

KARIN FABIANA BANDEIRA DE CAMARGO

Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em
quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana*:
avaliação da produção em diferentes órgãos e
em extratos enzimáticos

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara
2008

KARIN FABIANA BANDEIRA DE CAMARGO

Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em
quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana*:
avaliação da produção em diferentes órgãos e
em extratos enzimáticos

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara
2008

KARIN FABIANA BANDEIRA DE CAMARGO

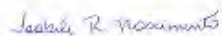
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 28 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA



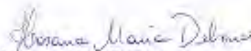
Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara




Prof. Dr. Isabelle Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Fernando Balista da Costa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Hosana Maria Deborsi
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Fernanda Rodrigues Garcez
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – UFMS, Campo Grande

1. Dados Pessoais

Nome: Karin Fabiana Bandeira de Camargo

Filiação: Francisco Coutinho de Assis Bandeira Neto e Maria de Lourdes dos Santos Bandeira

Nascimento: 18/07/1977 - Rio Claro/SP - Brasil

Estado Civil: Casada

2. Formação Acadêmica/Titulação

1998 – 2001 Bacharelado em Química Tecnológica
Instituto de Química - UNESP/Araraquara

2002 – 2004 Mestrado em Química
Instituto de Química - UNESP/Araraquara
Bolsista CNPq

2004 – 2008 Doutorado em Química
Instituto de Química - UNESP/Araraquara
Bolsista CNPq

3. Cursos

1999 - Lixiviação de Metais por Bactérias (4h)
XXIX Semana da Química (Instituto de Química - UNESP/Araraquara)

1999 - Síntese, Caracterização e Aplicação de Compostos de Coordenação no Tratamento do Câncer (8h)
XXIX Semana da Química (Instituto de Química - UNESP/Araraquara)

1999 - Gestão de Qualidade Total (8h)
Instituto de Química - UNESP/Araraquara

2000 - Enzimas de Uso Industrial (16h)
XXX Semana da Química (Instituto de Química - UNESP/Araraquara)

2000 – EMP - Orientação para o Crédito (16h)
Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE

2000 - Metrologia Química como Ferramenta para a Qualidade Total (30h)
Programa Química Integradas Instituto de Química - UNESP/Araraquara

2005 - Atividades Anímicas e Biodiversidade – um caminho para a Educação Ambiental (4,5h)
V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp em Águas de Lindóia

2005 - Gerenciamento de Resíduos Químicos em Laboratórios (6h)
13º Encontro Nacional de Química Analítica/ 1º Congresso Ibero - Americano de Química Analítica na Universidade Federal Fluminense Niterói - RJ

4. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais

1. BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Quaternary aporphine alkaloids from *Cryptocarya mandioccana*, 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro.
2. MARTINELLI, F. R., CAVALHEIRO, A. J., BANDEIRA, K. F., TELASCREA, M., ASSONUMA, M.M., YOUNG, M. C. M., GIANNINI, M. J. S. M. Anti-fungal and acetylcholinesterase inhibitor action of the goniothalamin and its derivatives isolated from *C. moschata*, 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro.
3. BOMFIM, G. C. C., VIEIRA JÚNIOR, G. M., SANTOS, A. G., BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Extraction methodology of *Casearia sylvestris* using response surface, 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro.
4. BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Validação de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de flavonóides e estilipironas em *Cryptocarya mandioccana*, 30^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.
5. MARTINELLI, F. R., ASSONUMA, M.M., BANDEIRA, K. F., TELASCREA, M., CAVALHEIRO, A. J. Novas substâncias isoladas de folhas de *Cryptocarya moschata* relacionadas com a biossíntese e a fotodimerização de estilipironas, 30^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.
6. BANDEIRA, K. F., TELASCREA, M., ASSONUMA, M.M., CAVALHEIRO, A. J. Desenvolvimento de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estilipironas em *Cryptocarya mandioccana*, II SIMPÓSIO DE CROMATOGRAFIA (SIMCRO), 2006, São Pedro.
7. MARTINELLI, F. R., BANDEIRA, K. F., TELASCREA, M., CAVALHEIRO, A. J. Desenvolvimento de método cromatográfico para o isolamento de substâncias das folhas de *C. moschata*, II SIMPÓSIO DE CROMATOGRAFIA (SIMCRO), 2006, São Pedro.
8. BURGOS, R. C. R., CAVALHEIRO, A. J., SILVA, G. H., BANDEIRA, K. F., ZOCCOLO, G. J. Estudo fitoquímico dos frutos de *Cryptocarya mandioccana* (Lauraceae), I ESCOLA DE INVERNO DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DA FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006, Ribeirão Preto.
9. BANDEIRA, K. F., TELASCREA, M., TININIS, A. G., ZOCCOLO, G. J., ASSONUMA, M.M., CAVALHEIRO, A. J. Otimização de condição cromatográfica para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estilipironas, 13^o. Encontro Nacional de Química Analítica e 1^o. Congresso Ibero - Americano de Química Analítica, 2005, Niterói.
10. ZOCCOLO, G. J., BANDEIRA, K. F., WANCZINSKI, A. E., TININIS, A. G., MARCHI, M. R. R., CAVALHEIRO, A. J. Desenvolvimento de método em CG-PFPA para análise de substâncias sulfuradas em *Petiveria alliacea* L, 13^o. Encontro Nacional de Química Analítica e 1^o. Congresso Ibero - Americano de Química Analítica, 2005, Niterói.

