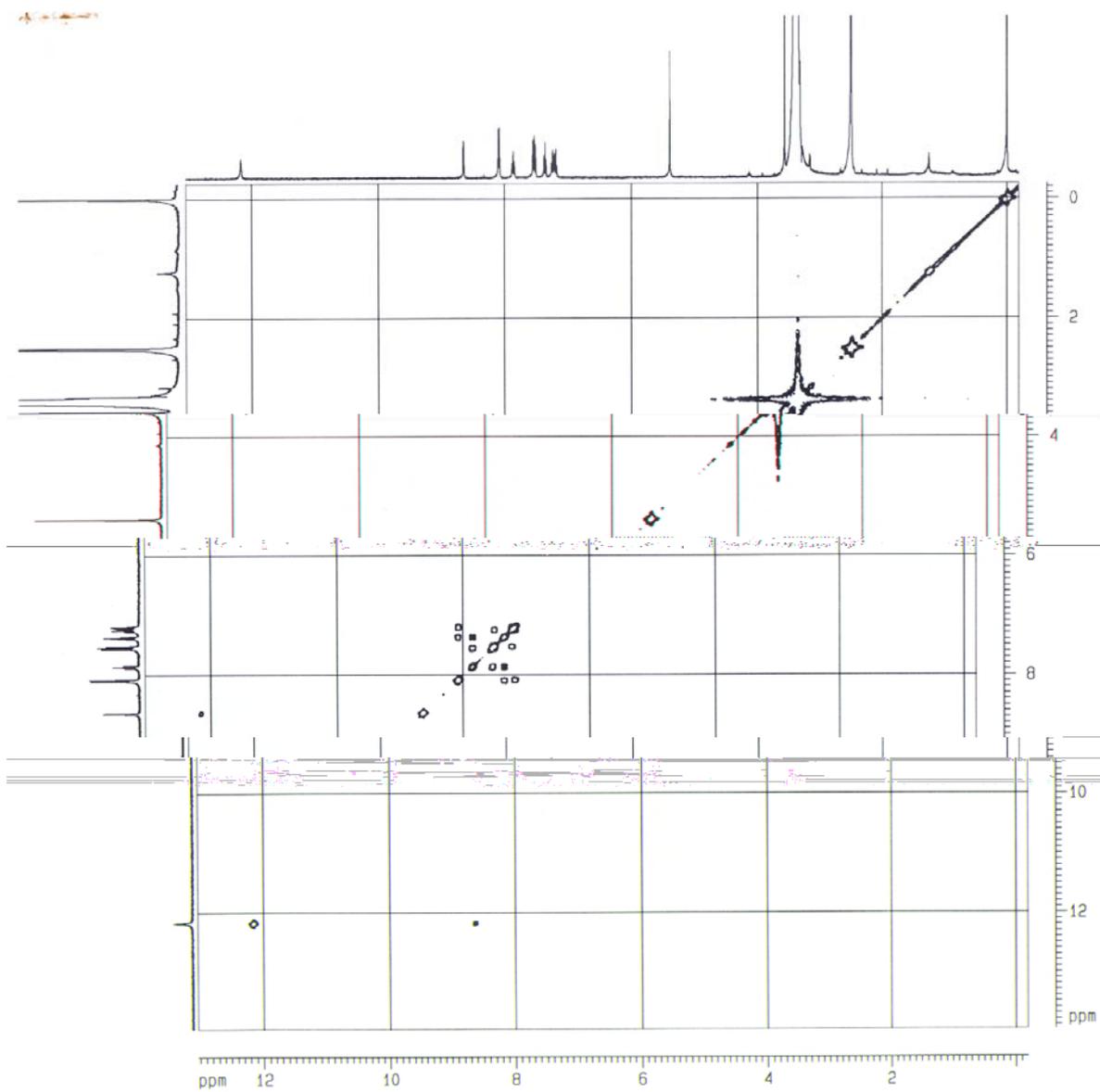


FIGURA 4.37:

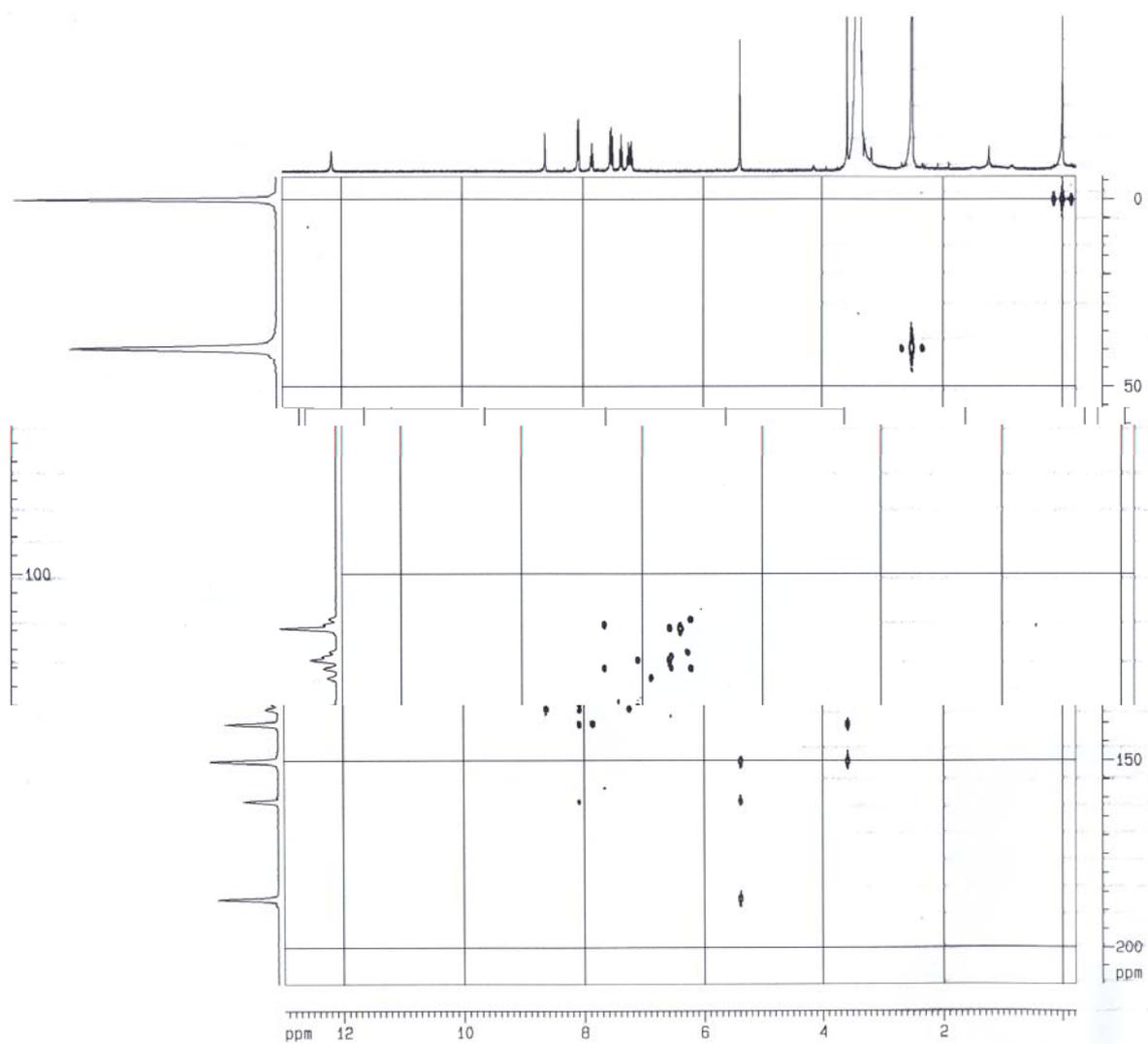


FIGURA 4.38:

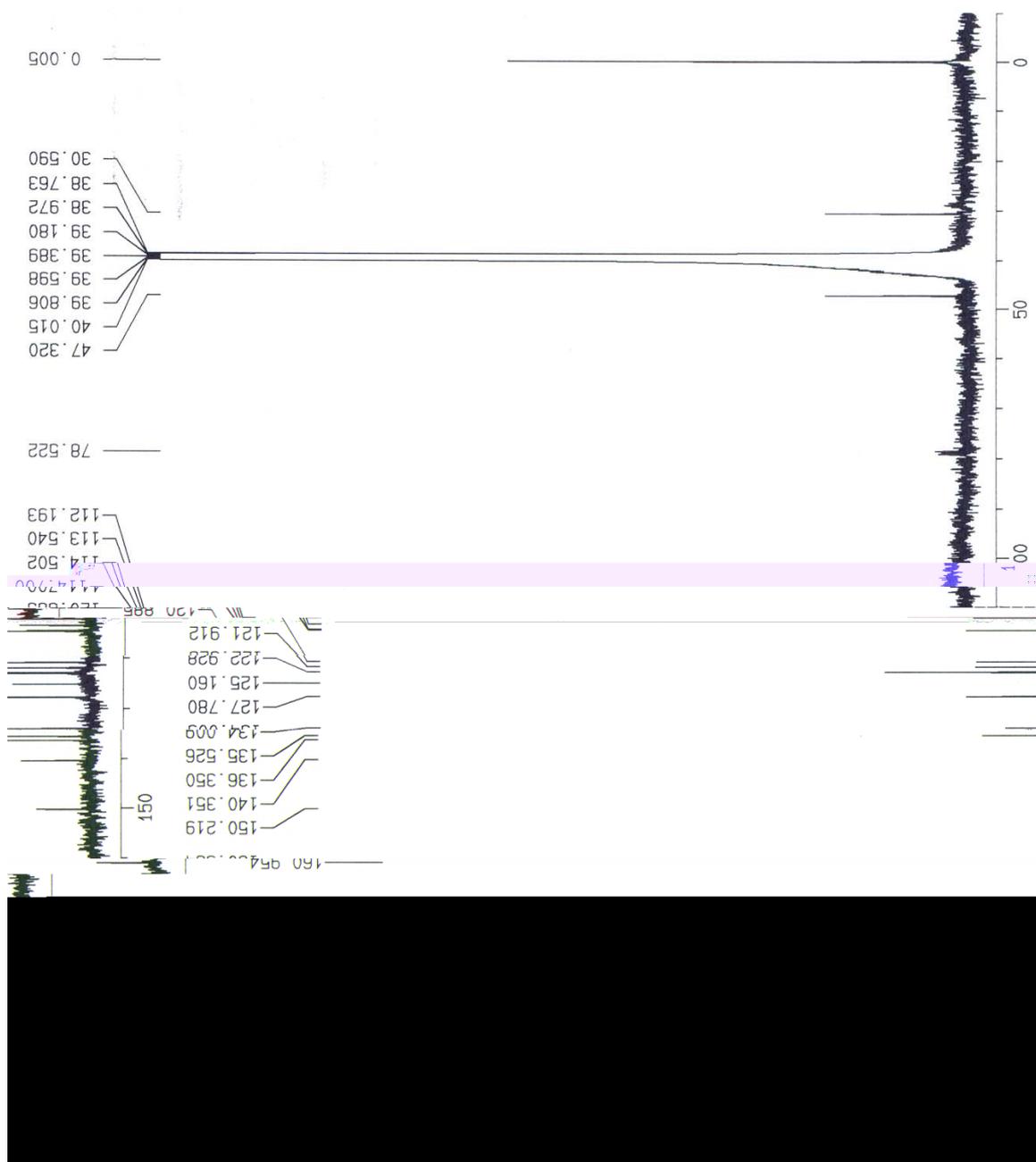


FIGURA 4.39:

FIGURA 4.40

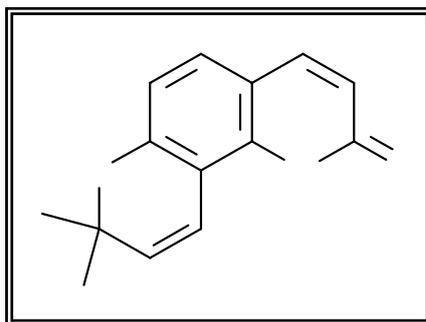


FIGURA 4.40

4.3.3 – Limonóides

FIGURA 4.41

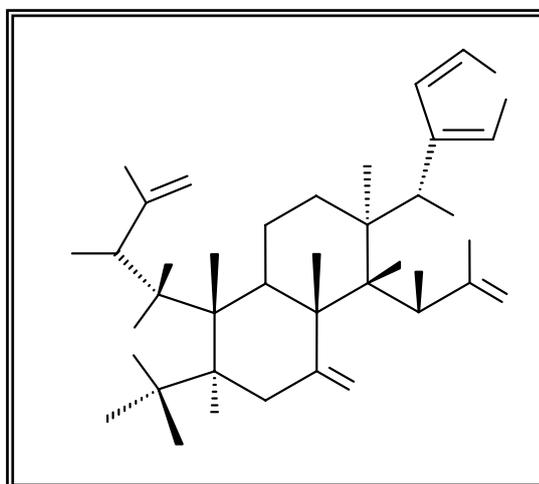


FIGURA 4.41

FIGURA 4.48

J

δ

FIGURA 4.49

δ

J

δ

δ

δ

FIGURA 4.50

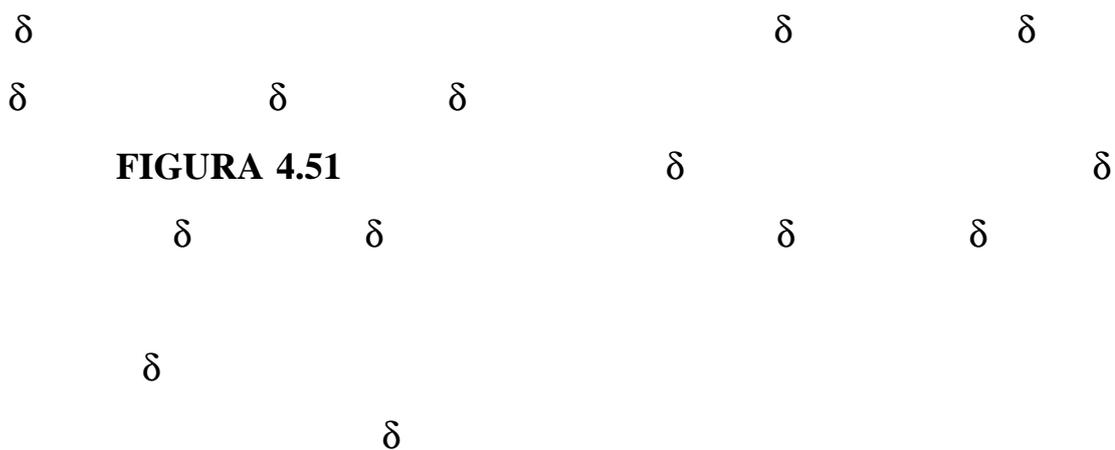


FIGURA 4.42

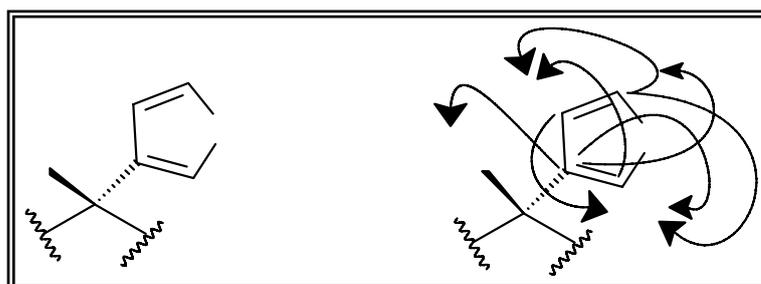
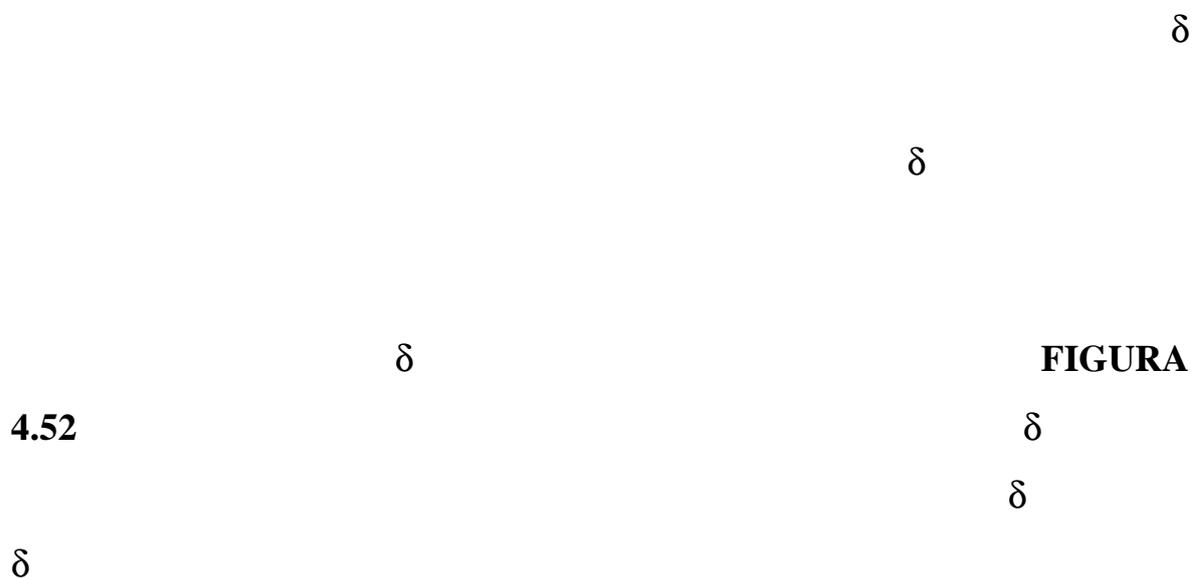