11. TININIS, A. G., BANDEIRA, K. F., PEREZ, C. C., ZOCOLO, G. J., SANTOS, A. G., CAVALHEIRO, A. J. Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de método cromatográfico (CLAE-DAD) para análise de casearinas em espécies do gênero *Casearia*, 13°. Encontro Nacional de Química Analítica e 1°. Congresso Ibero - Americano de Química Analítica, 2005, Niterói.
12. TININIS, A. G., PEREZ, C. C., ASSONUMA, M.M., BANDEIRA, K. F., SANTOS, A. G., CAVALHEIRO, A. J. Development and chemometrics optimization of an HPLC-DAD method designed for casearin analysis, 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2005, Estocolmo.
13. MANTOVANI, S. M., PASCOLI, I. C., ZOCOLO, G. J., BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Novo ácido olefínico policíclico de frutos de *Cryptocarya moschata*, 28ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
14. BANDEIRA, K. F., TININIS, A. G., CAVALHEIRO, A. J. Otimização e Comparação de Metodologias de Extração de Casearinas em *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae), 12°. Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís.
15. TININIS, A. G., PEREZ, C. C., ASSONUMA, M.M., BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Desenvolvimento, otimização e utilização de metodologia analítica cromatográfica para a análise de casearinas, 12°. Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís.
16. CAVALHEIRO, A. J., TININIS, A. G., PEREZ, C. C., BANDEIRA, K. F., ASSONUMA, M. M. Estudo fitoquímico em *Casearia sylvestris* SW, XXV Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática E Ecologia Micromoleculares, 2003, Campos do Jordão.
17. BANDEIRA, K. F., CAVALHEIRO, A. J. Otimização e Comparação de Metodologias para Extração de Casearinas em *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae), 26ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas.
18. BANDEIRA, K. F., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J. Otimização e Comparação de Metodologias para Extração de Casearinas em *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), III Simpósio do Programa Biota/Fapesp, 2002, São Carlos.
19. BANDEIRA, K. F., PEZZA, H. R. Desenvolvimento de spot test quantitativo para análise de hexametenotetramina por reflectância difusa, XIII Congresso de Iniciação Científica - UNESP, 2001, Bauru.

5. Trabalho Publicado

1. BANDEIRA, K. F. ; TININIS, A. G. ; BOLZANI, V. S. ; CAVALHEIRO, A. J. Optimisation of conditions for the extraction of casearins from *Casearia sylvestris* using response surface methodology. *Phytochemical Analysis*, v. 17, p. 168-175, 2006.

6. Conferência

1. Desenvolvimento de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estilipironas em *Cryptocarya mandioccana*, II SIMPÓSIO DE CROMATOGRAFIA (SIMCRO), 2006, São Pedro.

7. Premiação

Premiação do painel intitulado "Desenvolvimento de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estilipironas em *Cryptocarya mandioccana*", II SIMPÓSIO DE CROMATOGRAFIA (SIMCRO), 2006, São Pedro.

8. Estágios

Estágio Docência na Disciplina Química Orgânica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara
2º semestre de 2005

Estágio Docência na Disciplina Química Orgânica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara
1º semestre de 2005

Estágio Docência na Disciplina Métodos Analíticos em Química Orgânica II
Instituto de Química UNESP/Araraquara
1º semestre de 2003

Estágio Supervisionado na Indústria Citrosuco Paulista S/A
07/2001 - 10/2001

9. Colaboração em Projetos

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. **Simone Moraes Mantovani.** Perfil fitoquímico de frutos e de plântulas de *Cryptocarya moschata* germinadas em condições de luz e substrato controladas. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Instituto de Química - UNESP/Araraquara.

Iniciação Científica

1. **Márcio Yukio Ito.** Existe variação clinal no teor de estilipironas em *Cryptocarya moschata* no estado de São Paulo? 2004. Iniciação Científica (Graduando em Química) - Instituto de Química - UNESP/Araraquara.

2. **Fernanda Rodrigues Martinelli.** Estudo fitoquímico biomonitorado de folhas de *Cryptocarya moschata*. 2007. Iniciação científica (Graduanda em Química) - Instituto de Química - UNESP/Araraquara, PIBIC/CNPq.

Trabalhos de outra natureza

1. **Sandra Regina de Souza.** Validação de um novo método cromatográfico em CLAE-DAD para análise de flavonóides e estilipironas em *C. mandioccana*. 2006. Orientação de outra natureza (Técnico em Química) - Escola Municipal Adelino Bordignon.

10. Participação em Banca Examinadora de Trabalho de Conclusão

- 1. Sandra Regina de Souza.** Validação de um novo método cromatográfico em CLAE-DAD para análise de flavonóides e estirilpironas em *C. mandioccana*. 2006. Escola Municipal Adelino Bordignon. Técnico em Química.
- 2. Debora Batista dos Santos.** Produção de Álcool Anidro Via Cicloexano. 2006. Escola Municipal Adelino Bordignon. Técnico em Química.
- 3. Gisele Cristina Acorinthe.** Determinação de Benzeno em Gasolina Comercial Brasileira por Cromatografia Gasosa. 2006. Escola Municipal Adelino Bordignon. Técnico em Química.

*"Vou instruir você,
indicando o caminho a seguir.
Com os olhos sobre você,
Eu serei o seu conselheiro."
Salmo 32,8*

*Ao Senhor ofereço esta vitória!
Por estar sempre ao meu lado.
Por guiar os meus passos.
Por ser minha força.
Obrigada.*

*Mãe, a você dedico essa Tese.
Se não fosse sua luta ...
nada se concretizaria.*

*Obrigada por me ensinar a lutar
e a transformar as dificuldades
em amadurecimento...
Obrigada por ser
Mãe e Amiga.*

Ao meu Pai

*“O que eu sinto não é de mentira
e agora tenho certeza você é pra toda a vida...”*

Frejat

Ao meu marido Leonardo

Dedico essa Tese.

*Não teve importância
a ausência e a distância...*

O Amor esteve acima de tudo!

Obrigada pelo seu Amor.

*Você foi companheiro, forte,
paciente e compreensivo.*

“Estranho seria se eu não me apaixonasse por você...”

Nando Reis

*Ao meu irmão, Fran.
O primeiro a me ensinar Química!
Ao meu sobrinho Andrey
e a minha cunhada Rita*

*A minha irmã, Katia
Sempre amiga e companheira
A minha sobrinha Giovana
e ao meu cunhado Evandro*

Agradecimentos

*Ao Prof. Dr. Alberto José Cavaliheiro
pela dedicação, orientação
e incentivo no decorrer do trabalho*

*A todos que passaram pelo CryCa
pela convivência maravilhosa*

*A todos os professores, colegas e funcionários
do Departamento de Química Orgânica
que de uma forma ou de outra colaboraram com o meu trabalho*

*Ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, NuBBE,
do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara,
que possibilitou a realização do trabalho*

*Ao CNPQ
pela bolsa de Doutorado concedida*

*Só é útil o conhecimento que nos torna melhores
(Sócrates)*

RESUMO

Cryptocarya mandioccana apresenta quimiotipos caracterizados pela diferença quali e quantitativa na capacidade de produzir estilipironas de cadeias policetílicas de vários comprimentos. Por isso foi selecionada como modelo para estudos biossintéticos e ecofisiológicos, visando o entendimento da formação e função desses metabólitos secundários. Um método cromatográfico para análise simultânea dos principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandioccana* foi desenvolvido. O método foi validado com base nas normas da ANVISA e os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e estabilidade ficaram dentro dos critérios de aceitação. Esse método foi utilizado para comparar o perfil metabólico dos órgãos de indivíduos dos quimiotipos F e FS. No perfil de brotos, folhas novas e folhas velhas dos dois quimiotipos foi observado o acúmulo de alcalóides e flavonóides nas folhas velhas, e de substâncias, ainda não identificadas, nos brotos. Estirilpironas foram observadas nas folhas novas do quimiotipo FS e no mesmo órgão do quimiotipo F foi detectada a presença de substâncias ainda não identificadas. No perfil de folhas, galhos, cascas do tronco e raízes dos dois quimiotipos foi observado o acúmulo de alcalóides nas cascas do tronco e raízes, e de flavonóides nas folhas. Estirilpironas foram observadas nas folhas e em baixas concentrações nos galhos e raízes do quimiotipo FS. Experimentos biossintéticos realizados com folhas de plântulas de *C. mandioccana* confirmaram a atividade da enzima PAL, que converteu *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. No entanto, nas condições experimentais utilizadas para avaliar a atividade da enzima SPS em folhas das mesmas plântulas não foi detectada a formação de estilipironas. Por outro lado, em experimentos de incorporação de precursores utilizando extratos enzimáticos de folhas de *C. moschata* foi detectado a formação de uma substância que apresentou absorção máxima em $\lambda = 275$ nm e um íon pseudo-molecular em m/z 315,0587 [M-H]⁻, atribuído a um policetídeo, de fórmula molecular C₁₇H₁₆O₆, possivelmente formado pela condensação de uma unidade de cinamoil SCoA e quatro unidades de malonil SCoA.

ABSTRACT

Cryptocarya mandioccana presents chemotypes characterized by difference in the quali and quantitative capacity of producing styrylpyrones of polyketide chain of various sizes. For that reason, it was selected as model to biosynthetic and ecophysiological studies, aiming the acquaintance of formation and function of these secondary metabolites. A chromatographic method for simultaneous analysis of the main metabolites found in the leaves from *C. mandioccana* was developed. The method was validated based on ANVISA regulations and its parameters of selectivity, linearity, precision, detection limit, quantification limit, accuracy and stability showed good results. This method was utilized to compare metabolic profile of the organs of individuals of the F and FS chemotypes. In the profile of sprout, young leaves and old leaves of both chemotypes it was observed the presence of alkaloids and flavonoids in old leaves, and a compound still not identified, in the sprout. Styrylpyrones were observed in the young leaves of the FS chemotype and in the same organ of the F chemotype it was observed the presence of a compound still not identified. In the profile of leaves, branches, trunk barks and roots of both chemotypes it was observed the presence of alkaloids in the trunk barks and roots, and flavonoids in the leaves. Styrylpyrones were observed in the leaves and in low concentration in the branches and roots of the FS chemotype. Biosynthetic test performed in leaves of seedlings from *C. mandioccana* confirmed PAL enzyme activity that converted *L*-phenylalanine in cinnamic acid. However, in the test conditions used to evaluate SPS enzyme activity in leaves of the same seedlings it was not observed the formation of styrylpyrones. In the precursor incorporation test using enzymatic extract of leaves from *C. moschata* it was observed the formation of a compound that presented maximum absorption in $\lambda = 275$ nm and ion pseudo-molecular in m/z 315,0587 [M-H]⁻ attributed to a polyketide, with molecular formula C₁₇H₁₆O₆, possibly obtained by the condensation of one unity of cinnamoyl SCoA and four units of malonyl SCoA.

Lista de Figuras

Figura 1: Importância econômica de Lauraceae: (a) – abacate (<i>Persea americana</i>); (b) – canela (<i>Cinnamomum verum</i>); (c) – louro (<i>Laurus nobilis</i>); (d) – cânfora (<i>Cinnamomum camphora</i>).....	35
Figura 2: Substâncias isoladas das cascas do tronco de <i>C. amygdalina</i>	36
Figura 3: Substâncias isoladas das folhas e das plântulas de <i>C. moschata</i> (ex <i>C. aschersoniana</i>).....	38
Figura 4: Substância isolada das cascas do tronco de <i>C. bracteolata</i>	38
Figura 5: Substâncias isoladas das folhas e das cascas do tronco de <i>C. chinensis</i>	40
Figura 6: Substância isolada das cascas do tronco de <i>C. crassinervia</i>	41
Figura 7: Substâncias isoladas das cascas do tronco de <i>C. infectoria</i>	41
Figura 8: Substância isolada das cascas do tronco de <i>C. konishii</i>	41
Figura 9: Substâncias isoladas das folhas de <i>C. kurzii</i>	42
Figura 10: Substâncias isoladas das cascas do tronco de <i>C. latifolia</i>	43
Figura 11: Substância isolada das cascas do tronco de <i>C. strictifolia</i>	43
Figura 12: Substâncias isoladas das cascas do tronco e dos frutos de <i>C. obovata</i>	44
Figura 13: Substâncias isoladas das folhas e das cascas do tronco de <i>C. oubatchensis</i>	44
Figura 14: Espirocetal isolado de <i>Cryptocarya</i>	45
Figura 15: Ocorrência de <i>C. mandioccana</i> no estado de São Paulo registrada no Atlas Sinbiota.....	46
Figura 16: Fotos do indivíduo adulto e das partes da <i>C. mandioccana</i> : (a) – indivíduo adulto; (b) – folhas; (c) – tronco; (d) – fruto.....	46
Figura 17: Substâncias isoladas das folhas, frutos verdes, cascas do tronco e dos galhos de <i>C. mandioccana</i> (ex <i>C. moschata</i>); * configuração relativa.....	49
Figura 18: Quimiotipos caracterizados pela variabilidade química em <i>C. mandioccana</i> (ex <i>C. moschata</i>) (Moraes, et al., 2007).....	51
Figura 19: Chalcona sintase (CHS): (a) – homodímero de polipeptídeos com 42 KDa e sítios ativos* funcionalmente independentes; (b) – resíduos catalíticos (Cys164, Phe215, His303 e Asn336) do sítio ativo (AUSTIN, et al., 2004, JEZ; BOWMAN; NOEL, 2002).....	53
Figura 20: Mecanismo reacional proposto para a chalcona sintase: (a) – ativação; (b) – descarboxilação; (c) – condensação (AUSTIN; NOEL, 2003).....	54
Figura 21: Cavidade do sítio ativo: (a) – 2-PS; (b) – CHS (JEZ, et al., 2000a).....	55
Figura 22: Biogênese de flavonóides e estilipironas em <i>C. mandioccana</i> ; * configuração relativa.....	57
Figura 23: Biogênese de alcalóides aporfínicos quaternários em <i>C. mandioccana</i>	59