FIGURA 4.42



δ

δ

FIGURA 4.44

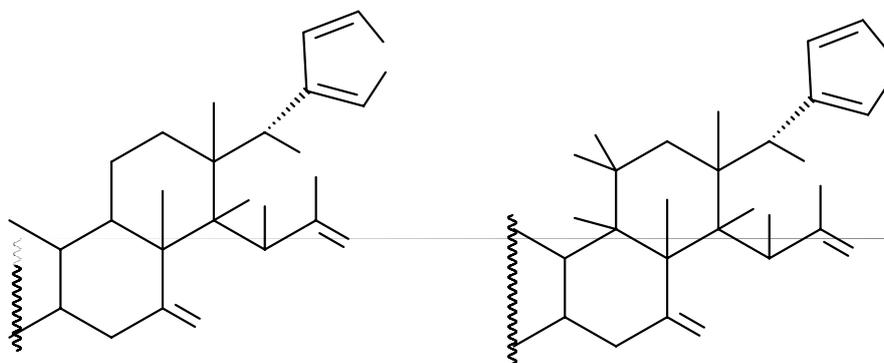


FIGURA 4.44

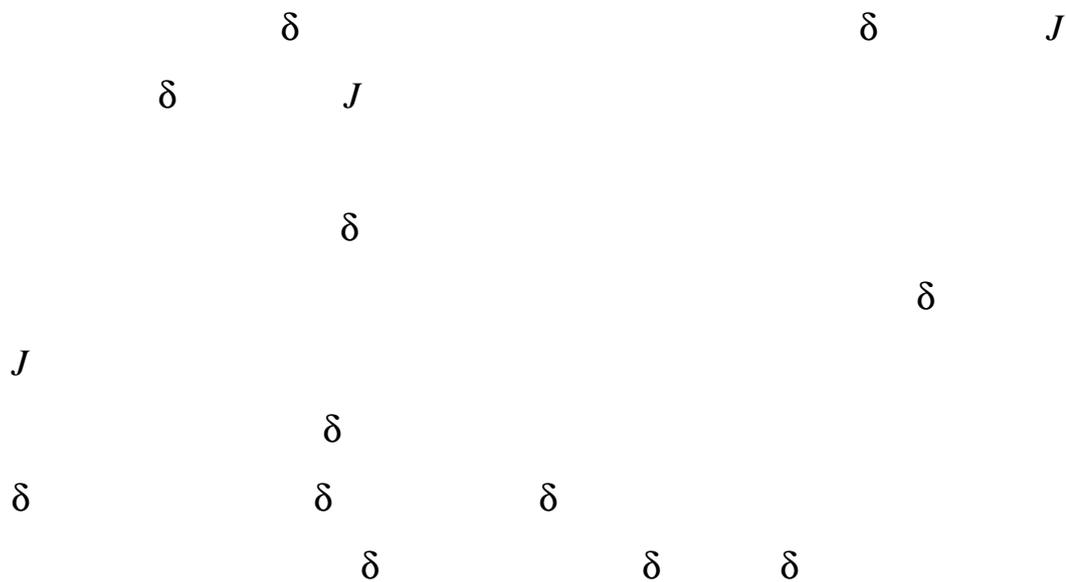


FIGURA 4.45

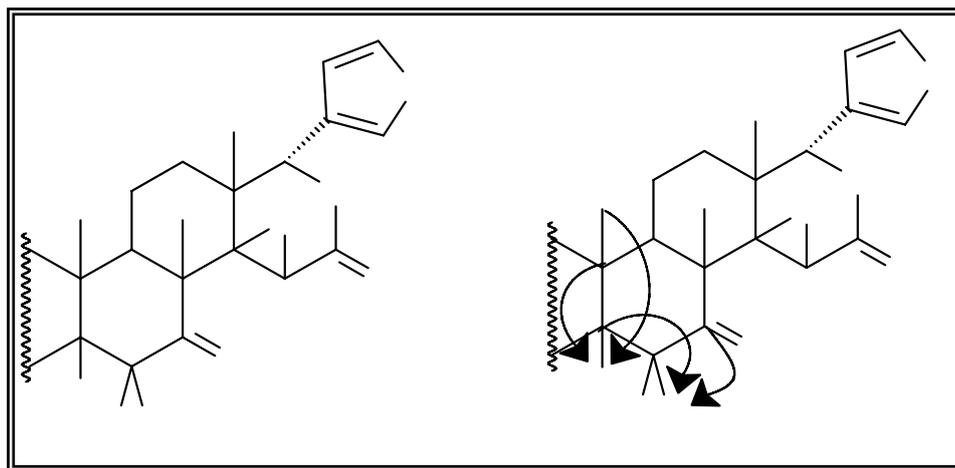


FIGURA 4.45

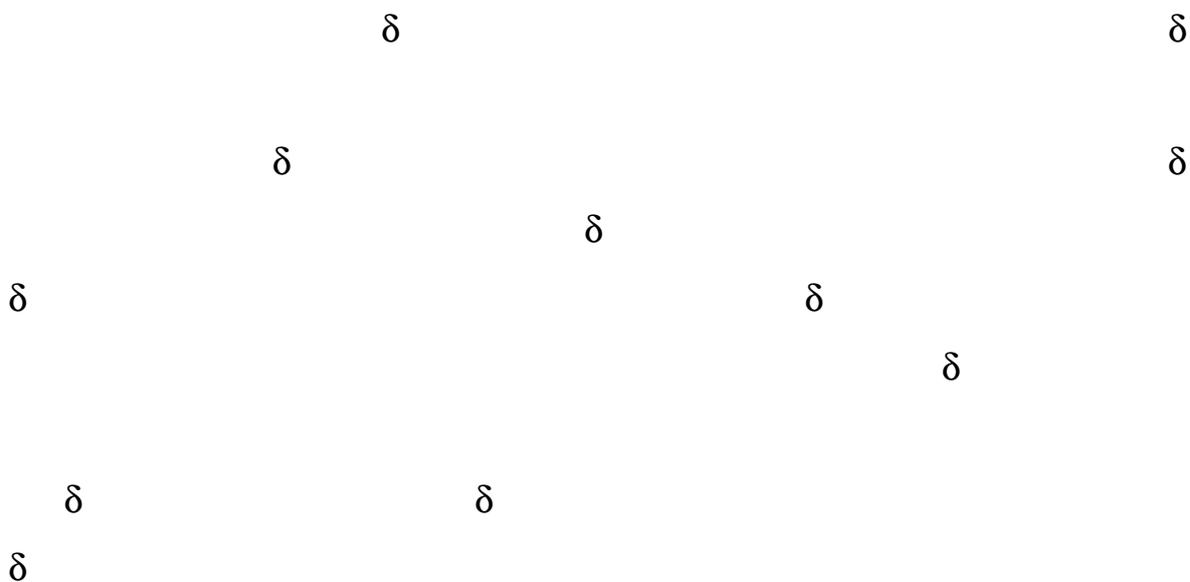


FIGURA 4.46

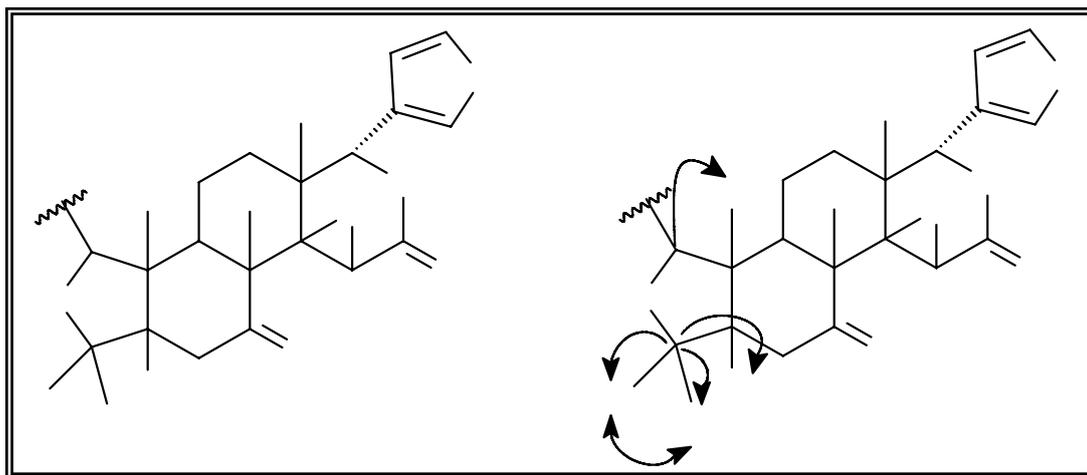


FIGURA 4.46

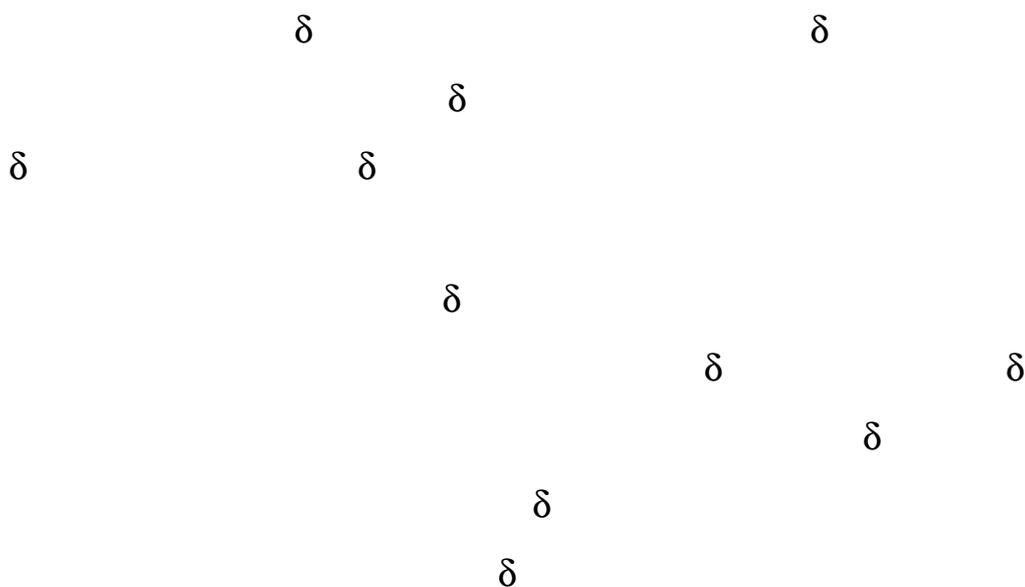


FIGURA 4.47

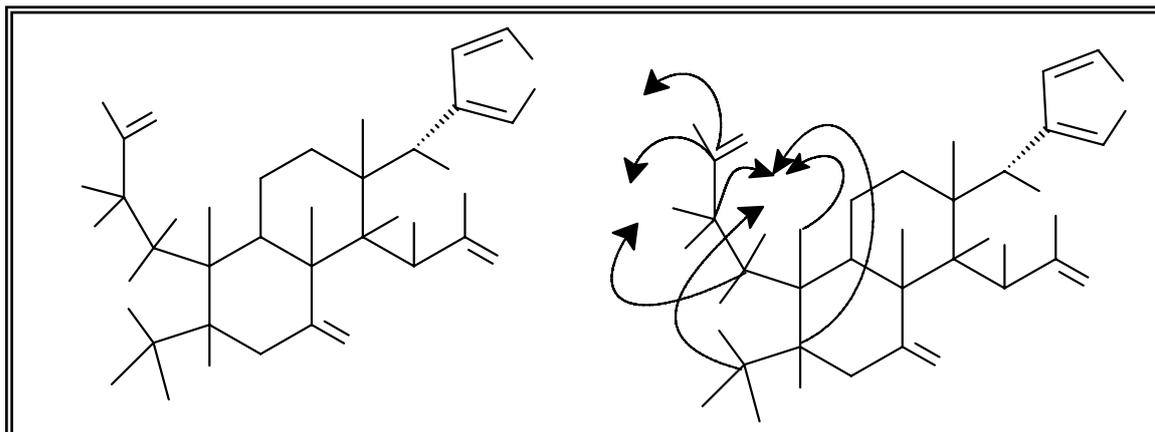
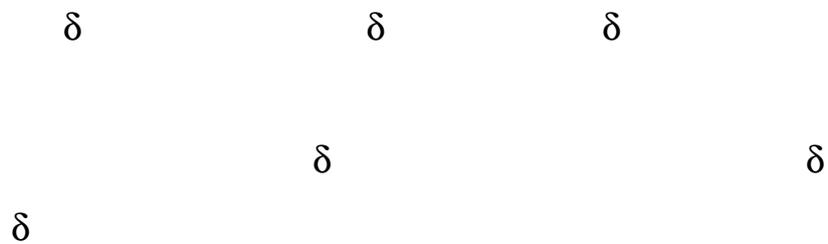


FIGURA 4.47

FIGURA 4.53
4.16–4.18

TABELAS

FIGURA 4.54



2-HIDROXI-EPIISOOBACUNOATO

DE METILA

TABELA 4.16

Hidrogênio	2-hidroxi- epiisobacunoato de metila isolado
	<i>d</i>
	<i>tl</i>
	<i>dd</i>
	<i>dd</i>
	<i>dd</i>
	<i>dd</i>
	<i>m</i>
	<i>m</i>
	<i>m</i>
	<i>m</i>
	<i>s</i>
	<i>s</i>
	<i>quint</i>
	<i>dd</i>
	<i>t</i>
	<i>s</i>
	<i>d</i>
	<i>s</i>
δ	<i>J</i>

TABELA 4.17

Carbono	2-hidroxi-epiisobacunoato de metila isolado
----------------	--

TABELA 4.18

Carbono	δ_c	HSQC	HMBC
----------------	------------------------------	-------------	-------------