Figura 24: Retenção de substâncias ácidas e básicas.....	74
Figura 25: Representação gráfica do planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela.....	75
Figura 26: Curva de resolução calculada para diferentes valores de R_s e pares de bandas com uma razão de área de: (a) – 1:1; (b) – 2:1; (c) – 4:1; (d) – 8:1; (e) – 16:1 (SNYDER; KIRKILAND; GLAJCH, 1997).....	79
Figura 27: Ponto estacionário de uma superfície de resposta quadrática: (a) – ponto de máximo; (b) – ponto de mínimo; (c) – ponto de sela.....	80
Figura 28: Isolamento de alcalóides aporfínicos quaternários.....	86
Figura 29: Ausência de goniotalamina, utilizada como padrão interno, no extrato de <i>C. mandioccana</i>	88
Figura 30: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (R_sG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica C8.....	92
Figura 31: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (R_sG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica C18.....	93
Figura 32: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (R_sG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica fenil-hexil.....	94
Figura 33: Superfícies de respostas aplicadas para a avaliação das condições ótimas na análise dos metabólitos de <i>C. mandioccana</i> em: (a) – coluna cromatográfica C8; (b) – coluna cromatográfica C18; (c) – coluna cromatográfica fenil-hexil.....	95
Figura 34: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas (R_s) calculadas entre menisperina (pico 1) e o pico adjacente em cada condição cromatográfica.....	99
Figura 35: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas globais (R_sG) calculadas entre xantoplanina (pico 2), quercetina-3- <i>O</i> -galactopiranosídeo (pico 3), quercetina-3- <i>O</i> -glicopiranosídeo (pico 4), quercetina-3- <i>O</i> -xilopiranosídeo (pico 5), quercetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo (pico 6), quercetina-3- <i>O</i> -alopiranosídeo (pico 7) e quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo (pico 8) em cada condição cromatográfica.....	100
Figura 36: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas globais (R_sG) entre as estilpironas do grupo I: criptomoscatoa E_3 (pico 9), criptomoscatoa D_1 (pico 10), pico não identificado 1 (pico NI_1) e pico não identificado 2 (pico NI_2) e entre as estilpironas do grupo II: criptomoscatoa F_1 (pico 11), desacetilcriptocarialactona (pico 12), criptomoscatoa E_1 (pico 13) e pico não identificado 3 (pico NI_3) em cada condição cromatográfica.....	101
Figura 37: Cromatogramas de folhas de <i>C. mandioccana</i> analisadas nas condições estabelecidas no: (a) – desenvolvimento cromatográfico: etapa I; (b) – desenvolvimento cromatográfico: etapa II.....	103
Figura 38: Cromatograma do extrato das folhas de <i>C. mandioccana</i> obtido na condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa II. Pico 1, menisperina; 2, xantoplanina; 3, quercetina-3- <i>O</i> -galactopiranosídeo; 4, quercetina-3- <i>O</i> -glicopiranosídeo; 5, quercetina-3- <i>O</i> -xilopiranosídeo; 6, quercetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo; 7, quercetina-3- <i>O</i> -alopiranosídeo; 8, quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo; 9, criptomoscatoa E_3 ; 10, criptomoscatoa D_1 ; 11, criptomoscatoa F_1 ; 12, desacetilcriptocarialactona; 13, criptomoscatoa E_1	105
Figura 39: Alcalóides aporfínicos quaternários, menisperina (1) e xantoplanina (2) , isolados das cascas do tronco de <i>C. mandioccana</i>	106

Figura 40: Espectro no UV em três pontos distintos dos picos de menisperina (1), quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo (2) e desacetilcriptocarialactona (3) em: (a) – cromatograma do extrato; (b) – cromatograma da menisperina; (c) – cromatograma da quercetina-3- <i>O</i> -raminopiranosídeo; (d) – cromatograma da desacetilcriptocarialactona.....	111
Figura 41: Curva analítica com padronização interna, 75 µg mL ⁻¹ de goniotalamina, na faixa de 15 a 300 µg mL ⁻¹ para: (a) – menisperina; (b) – quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo; (c) – desacetilcriptocarialactona.....	113
Figura 42: Curva analítica com padronização externa na faixa de 15 a 300 µg mL ⁻¹ para: (a) – menisperina; (b) – quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo; (c) – desacetilcriptocarialactona.....	115
Figura 43: Desvio padrão relativo (DPR) da concentração de *menisperina, **quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração em dois e três dias consecutivos de análise na avaliação da precisão intermediária: (a) – padronização interna; (b) – padronização externa.....	119
Figura 44: Estabilidade para *menisperina, **quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias, para a padronização interna, em três níveis de concentração: (a) – 300 µg mL ⁻¹ ; (b) – 50 µg mL ⁻¹ ; (b) – 15 µg mL ⁻¹	122
Figura 45: Estabilidade para *menisperina, **quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias, para a padronização externa, em três níveis de concentração: (a) – 300 µg mL ⁻¹ ; (b) – 50 µg mL ⁻¹ ; (b) – 15 µg mL ⁻¹	123
Figura 46: Desvio padrão relativo (DPR) da concentração de *menisperina, **quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração na padronização interna e externa para: (a) – repetibilidade; (b) – precisão intermediária.....	124
Figura 47: Fotos dos órgãos coletados de <i>C. mandioccana</i> : (a) – broto; (b) – folha nova; (c) – folha velha; (d) – casca do tronco; (e) – raiz; (f) – galho.....	128
Figura 48: Variabilidade ontogenética dos metabólitos em quimiotipos de <i>C. mandioccana</i> : (a) – quimiotipo F; (b) – quimiotipo FS.....	134
Figura 49: Espectro no UV dos picos da substância do grupo G1 (1) e do ácido caféico (2) em: (a) – cromatograma do broto; (b) – cromatograma do ácido caféico.....	135
Figura 50: Espectro no UV dos picos da substância do grupo G2 (*) no cromatograma da folha nova.....	135
Figura 51: Perfil de estilipironas no quimiotipo FS de <i>C. mandioccana</i> no decorrer do desenvolvimento das folhas considerando os subtipos: (a) – FS2; (b) – FS3.....	136
Figura 52: Ocorrência de metabólitos em órgãos e em quimiotipos de <i>C. mandioccana</i> : (a) – quimiotipo F; (b) – quimiotipo FS.....	138
Figura 53: Perfil de estilipironas no quimiotipo FS de <i>C. mandioccana</i> nos diferentes órgãos considerando os subtipos: (a) – FS2; (b) – FS3.....	139
Figura 54: Variabilidade de menisperina (a) e xantoplanina (b) com relação aos quimiotipos de estilipironas em <i>C. mandioccana</i> nos diferentes órgãos.....	141
Figura 55: Teor de alcalóides, flavonóides e estilipironas em folhas de plântulas de <i>C. mandioccana</i> : (a) – plântula nova; (b) – plântula velha.....	143

Figura 56: Síntese de cinamoil SCoA e de seus derivados.....	150
Figura 57: Biogênese de goniotalamina em <i>C. moschata</i>	154
Figura 58: Precipitação salina fracionada do extrato enzimático das folhas de <i>C. moschata</i>	159
Figura 59: Etapas envolvidas na revelação do gel SDS-PAGE utilizando AgNO ₃ como agente revelador.....	167
Figura 60: Cromatogramas e teores dos picos: (a) – controle; (b) – reação; (c) – ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	169
Figura 61: Síntese de <i>N</i> -cinamoilsuccinimida a partir do ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	170
Figura 62: Mecanismo da reação de síntese de <i>N</i> -cinamoilsuccinimida a partir do ácido <i>trans</i> -cinâmico (SOLOMONS; FRYHLE, 2004).....	171
Figura 63: Espectro no infravermelho do produto formado (produto I) a partir do ácido <i>trans</i> -cinâmico. Ao lado inferior esquerdo apresenta-se a estrutura da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	172
Figura 64: Espectro de RMN de ¹ H do produto formado (produto I) a partir do ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	173
Figura 65: Estrutura da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	175
Figura 66: Cromatograma e UV da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	174
Figura 67: Espectro de massas do produto formado (produto I).....	176
Figura 68: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	177
Figura 69: Mecanismo da reação de síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	178
Figura 70: Cromatograma e UV do cinamoil SCoA.....	179
Figura 71: Curva analítica para a goniotalamina na faixa de 25 a 125 µgmL ⁻¹	181
Figura 72: Gráfico de barras para concentração de goniotalamina nos horários de coleta.....	182
Figura 73: Cromatogramas e teores dos picos para o Snd IV no protocolo I: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	184
Figura 74: Cromatogramas e teores dos picos para ppt 20% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	187
Figura 75: Cromatogramas e teores dos picos para ppt 40% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	188
Figura 76: Cromatogramas e teores dos picos para ppt 65% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	189
Figura 77: Cromatogramas e teores dos picos para ppt 80% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	190
Figura 78 Cromatogramas e teores dos picos para snd IV no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.....	191

Figura 79: Teor do pico 1 nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados no protocolo II.....	192
Figura 80: Curva de calibração construída para determinação de proteínas totais.....	193
Figura 81: Concentração de proteínas totais do extrato bruto, dos precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação não dessalinizados (ND), de suas frações F2 e F3 dessalinizadas (D) do sobrenadante IV não dessalinizado (ND) e de suas frações dessalinizados (D).....	193
Figura 82: Teor do pico 1 nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados no protocolo III.....	195
Figura 83: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Pd: padrão de proteínas, 1: precipitado com 20% de saturação (D), 2: precipitado com 40% de saturação (D), 3: precipitados com 65% de saturação (D), 4: precipitado com 80% de saturação (D), 5: sobrenadante IV (D).....	196
Figura 84: Cromatograma da amostra com 40% saturação.....	197
Figura 85: Espectro de massas do pico da amostra com 40% saturação.....	197

Lista de Tabelas

Tabela 1: Níveis codificados para concentração de TEA e H ₃ PO ₄	76
Tabela 2: Experimentos realizados (x) em colunas Phenomenex Luna® (C8, C18 e fenil-hexil).....	76
Tabela 3: Condições cromatográficas para desenvolvimento cromatográfico: Etapa I.....	77
Tabela 4: Condições cromatográficas para desenvolvimento cromatográfico: Etapa II.....	83
Tabela 5: Gradiente Linear I.....	84
Tabela 6: Gradiente Linear II.....	84
Tabela 7: Gradiente Linear III.....	84
Tabela 8: Gradiente Linear IV.....	84
Tabela 9: Gradiente Linear V.....	84
Tabela 10: Gradiente da composição ternária.....	87
Tabela 11: Ponto estacionário (concentração de TEA e concentração de H ₃ PO ₄) determinados a partir da superfície de resposta e RsG estimados para cada coluna cromatográfica e verificação do modelo da superfície de resposta quadrática ^a	96
Tabela 12: Teste da condição ótima determinada pela superfície de resposta.....	97
Tabela 13: Melhor resolução cromatográfica ou resolução cromatográfica global (R _s G) para alcalóide, alcalóide e flavonóides, e estirilpironas grupo I e II.....	102
Tabela 14: Novo gradiente e sua composição ternária.....	102
Tabela 15: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância (1) em CD ₃ OD (11,7T).....	108
Tabela 16: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância (2) em CD ₃ OD (11,7T).....	109
Tabela 17: Repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração para menisperina ^a , quercetina-3-O-ramnopiranosídeo ^b e desacetilcriptocarialactona ^c com padronização interna.....	117
Tabela 18: Repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração para menisperina ^a , quercetina-3-O-ramnopiranosídeo ^b e desacetilcriptocarialactona ^c com padronização externa.....	118
Tabela 19: Exatidão em três níveis de concentração para menisperina ^a , quercetina-3-O-ramnopiranosídeo ^b e desacetilcriptocarialactona ^c com padronização interna.....	120
Tabela 20: Exatidão em três níveis de concentração para menisperina ^a , quercetina-3-O-ramnopiranosídeo ^b e desacetilcriptocarialactona ^c com padronização externa.....	120
Tabela 21: Indivíduos amostrados, seus quimiotipos, suas posições e a data da coleta.....	129
Tabela 22: Condições cromatográficas para análise dos metabólitos de <i>C. mandioccana</i> em diferentes órgãos.....	130
Tabela 23: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise de plântulas de <i>C. mandioccana</i>	131