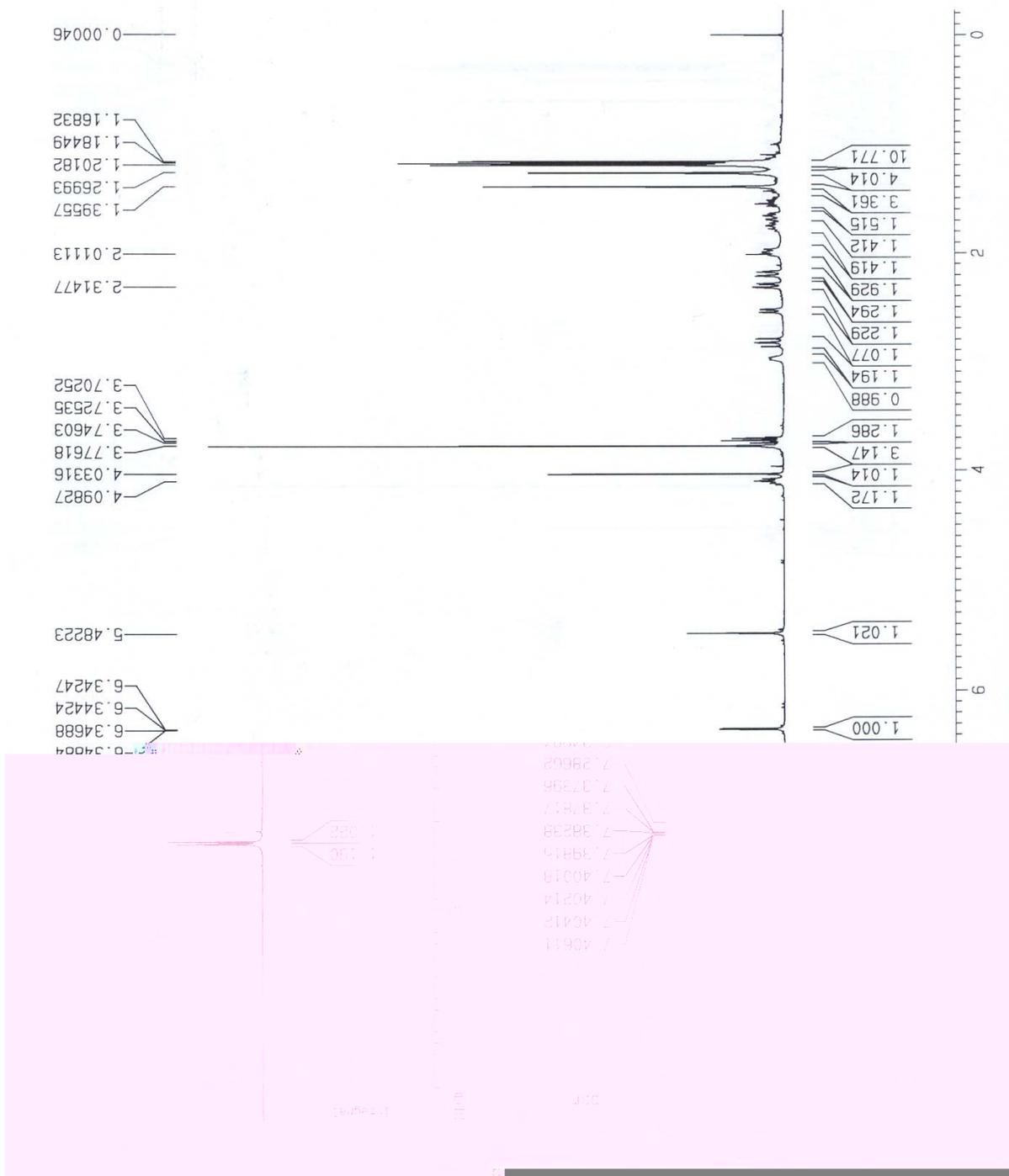


FIGURA 4.48:

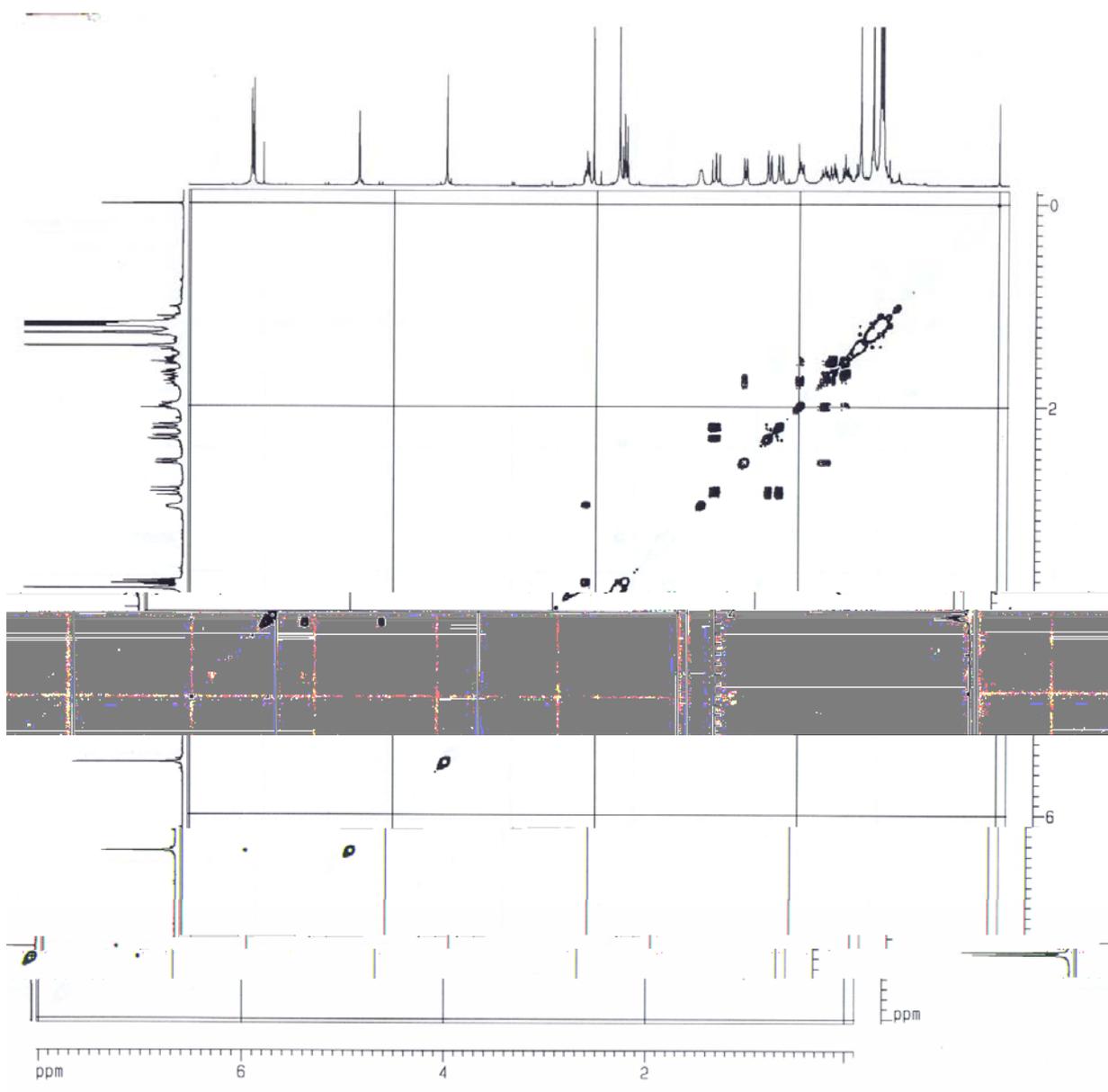


FIGURA 4.49:

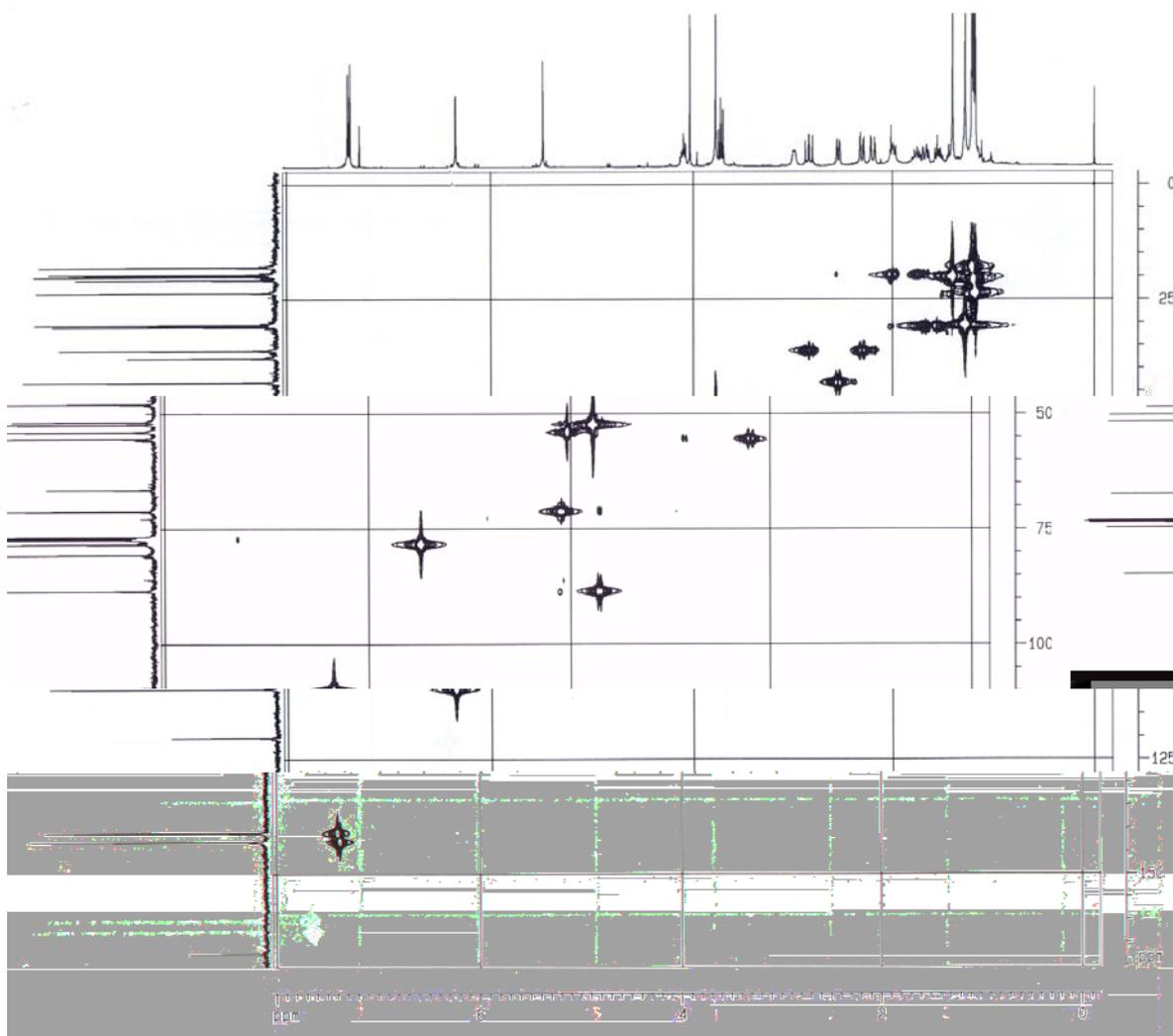


FIGURA 4.50:

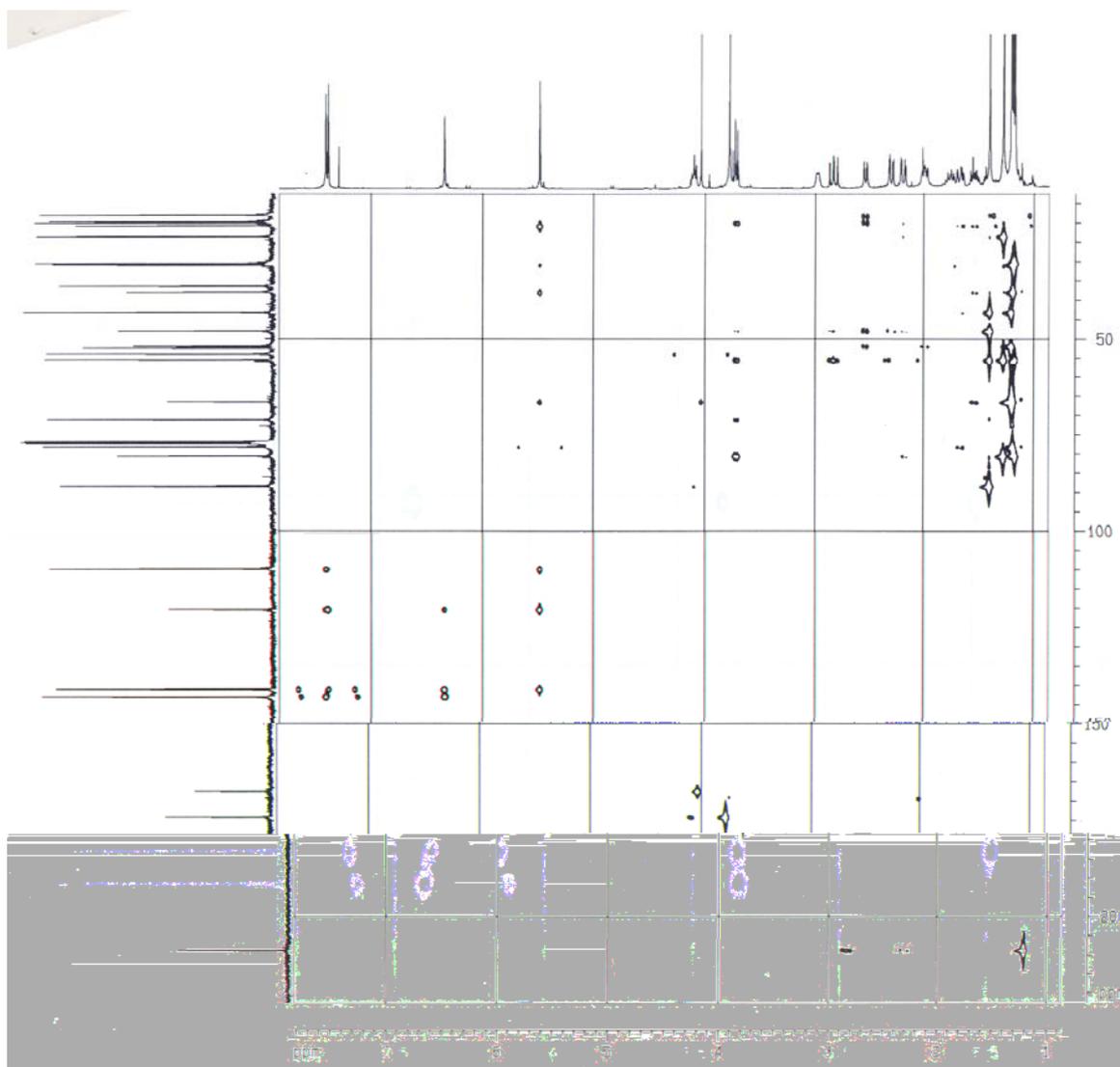


FIGURA 4.51:

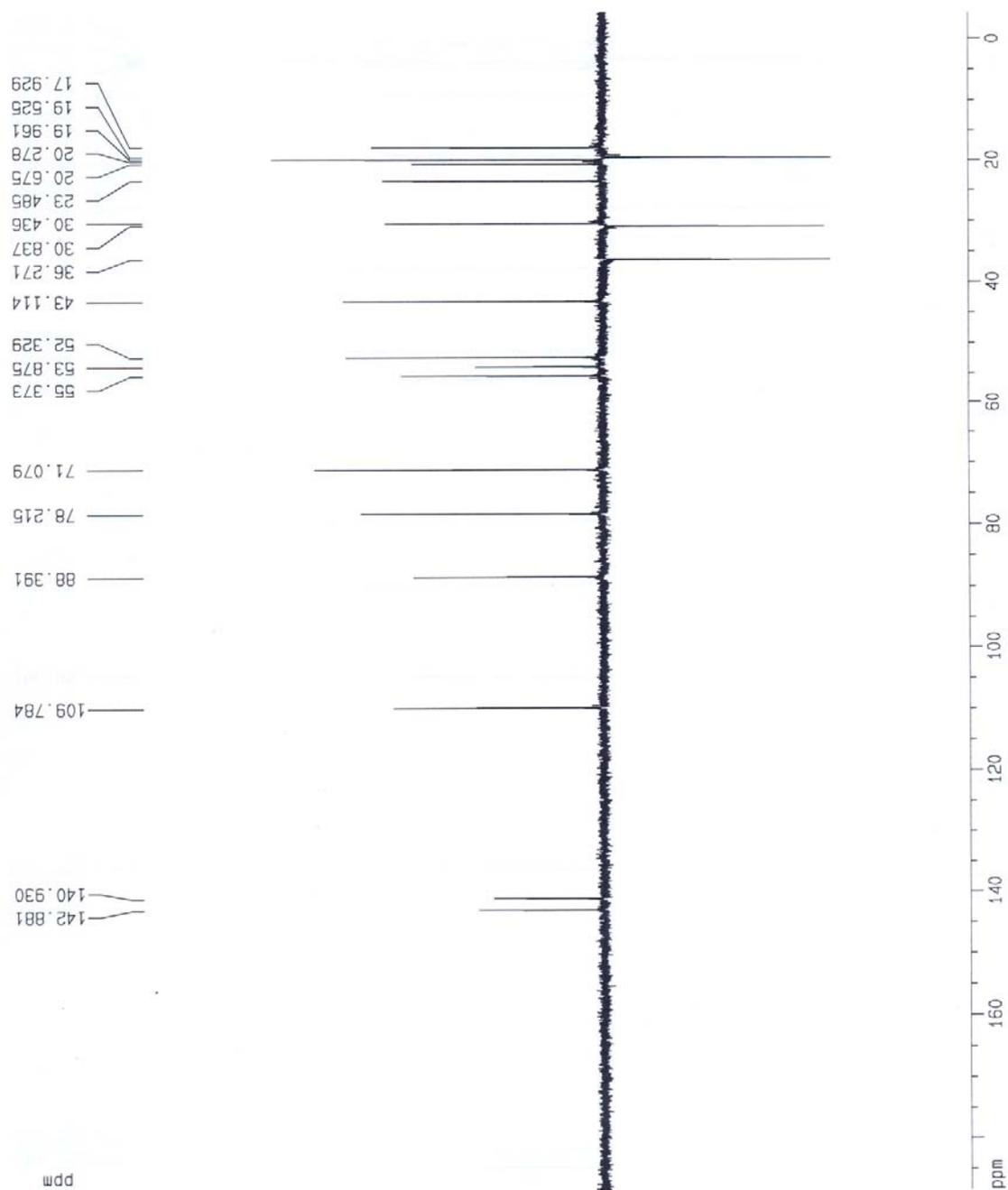


FIGURA 4.52:

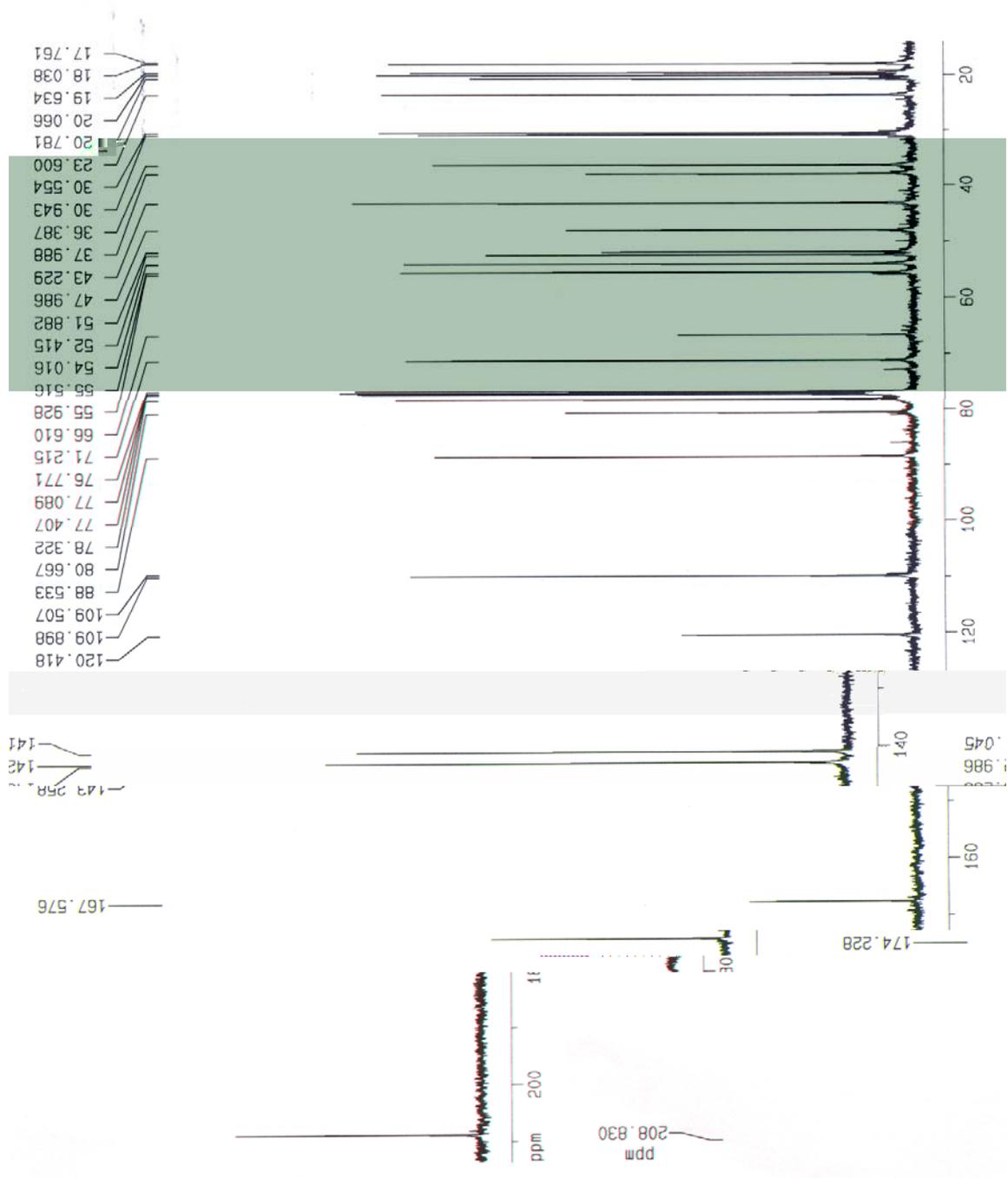


FIGURA 4.53:

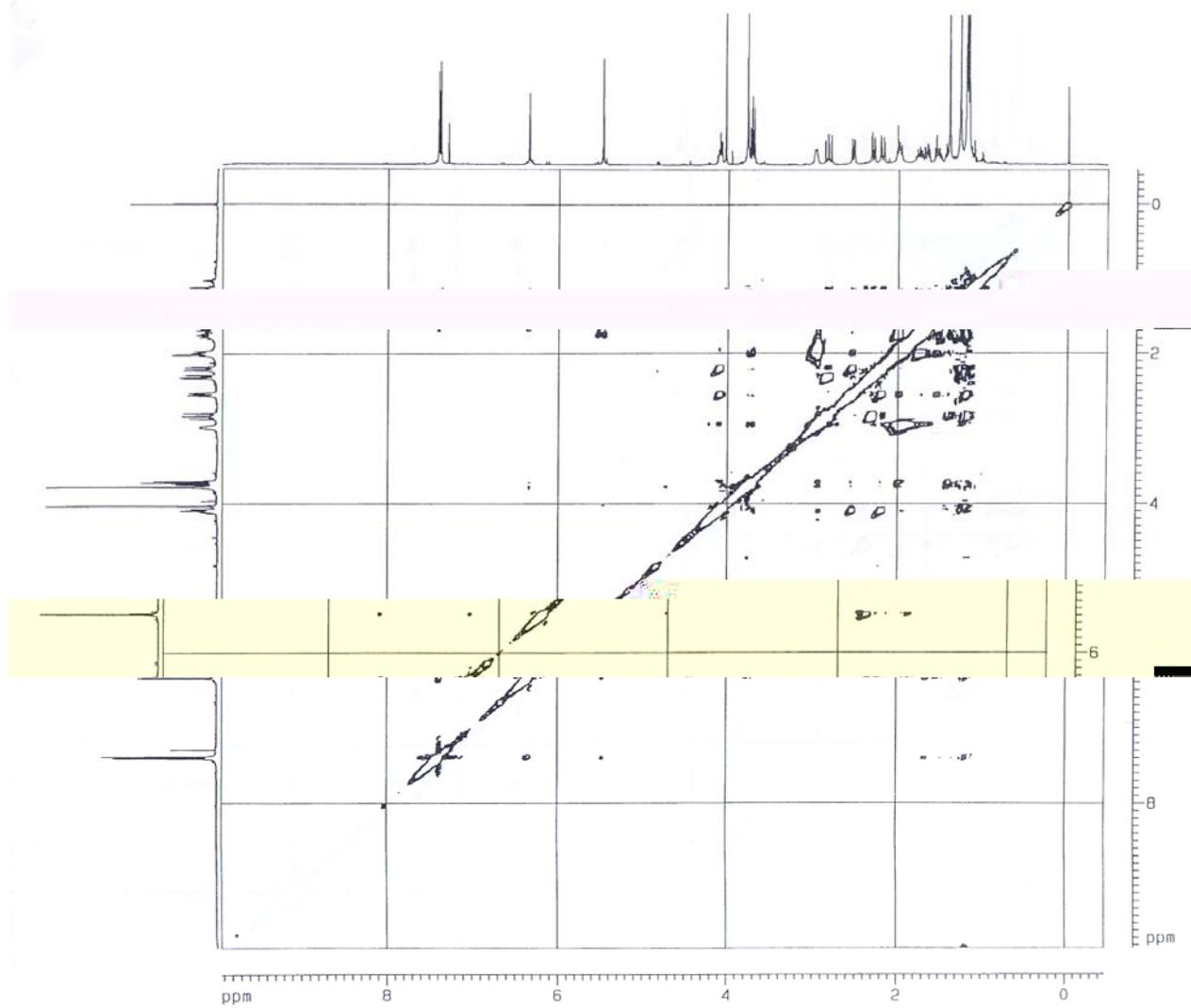


FIGURA 4.54:

FIGURA 4.55

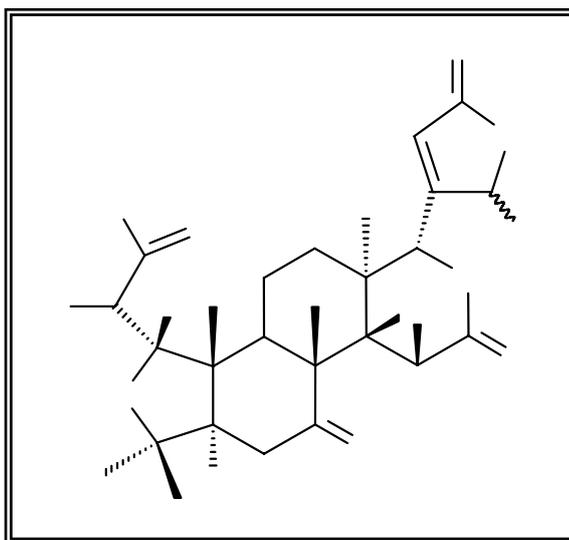


FIGURA 4.55

FIGURA 4.58

δ

δ

FIGURA 4.59

δ

δ

δ

FIGURA 4.60

FIGURA 4.56

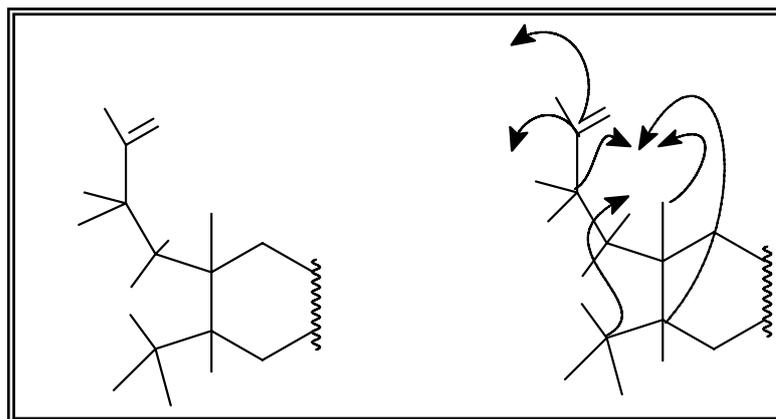


FIGURA 4.56

TABELAS 4.19-21

	FIGURA 4.61	FIGURA
4.62	FIGURA 4.63	
FIGURA 4.64		
	δ	<i>quint</i> δ
<i>t</i>		<i>dd</i> δ
	δ	δ

FIGURA 4.57

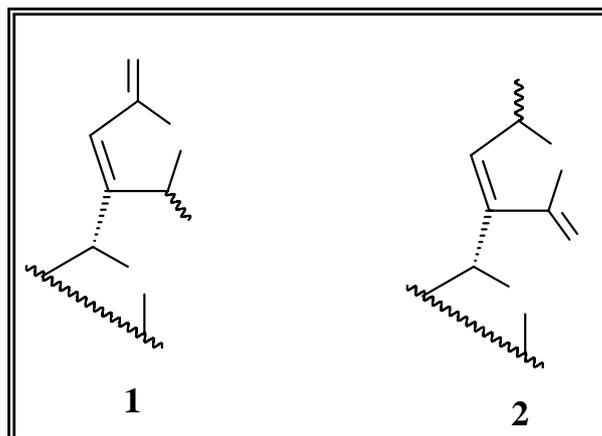
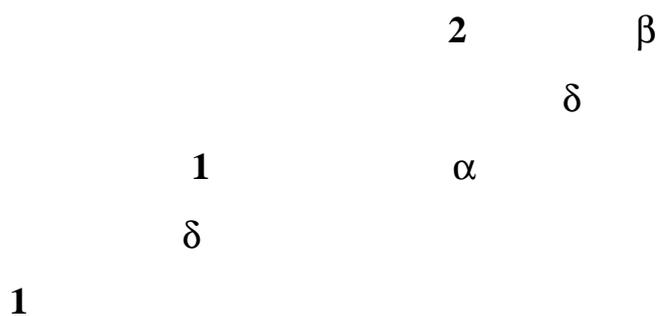


FIGURA 4.57



2,21-

DIHIDROXI-23-OXOEPIISOOBACUNOATO DE METILA

TABELA 4.20

Carbono	2,21-dihidroxi-23-oxoepiisobacunoato de metila isolado
----------------	---

TABELA 4.21

δ



FIGURA 4.58:

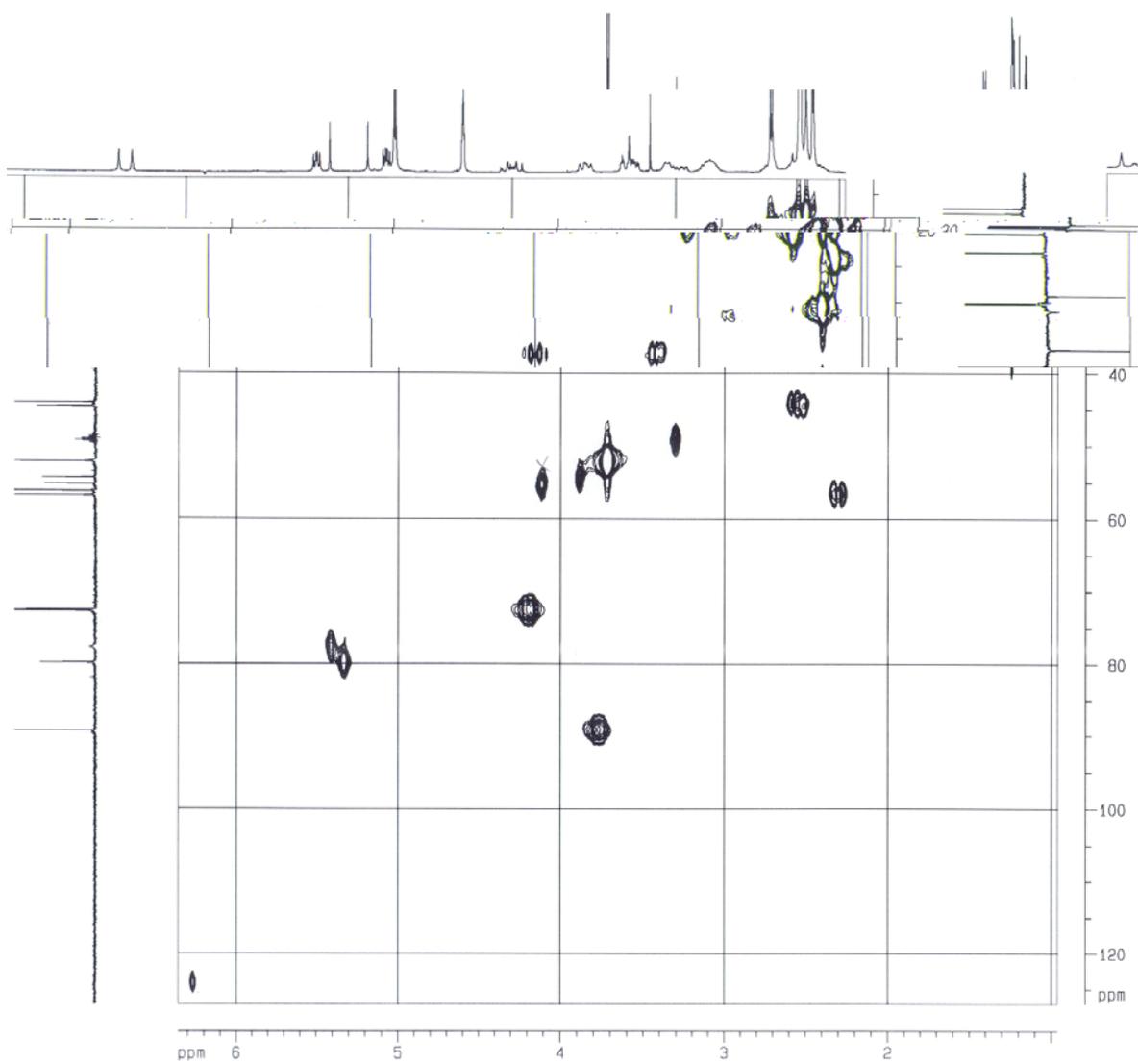


FIGURA 4.59:

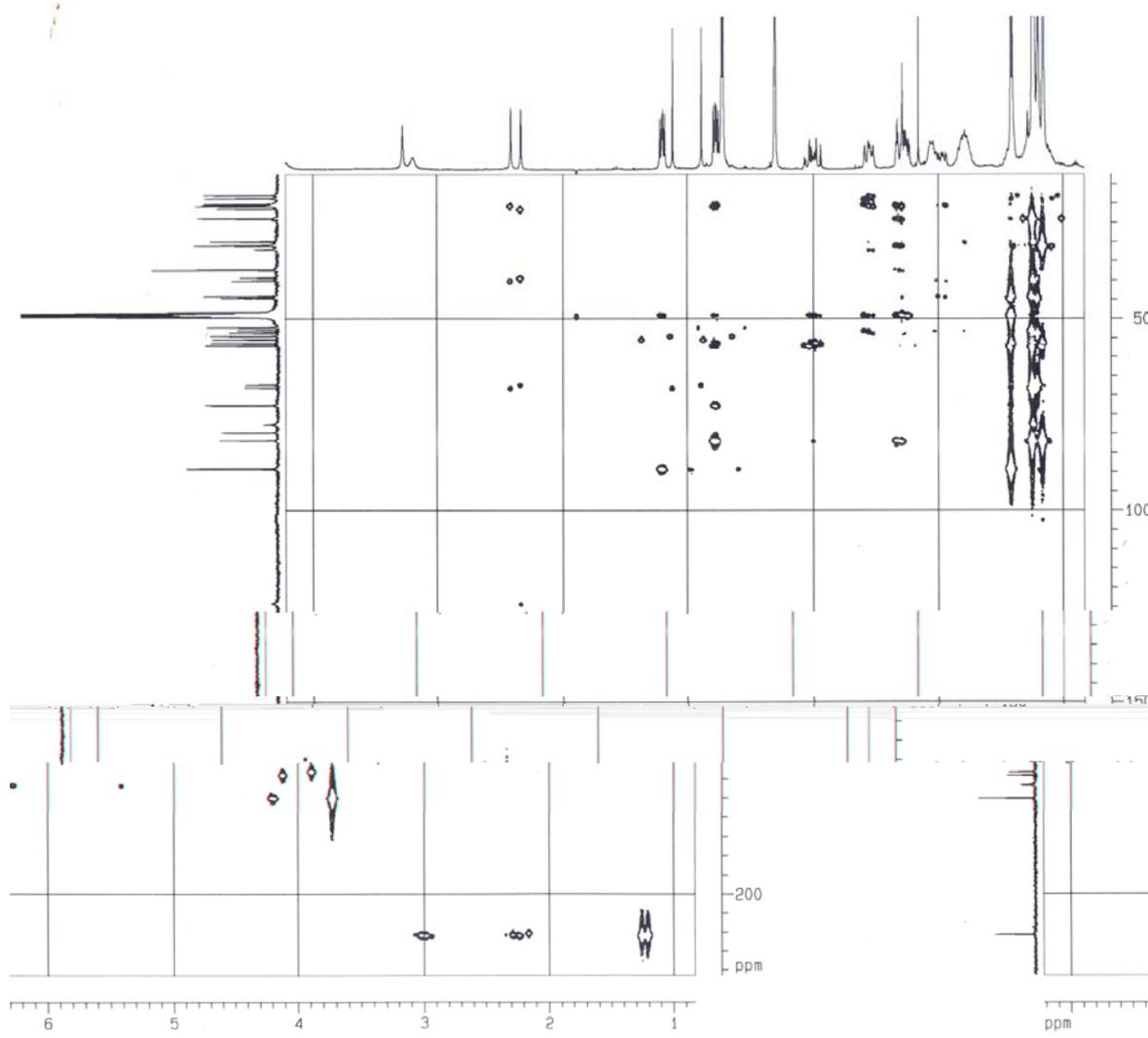


FIGURA 4.60:

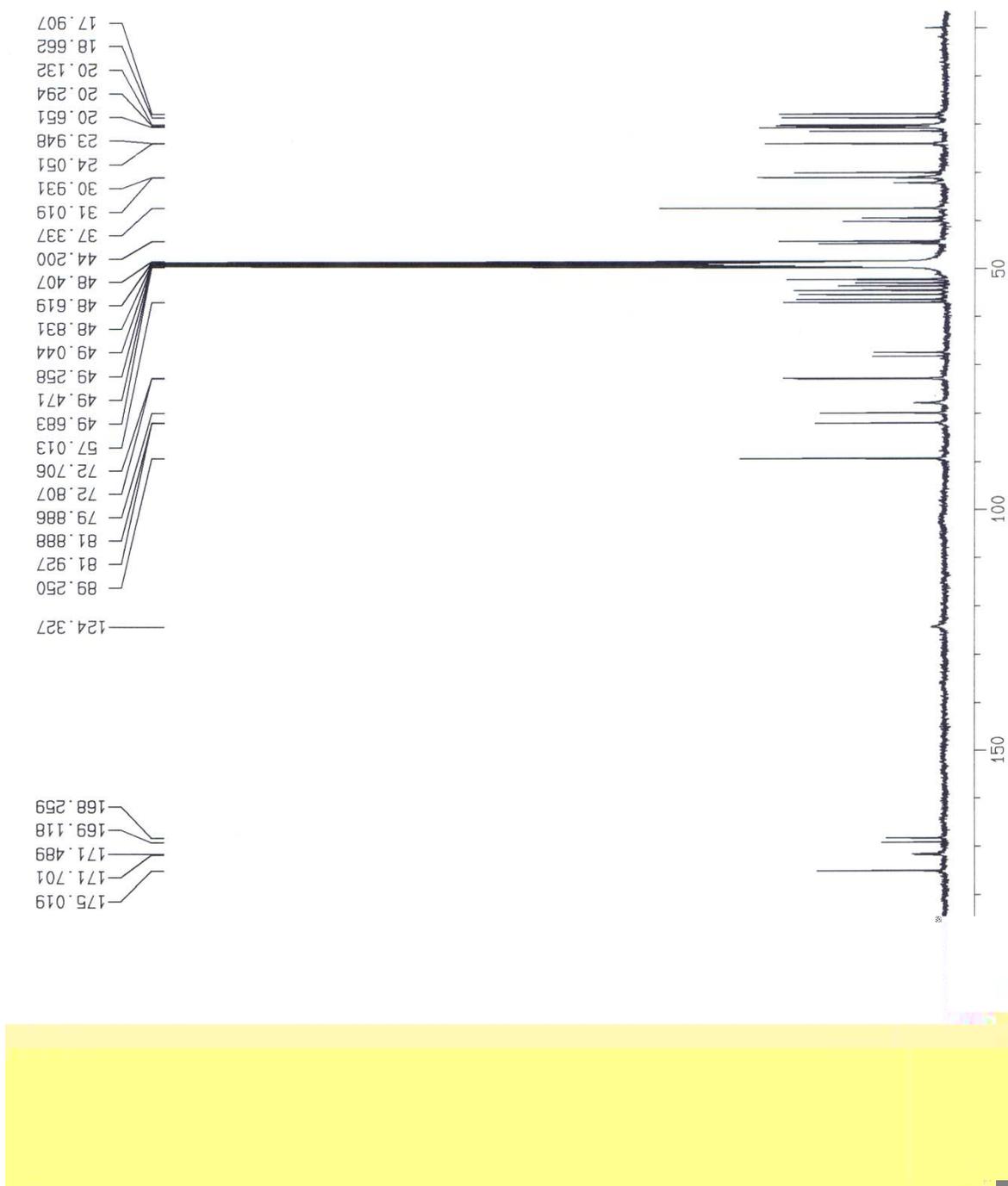


FIGURA 4.61:

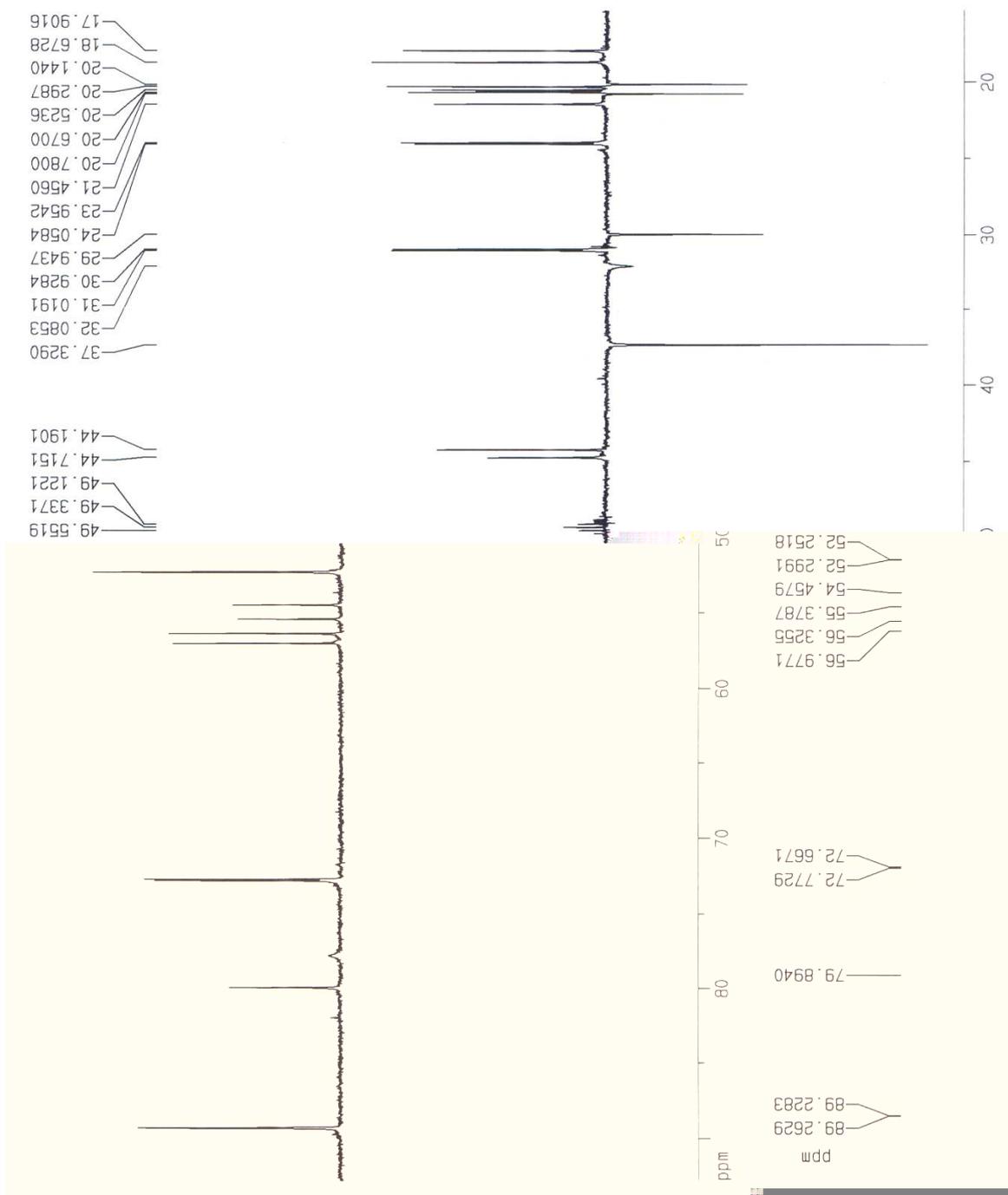


FIGURA 4.62:

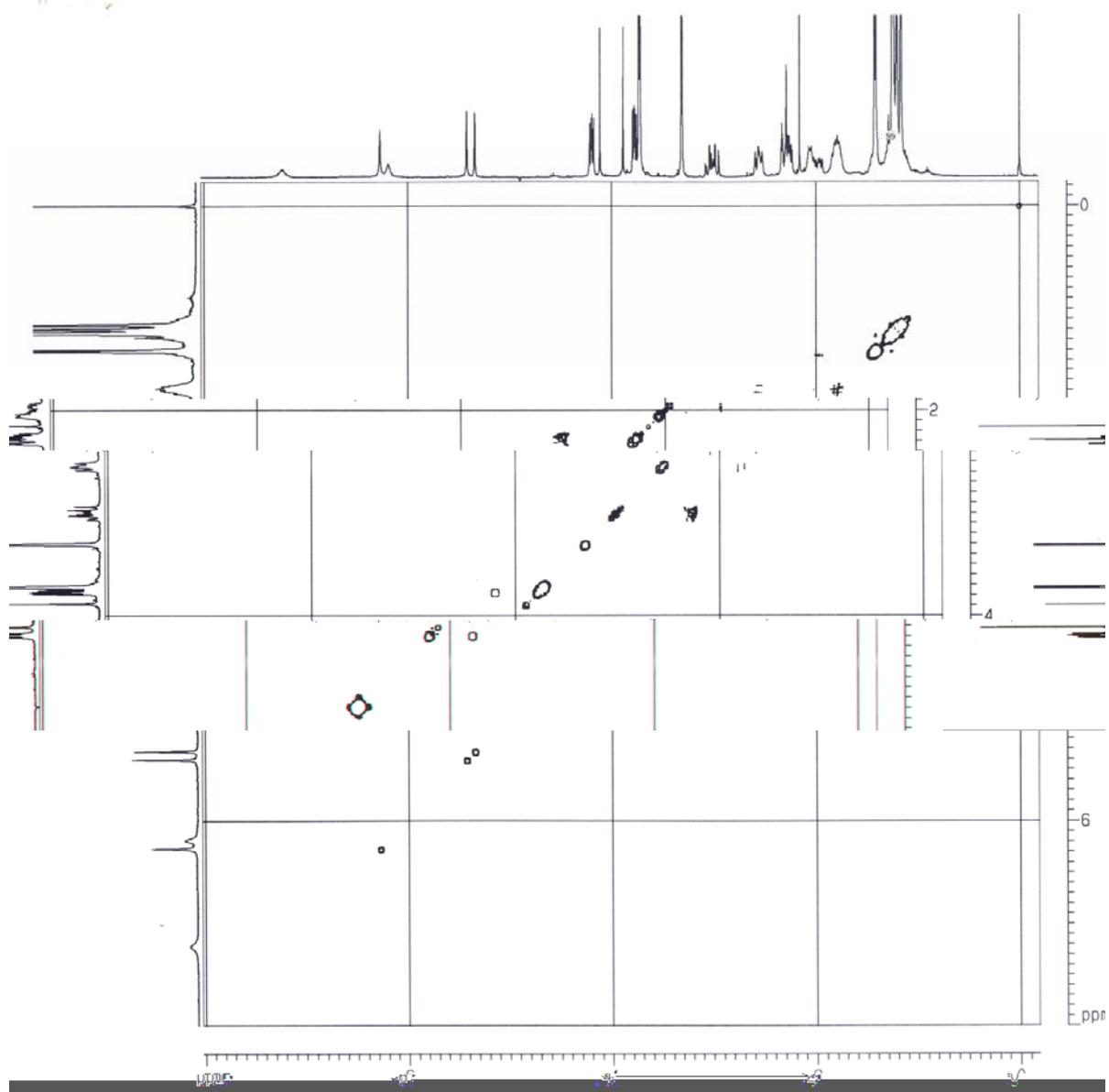


FIGURA 4.63:

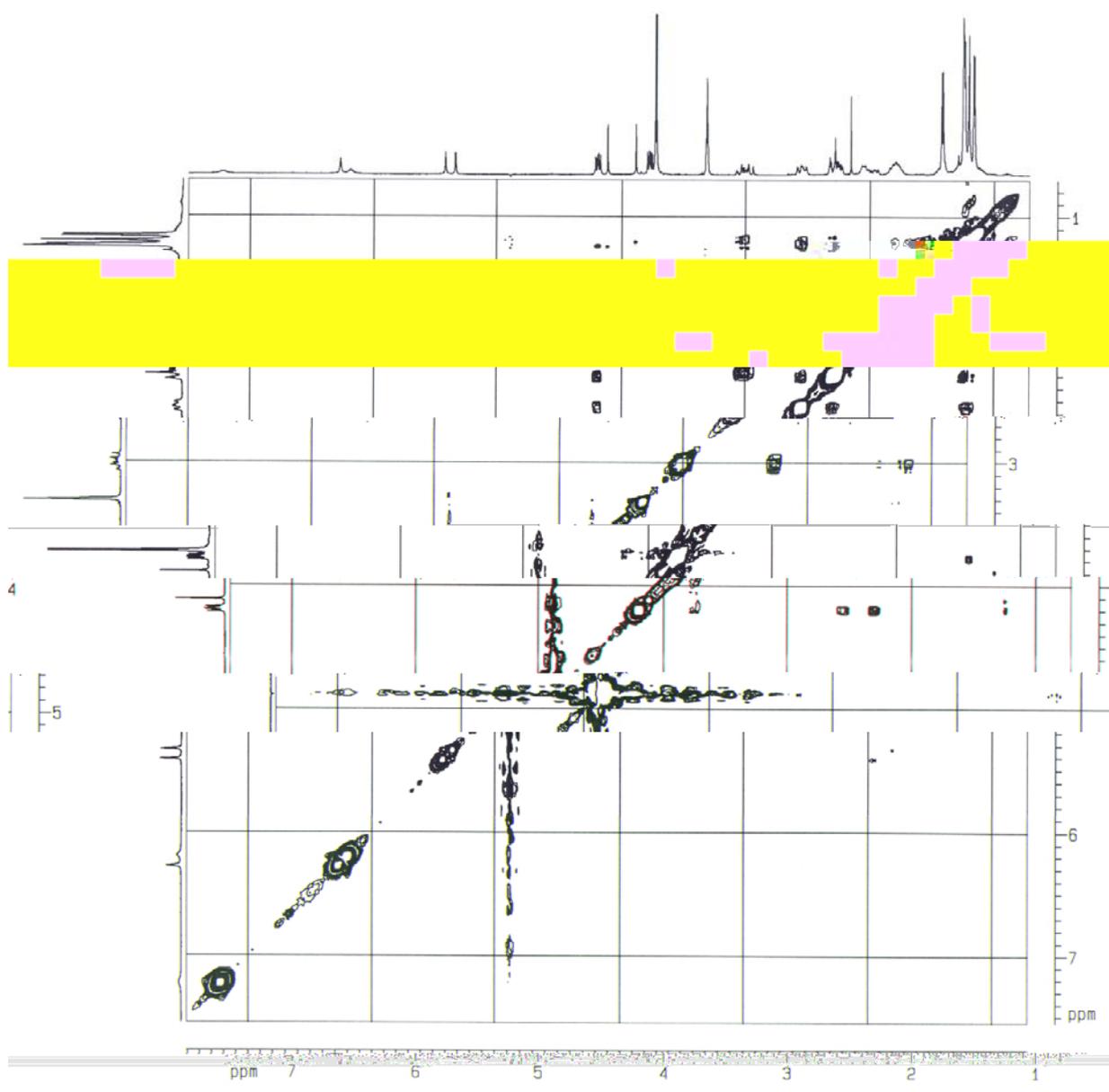


FIGURA 4.64:

FIGURA 4.65

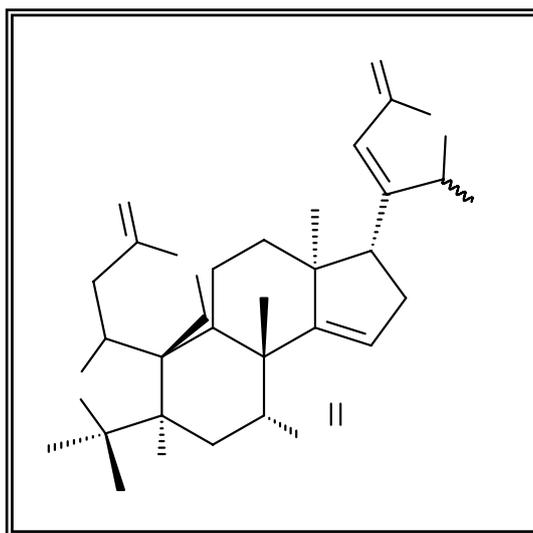


FIGURA 4.65

FIGURA 4.70

δ

FIGURA 4.71

δ

δ

δ

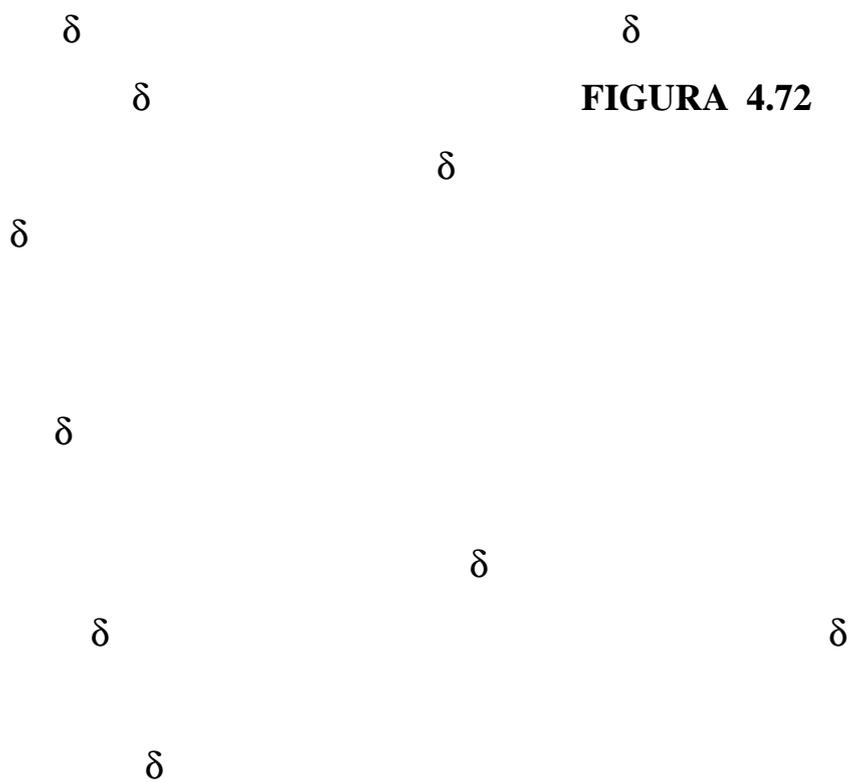


FIGURA 4.66

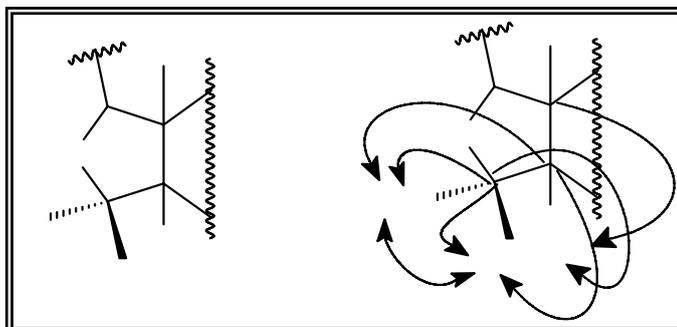


FIGURA 4.66



FIGURA 4.73

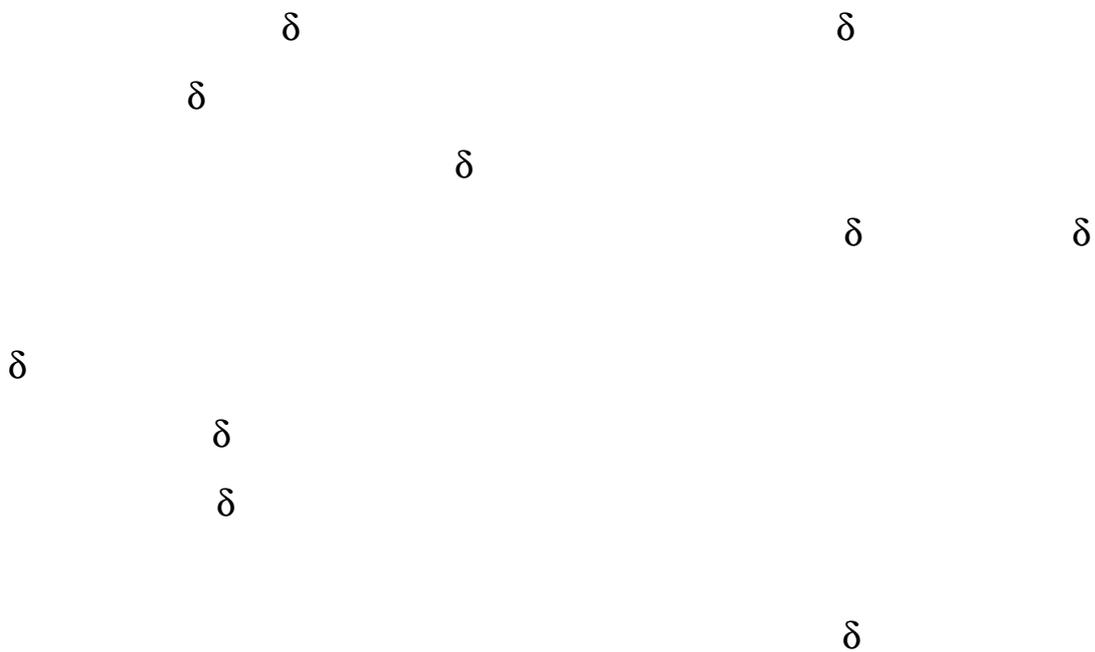


FIGURA 4.67

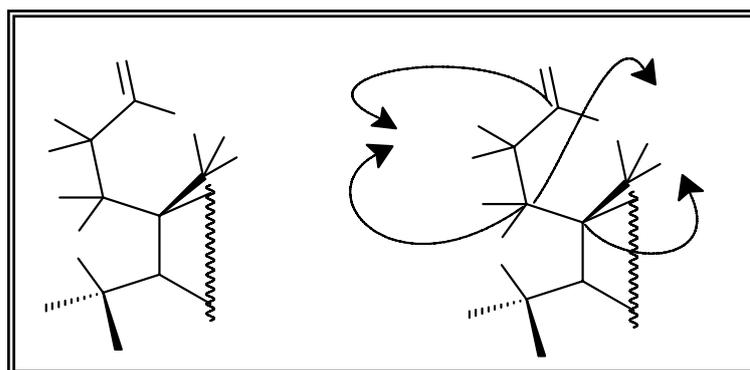


FIGURA 4.67

δ

δ

δ

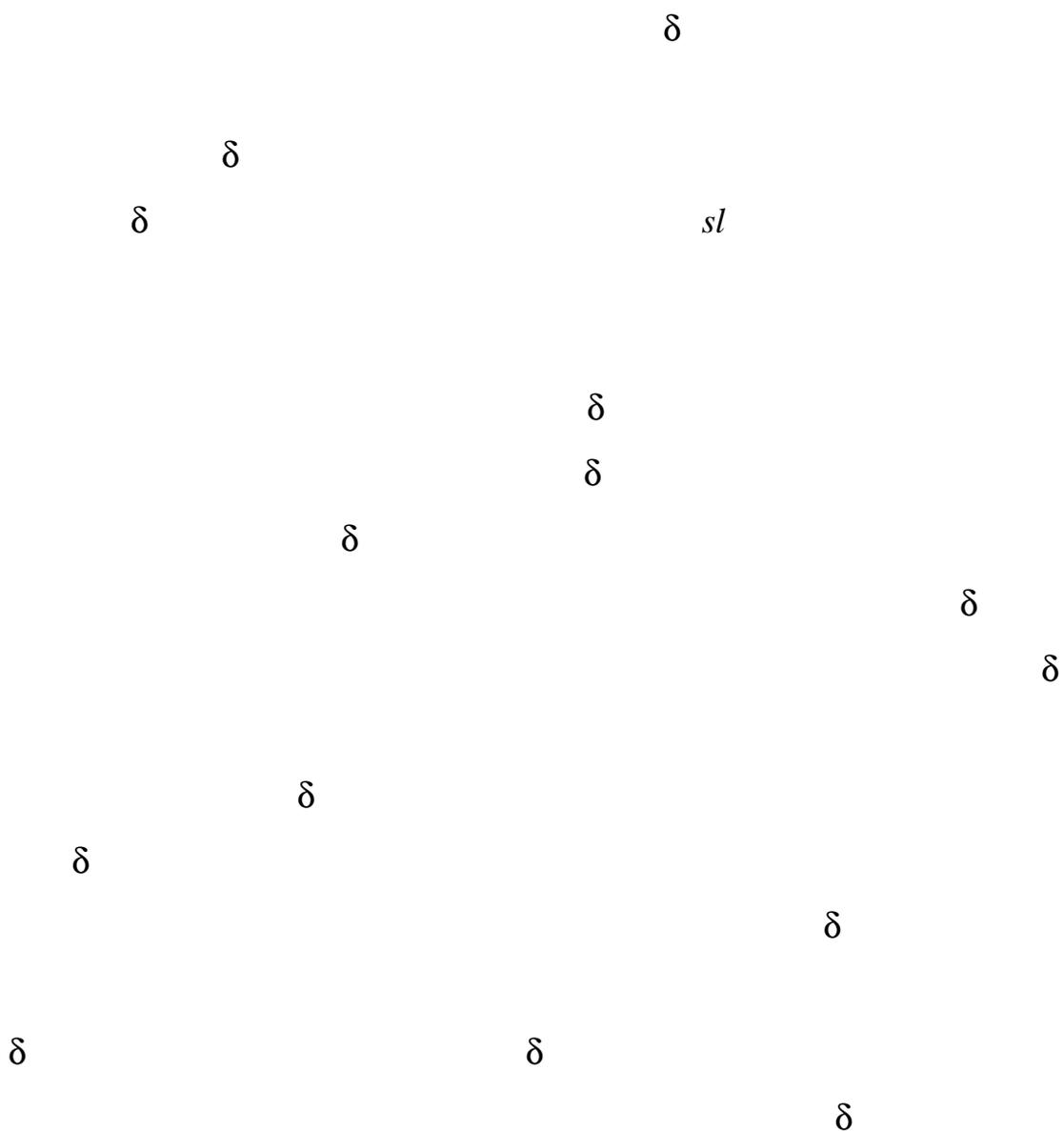


FIGURA 4.68

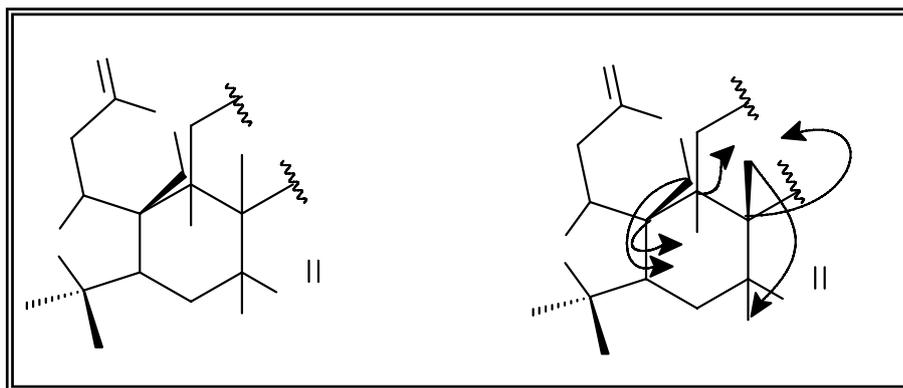


FIGURA 4.68

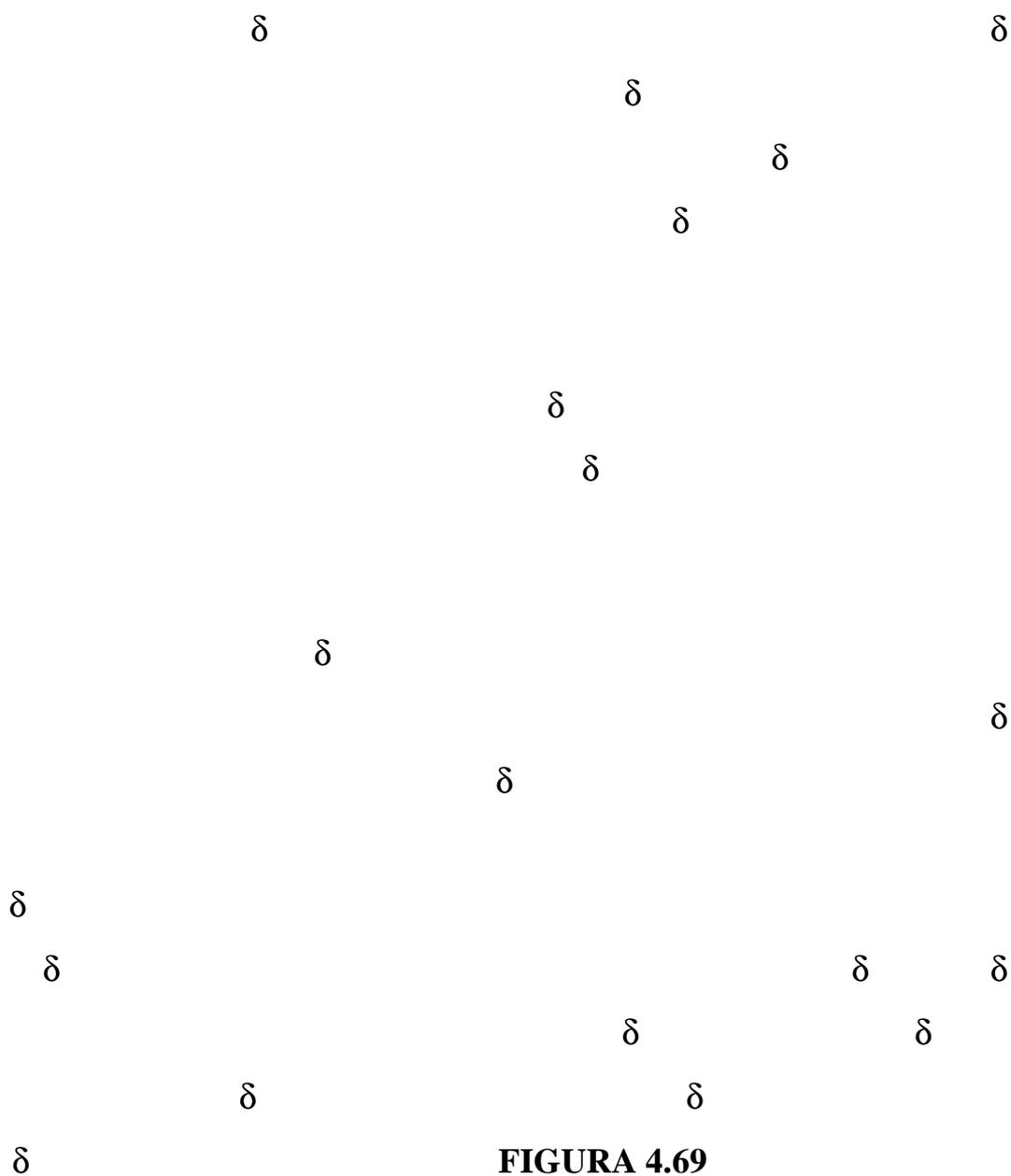


FIGURA 4.69

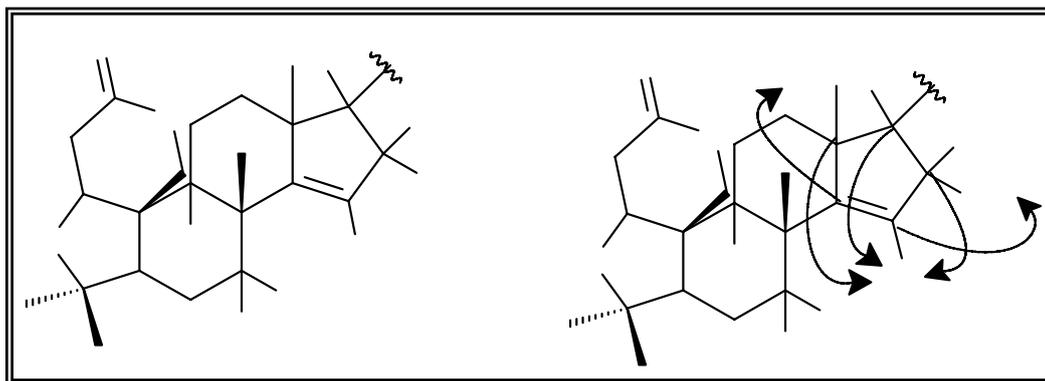


FIGURA 4.69

FIGURA 4.74

TABELAS

4.22-24

21-HIDROXI-23-OXOTECLEANINO

7-ACETIL-

TABELA 4.22

Hidrogênio	7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino isolado	COSY
	<i>sl</i>	
	<i>d</i>	
	<i>t</i>	
	<i>d</i>	
	<i>m</i>	
	<i>sl</i>	
	<i>m</i>	
	<i>m</i>	
	<i>m</i>	
	<i>dl</i>	
	<i>m</i>	
	<i>m</i>	
	<i>m</i>	
	<i>sl</i>	
	<i>s</i>	
δ	<i>J</i>	

TABELA 4.23

Carbono	7-acetil-21-hidroxi-23-oxotecleanino isolado
----------------	---

TABELA 4.24

δ

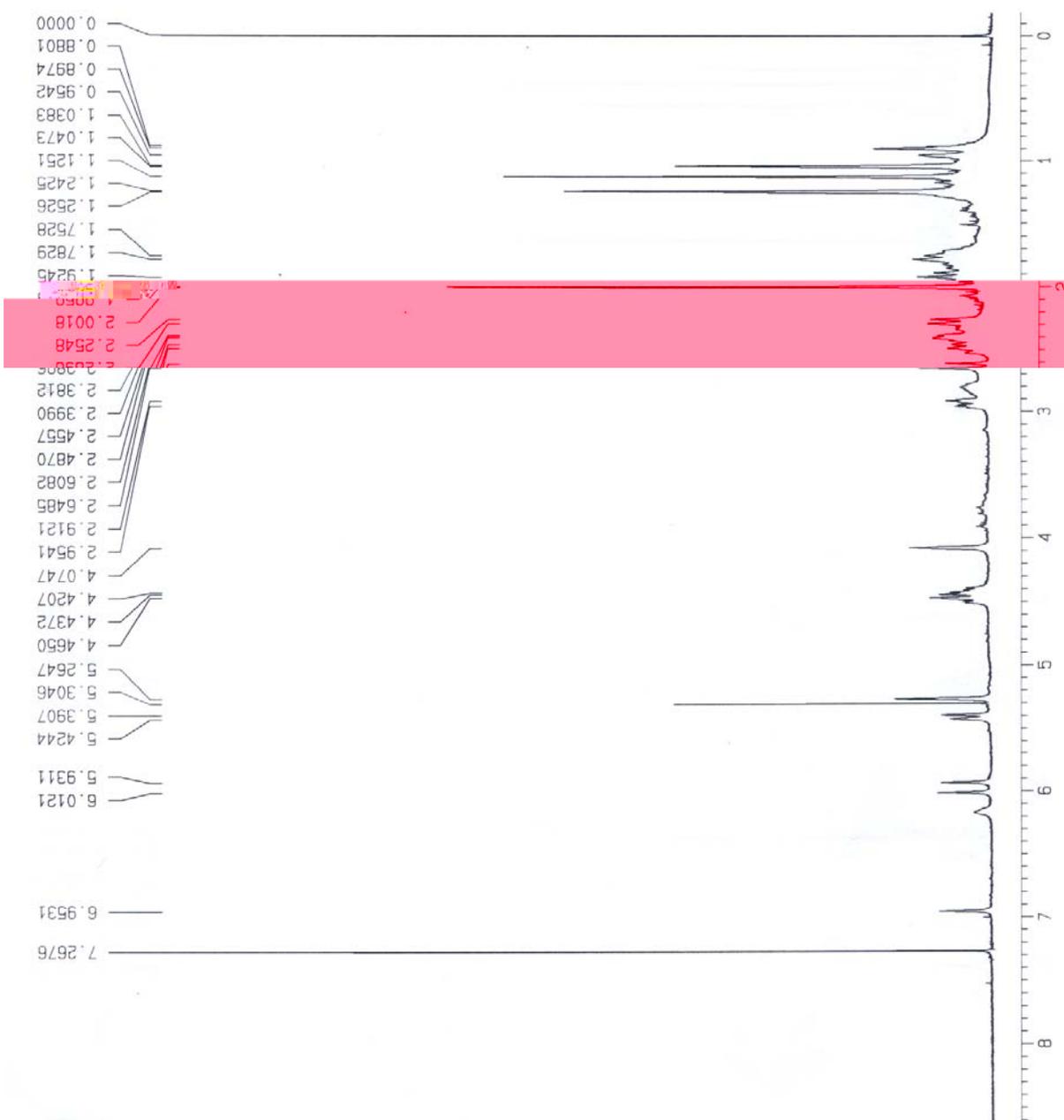


FIGURA 4.70:

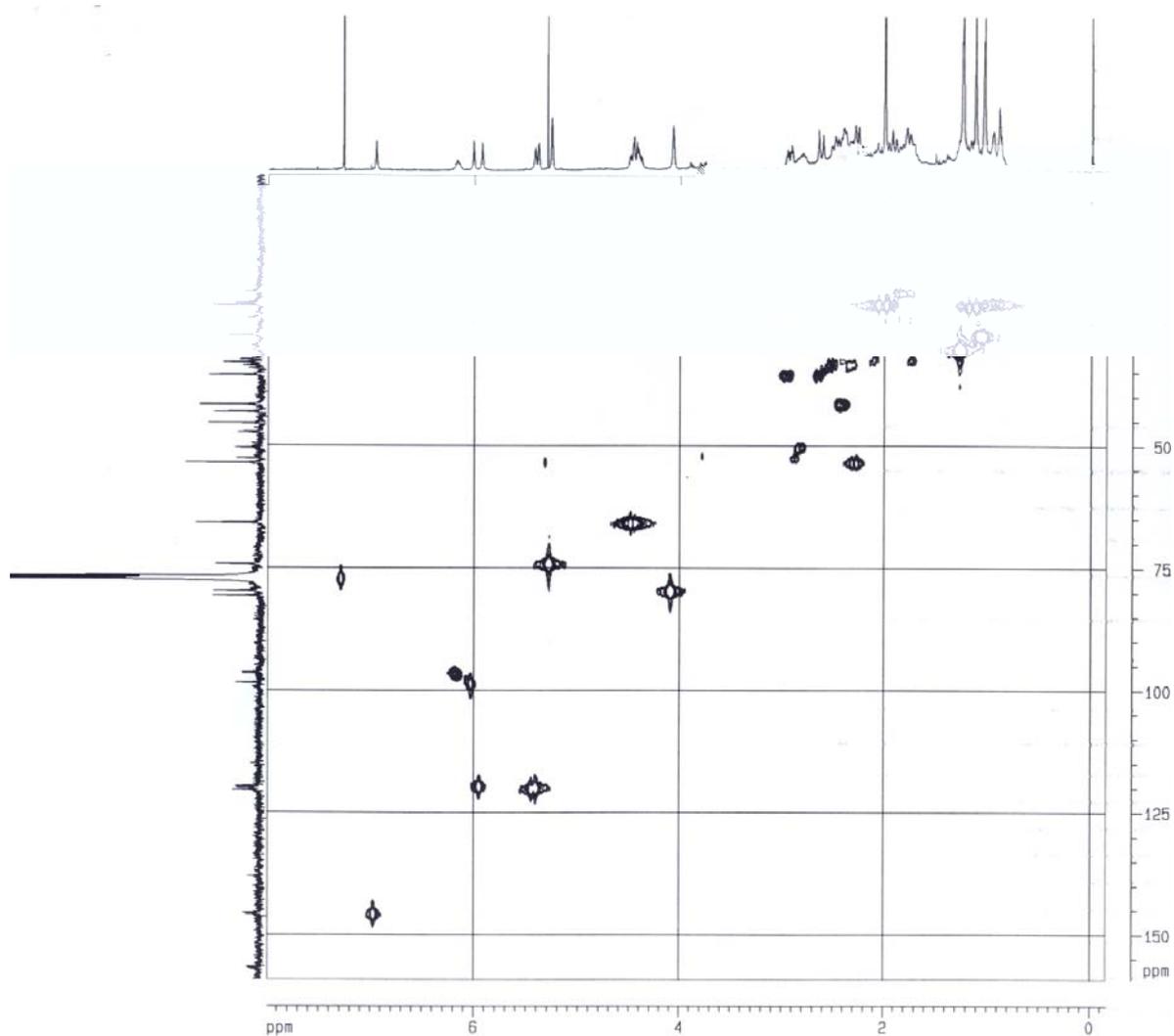


FIGURA 4.71:

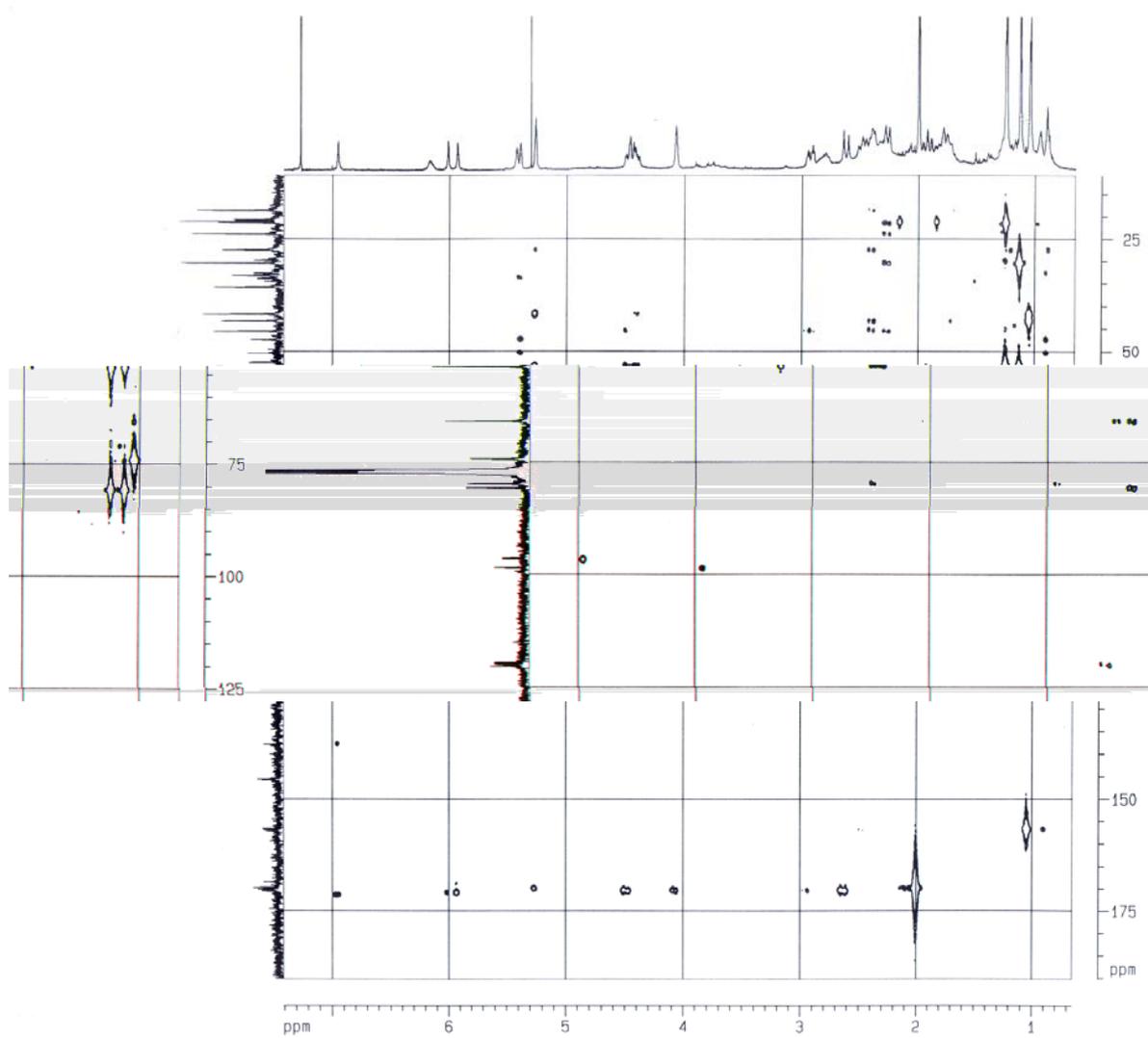


FIGURA 4.72:

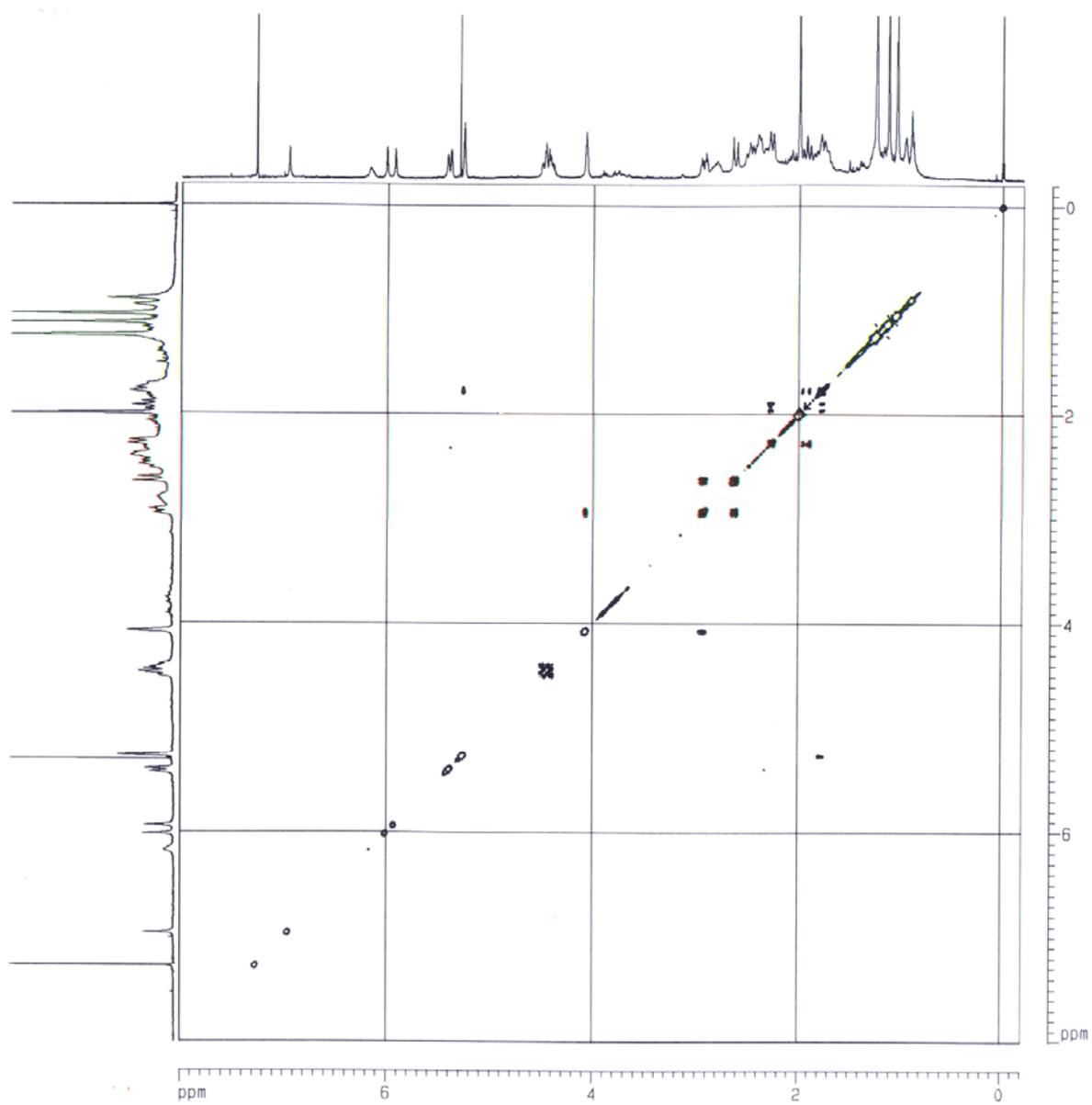


FIGURA 4.73:

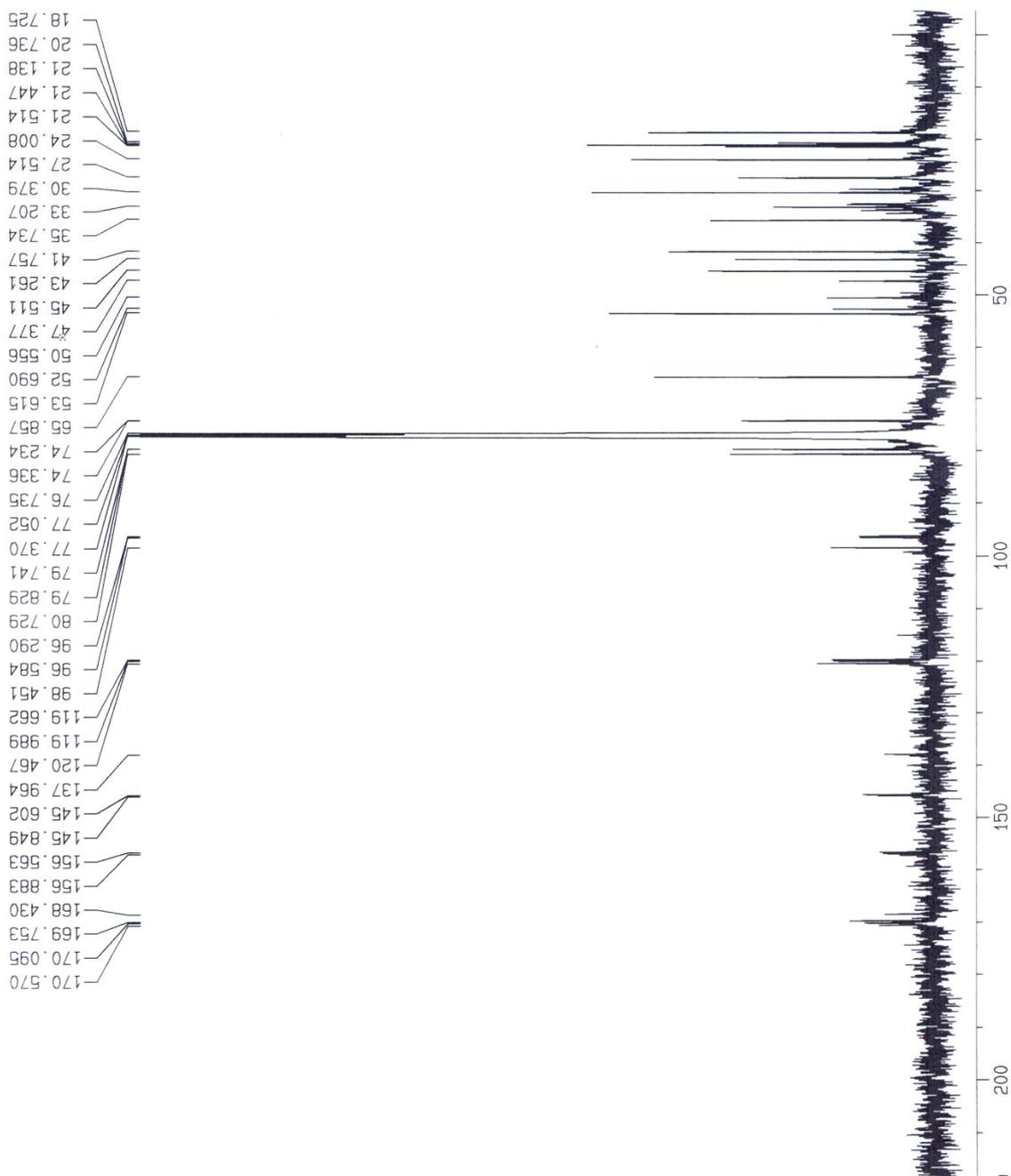


FIGURA 4.74:

5 – CONCLUSÕES

Citrus limonia

C. sinensis

Guignardia citricarpa

C. sinensis

C. limonia

μ

μ

C. sinensis

C. limonia

C. sinensis

C. limonia

Nycticalanthus speciosus

γ

Nycticalanthus speciosus

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*Manual Técnico de Procedimentos da
Mancha Preta dos Citros*

Carbon-13 NMR of Flavonoids

Tetrahedron

Citros

Phytochemistry

*Atalantia racemosa
Phytochemistry*

*Avaliação Química dos Componentes Não Voláteis e
Voláteis e Estudo Biossintético do 4-Nerolidilcatecol em Potomorphe
Umbellata (Piperaceae)*

Methods in Enzymology

*Guignardia citricarpa Kiely: genética, cariotípica e
interação com o hospedeiro.*

Micromelum zeylanicum Phytochemistry

Analytical Biochemistry

Amyris balsamifera

Phytochemistry

Efeito de Extratos de Albedo de Laranja (Citrus sinensis) Indutores de Resistência Ácido Salicílico, Acilbenzolar-S-meil e Saccharomyces cerevisiae no controle de Phyllosticta citricarpa (telemorfo: Guignardia citricarpa)

Glycosmis arborea Phytochemistry

Citrus limonia Phytochemistry

Maytenus aquifolium

Salacia campestris Phytochemistry

Hortia colombiana Revista Colombiana de Química

Enzymes,

Enzyme Assays

Methods in Enzymology

Die

Natürlichen Pflanzenfamilien

Atalantia ceylanica

Journal Chemical Society

Perkin I.

Citrus: *Estudo Comparativo de Pré-Francos e Enxertos do Gênero*

Variabilidade Genética do Fungo Endofítico Guignardia citricarpa Kiely Detectada POR RAPD

Laranja

Ruta Pinnata Phytochemistry

Citrus roots Phytochemistry

Phytochemistry

Phytochemistry

Ammi majus

Phytochemistry

Phytochemistry

Phellodendron amurense

Glycosmis citrifolia

Chemical & pharmaceutical bulletin

Citrus black
Proceedings of International Society of Citriculture

Citros

Experimental Mycology

Citrus

Citros

Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família

Rutaceae

Citros

Journal Natural

Products

Guignardia citricarpa

Phytopathology

citricarpa

Guignardia

Phytopathology

aduncum L

Estudo químico, biológico e biossintético em Piper

Hesperethusa crenulata Phytochemistry

Coumarins of Umbelliferous Plants

Rodriguésia

Busca de compostos anthichagasicos e leishmanicidas, através do estudo de espécies das famílias Myrsinaceae e Rutaceae, e o isolamento e a quantificação de azadirachtina em sementes de Azadirachta indica.

Proceedings.

Citros

Comptonella sessifolia Planta Médica

Busca de Substâncias Bioativas em Plantas Amazônicas: Adiscanthus fusciflorus (Rutaceae), Trichilia pallida e T. rubra (Meliaceae)

Citricultura brasileira

Fundamentals of Enzymology

Pflanzenfamilien

Syllabus der

Plant Systematics and Evolution

Tetrahedron

Citros

Citrus

Chemical & Pharmaceutical Bulletin

Citrus

Citros

Citrus

Phytochemistry

A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. Journal of Microbiological Methods

In vitro

Humulus lupulus *Phytochemistry*

Biochemical Systematics and Ecology

Chemistry and Chemical Taxonomy

of The Rutales

Citrus depressa

Chemical Pharmaceutical Bulletin

Citrus sinensis *brasiliensis*

Chemical Pharmaceutical Bulletin,

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)