Tabela 24: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise da PAL em folhas de plântulas de <i>C. mandioccana</i>	149
Tabela 25: Experimentos biossintéticos realizados em folhas de plântulas de <i>C. mandioccana</i> para avaliar a atividade da enzima SPS.....	153
Tabela 26: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise da SPS em folhas de plântulas de <i>C. mandioccana</i>	153
Tabela 27: Alterações realizadas nos diferentes protocolos (I, II e III) envolvendo as etapas de extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, análise cromatográfica, dosagem protéica e eletroforese.....	157
Tabela 28: Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – quantidade de sal a ser adicionado a 0°C.....	158
Tabela 29: Experimentos biossintéticos com <i>C. moschata</i> no protocolo I.....	161
Tabela 30: Experimentos biossintéticos com <i>C. moschata</i> no protocolo II.....	162
Tabela 31: Experimentos biossintéticos com <i>C. moschata</i> no protocolo III.....	163
Tabela 32: Reagentes e quantidades utilizados na preparação do <i>loading buffer</i> *.....	165
Tabela 33: Enzimas presentes na solução padrão utilizada na eletroforese e suas respectivas massas moleculares.....	165
Tabela 34: Reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de separação 12%.....	166
Tabela 35: Reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de concentração.....	166
Tabela 36: Reagentes e volumes utilizados na preparação do tampão de corrida pH 8,3.....	167

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	Área
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ACP	Proteína Acil Carregadora
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ax	axial
CB	Carlos Botelho
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CHS	Chalcona Sintase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Espectrômetro de Massas
CoA	Coenzima A
Conc	Concentração
COSY ¹ H- ¹ H	Espectroscopia de Correlação de Hidrogênio-Hidrogênio
D	Dessalinizado
<i>d</i>	dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DCI	3,4-dicloroisocumarina
<i>dd</i>	duplo dubleto
2-PS	2- Pirona Sintase
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTT	1,4-ditiotreitól
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EEJI-NA	Estação Ecológica de Juréia Itatins - Núcleo Arpoardor
eq	equatorial
E64	<i>L-trans</i> -epoxisuccinil leucilamido (4-guanidino) butano)
f	final
HAc	Ácido Acético
gHMQC	Correlação Heteronuclear Múltiplo Quântica
HOMODEC	Desacoplamento Homonuclear
IV	Infra Vermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
<i>m</i>	multiplete
MeOH	Metanol
MQ _R	Média Quadrática devido à Regressão
MQ _r	Média Quadrática Residual
ND	Não Dessalinizado
NH ₄ OH _{conc}	NH ₄ OH _{concentrado}
NI1	Não Identificado 1
NI2	Não Identificado 2
NI3	Não Identificado 3
NOE	Efeito Nuclear Overhouser
PAL	Fenilalanina Amônio Liase
PECB	Parque Estadual Carlos Botelho
PESM-NP	Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba
pi	Padrão Interno
PKS	Policetídeo Sintase
PLP	Piridoxal Fosfato
PMFS	Fluoreto de fenil metanosulfonila
ppt	precipitado
PVPP	polivinilpolipirrolidona
<i>r</i>	Coeficiente de Correlação Linear
R ²	Coeficiente de Determinação do Modelo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rs	Resolução Cromatográfica
RsG	Resolução Cromatográfica Global
RsG _{lim}	Limite inferior e superior da RsG
<i>s</i>	singleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
snd	sobrenadante
SPS	Estirilpirona Sintase
SQ _R	Soma Quadrática devido à Regressão
SQ _r	Soma Quadrática Residual
SQ _T	Soma Quadrática Total
<i>t</i>	tripleto
TAL	Tirosina Amônio Liase
TCA	tricloroacético
TEA	Trietilamina

t_R	Tempo de Retenção
Tris	2-amino-2- (hidróxi metil)-1,3-propanodiol
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
V_R	Número de graus de liberdade de SQ_R
V_r	Número de graus de liberdade de SQ_r
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
δ	Deslocamento Químico
$[\alpha]_D$	Rotação Específica

Sumário

Introdução

INTRODUÇÃO.....	33
1 – Lauraceae.....	34
2 – <i>Cryptocarya</i>	35
3 – <i>Cryptocarya mandioccana</i> Meisner.....	45
3.1 – Estudo fitoquímico e farmacológico.....	47
3.2 – Variabilidade de metabólitos em <i>C. mandioccana</i>.....	50
3.3 – Biossíntese dos metabólitos secundários de <i>C. mandioccana</i>.....	52
3.3.1 – Biossíntese dos policetídeos: flavonóides e estilipironas.....	52
3.3.2 – Biossíntese de alcalóides.....	58
3.3.3 – Enzimas.....	60
3.3.3.1 – Preparação de extrato enzimático de plantas.....	60
3.3.3.2 – Precipitação de proteínas.....	63
3.3.3.3 – Determinação da concentração de proteínas.....	63
3.3.3.4 – Eletroforese.....	64

Objetivos

OBJETIVOS.....	67
1 – Geral.....	67
2 – Específicos.....	67

Desenvolvimento

Capítulo I: Desenvolvimento e Validação de Método Cromatográfico

PARTE EXPERIMENTAL.....	70
1 – Materiais e Equipamentos.....	70
1.1 – Materiais.....	70
1.2 – Equipamentos.....	71
2 – Metodologia.....	72
2.1 – Desenvolvimento de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estilipironas em folhas de <i>C. mandioccana</i>.....	72
2.1.1 – Coleta e preparação do material vegetal.....	73
2.1.2 – Extração.....	73
2.1.3 – Desenvolvimento cromatográfico.....	73

2.1.3.1 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa I.....	74
2.1.3.2 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa II.....	83
2.2 – Identificação dos principais metabólitos de <i>C. mandioccana</i>	85
2.2.1 – Isolamento e identificação de alcalóides aporfínicos quaternários.....	85
2.3 – Validação de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de <i>C. mandioccana</i>	87
2.3.1 – Condições cromatográficas.....	87
2.3.2 – Preparação dos padrões e das amostras.....	88
2.3.2.1 – Preparação dos padrões.....	88
2.3.2.2 – Preparação das amostras.....	88
2.3.3 – Parâmetros validados.....	89
2.3.3.1 – Seletividade.....	89
2.3.3.2 – Linearidade.....	89
2.3.3.3 – Precisão.....	90
2.3.3.4 – Limite de Detecção.....	90
2.3.3.5 – Limite de Quantificação.....	90
2.3.3.5 – Exatidão.....	91
2.3.3.6 – Estabilidade.....	91
RESULTADOS	91
1 – Desenvolvimento de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de <i>C. mandioccana</i>	91
1.1 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa I.....	91
1.2 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa II.....	97
2 – Identificação dos principais metabólitos de <i>C. mandioccana</i>	103
2.1 – Isolamento e identificação de alcalóides aporfínicos quaternários.....	106
2.1.1 – Menisperina.....	106
2.1.2 – Xantoplanina.....	108
3 – Validação de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de <i>C. mandioccana</i>	110
3.1 – Parâmetros validados.....	110
3.1.1 – Seletividade.....	110
3.1.2 – Linearidade.....	111
3.1.3 – Precisão.....	116
3.1.4 – Limite de Detecção.....	119
3.1.5 – Limite de Quantificação.....	119
3.1.6 – Exatidão.....	119
3.1.7 – Estabilidade.....	121

Capítulo II: Variabilidade Intraespecífica de Metabólitos em C. mandioccana

PARTE EXPERIMENTAL	126
1 – Materiais e Equipamentos.....	126
1.1 – Materiais	126
1.2 – Equipamentos	126
2 – Metodologia.....	127
2.1 – Variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de C. mandioccana em diferentes órgãos	127
2.1.1 – Amostragem dos indivíduos estudados, coleta e preparação do material vegetal..	127
2.1.2 – Extração.....	129
2.1.3 – Análise cromatográfica.....	129
2.1.4 – Quantificação de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em órgãos de C. mandioccana.....	130
2.2 – Verificação da presença de estirilpironas em plântulas	131
2.2.1 – Coleta e preparação do material vegetal.....	131
2.2.2 – Extração.....	131
2.2.3 – Análise cromatográfica.....	131
RESULTADOS	132
1 – Variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de C. mandioccana em diferentes órgãos.....	132
1.1 – Variabilidade ontogenética dos metabólitos em quimiotipos de C. mandioccana	132
1.2 – Ocorrência de metabólitos secundários em órgãos e em quimiotipos de C. mandioccana	136
1.2.1 – Ocorrência de alcalóides em órgãos e em quimiotipos de C. mandioccana.....	139
2 – Verificação da presença de estirilpironas em plântulas.....	142

Capítulo III: Biossíntese de Estirilpironas em C. mandioccana

PARTE EXPERIMENTAL	145
1 – Materiais e Equipamentos.....	145
1.1 – Materiais	145
1.2 – Equipamentos	146
2 – Metodologia.....	147
2.1 – C. mandioccana	148
2.1.1 – Determinação da atividade da PAL.....	148
2.1.1.1 – Extração enzimática	148
2.1.1.2 – Dessalinização do extrato enzimático	148

2.1.1.3 – Ensaio enzimático.....	149
2.1.1.4 – Análise cromatográfica.....	149
2.1.2 – Síntese de cinamoil SCoA.....	149
2.1.2.1 – Etapa I: Síntese de <i>N</i> -cinamoilsuccinimida a partir de ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	150
2.1.2.2 – Etapa II: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	151
2.1.3 – Determinação da atividade da SPS.....	151
2.1.3.1 – Extração enzimática.....	152
2.1.3.2 – Ensaio enzimático.....	152
2.1.3.3 – Análise cromatográfica.....	153
2.2 – <i>C. moschata</i>	154
2.2.1 – Análise circadiana de estirilpironas em folhas de <i>C. moschata</i>	154
2.2.1.1 – Construção da curva analítica para quantificação de goniotalamina.....	155
2.2.1.2 – Quantificação de goniotalamina em folhas de <i>C. moschata</i>	156
2.2.2 – Aplicação de protocolos.....	156
2.2.2.1 – Extração enzimática.....	158
2.2.2.2 – Precipitação salina.....	158
2.2.2.3 – Dessalinização do extrato enzimático.....	159
2.2.2.4 – Ensaio enzimático.....	160
2.2.2.5 – Análise cromatográfica.....	161
2.2.2.6 – Dosagem protéica.....	163
2.2.2.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	164
RESULTADOS.....	168
1 – Biossíntese de estirilpironas.....	168
1.1 – <i>C. mandioccana</i>	168
1.1.1 – Determinação da atividade da PAL.....	168
1.1.2 – Síntese de cinamoil SCoA.....	169
1.1.2.1 – Etapa I: Síntese de <i>N</i> -cinamoilsuccinimida a partir de ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	170
1.1.2.2 – Etapa II: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da <i>N</i> -cinamoilsuccinimida.....	176
1.1.3 – Determinação da atividade da SPS.....	179
1.2 – <i>C. moschata</i>	180
1.2.1 – Análise circadiana de estirilpironas em folhas de <i>C. moschata</i>	180
1.2.1.1 – Construção da curva analítica para quantificação de goniotalamina.....	181
1.2.1.2 – Quantificação de goniotalamina em folhas de <i>C. moschata</i>	181
1.2.2 – Aplicação de protocolos.....	182
1.2.2.1 – Protocolo I.....	183

1.2.2.2 – Protocolo II.....	185
1.2.2.3 – Protocolo III.....	192
<i>Conclusão</i>	
CONCLUSÃO.....	199
<i>Referências Bibliográficas</i>	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	202
<i>Anexos</i>	
LISTA DE ANEXOS.....	212

Introdução

INTRODUÇÃO

A química dos produtos naturais é, de longa data, fonte de novas moléculas orgânicas. A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo as plantas as principais contribuintes para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A variedade e complexidade de metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Em função do desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, e de instrumentos analíticos hifenados, programas de bioprospecção tornam-se cada vez mais freqüentes com o intuito de acelerar a descoberta de substâncias naturais que possam servir como modelos para novos medicamentos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Atualmente, a química dos produtos naturais está associada a programas genômicos e proteômicos. Concomitante aos avanços obtidos nas técnicas de biologia molecular, a gama de alvos da engenharia genética tem expandido rapidamente, de modo que um crescente número de genes codificando enzimas do metabolismo secundário tem sido isolado e clonado (JEZ, et al., 2000a).

Cryptocarya mandioccana, pertencente à família Lauraceae, foi selecionada para avançar nos estudos biossintéticos e de variabilidade intraespecífica, já que apresenta quimiotipos pela diferença quali e quantitativa na capacidade de produzir estirilpironas (NEHME, 2001, NEHME; MORAES; CAVALHEIRO, 2002, MORAES, et al., 2007). As estirilpironas descritas em *C. mandioccana* são resultantes de cadeias policetídicas de vários comprimentos, incluindo desde tricetídeos até hexacetídeos. Essas estirilpironas poderiam ser resultantes de estirilpironas sintases pouco específicas, com controle pouco preciso da extensão da cadeia policetídica, ou de isoenzimas específicas, com diferenças no sítio de alongamento da cadeia carbônica. Os quimiotipos de *C. mandioccana* são modelos interessantes para avaliar essas possibilidades, fornecendo subsídios para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na biossíntese de estirilpironas, principalmente no que concerne ao controle da extensão das cadeias carbônicas dessa classe de metabólitos secundários.

1 – Lauraceae

A família Lauraceae tem cerca de 2500 espécies incluídas em 52 gêneros. É pantropical com poucos representantes em regiões temperadas. Nas Américas ocorrem cerca de 29 gêneros e 900 espécies. A família é freqüente em florestas tropicais montanas, com algumas espécies habitando grandes altitudes, mas a grande diversidade ocorre em terras baixas da Amazônia e América Central (RIBEIRO, et al., 1999).

Espécies dessa família têm a reputação de ser de difícil identificação. Botânicos experientes conseguem identificar plantas estéreis no nível de gênero pela combinação de vários caracteres. No nível de espécie os problemas estão relacionados principalmente com a falta de monografias e chaves de identificação (RIBEIRO, et al., 1999).

As Lauraceae são tipicamente arbóreas, variando de arbustos a árvores de dossel. As folhas são simples e alterno-espíraladas, sem estípulas, de margem inteira e freqüentemente agrupadas no ápice dos ramos. No campo, Lauraceae pode ser reconhecida pelo tronco liso e lenticelado, ao corte com odor de óleo essencial, muitas vezes também presente nas folhas (RIBEIRO, et al., 1999).

As inflorescências podem ser muito ou pouco ramificadas, em geral os ramos terminais são dicásios, terminando com três ramos ou três flores nascidas no mesmo ponto. As flores são hermafroditas (monóicas) ou unissexuais (dióicas). As espécies hermafroditas apresentam o comportamento floral basal da família, a heterodigogamia, com duas classes de indivíduos. Alguns indivíduos (classe A) têm flores que abrem pela manhã, são inicialmente femininos e apenas à tarde liberam pólen, quando o estigma não está mais receptivo. Enquanto outros (classe B) têm flores que abrem à tarde e são inicialmente femininos e o pólen é liberado pela manhã do dia seguinte em sincronia com a fase feminina dos indivíduos da classe A. A polinização cruzada é, portanto obrigatória em todas as espécies de Lauraceae, pois mesmo nas espécies hermafroditas a autopolinização é pouco provável devido à heterodigogamia (RIBEIRO, et al., 1999).

O fruto é uma baga com apenas uma semente, de forma e tamanho muito variáveis. Frutos de Lauraceae compõem cerca de 80% da dieta de algumas aves. As bagas maduras são em geral negras ou arroxeadas, contrastando com o pedicelo e cúpula fortemente vermelhos, atraindo frugívoros especializados como tucanos. As

aves engolem a baga e regurgitam a semente promovendo a dispersão. Outros animais como esquilos, macacos e peixes são mencionados como possíveis dispersores (RIBEIRO, et al., 1999).

Lauraceae é de grande importância econômica em todo o mundo. Espécies utilizadas em larga escala são o abacate (*Persea americana* Mill.), a canela (*Cinnamomum verum* Presl.) e o louro (*Laurus nobilis* L.). A casca ou o fruto de algumas espécies é usado como condimento (*Dicypellium caryophyllaceum* Mart. Nees) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* Mart. Kosterm. e *Aniba canelilla* Mez). Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies, como a canela-sassafrás (*Ocotea odorífera* Vell.) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Outras têm uso na medicina popular ou industrial, como a cânfora (*Cinnamomum camphora* L.) (RIBEIRO, et al., 1999), (Figura 1, pág. 35).

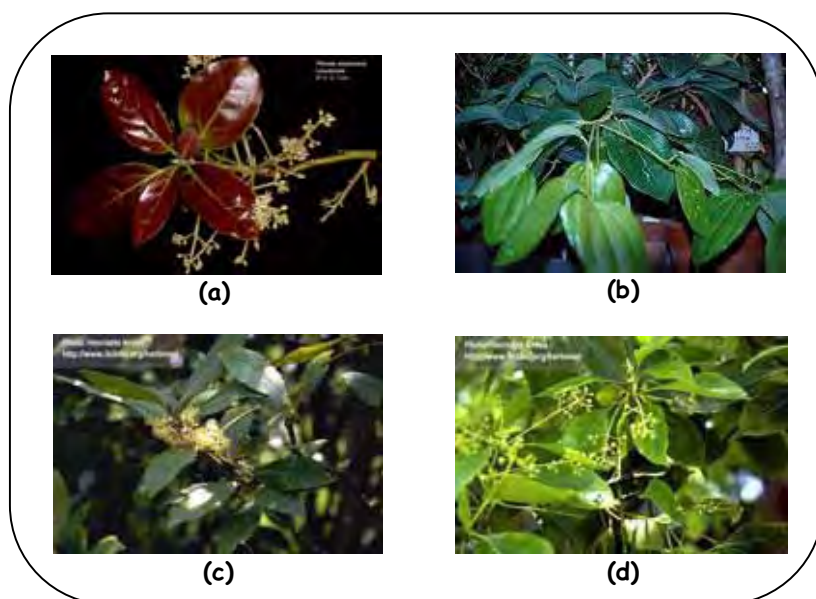


Figura 1: Importância econômica de Lauraceae: **(a)** – abacate (*Persea americana*); **(b)** – canela (*Cinnamomum verum*); **(c)** – louro (*Laurus nobilis*); **(d)** – cânfora (*Cinnamomum camphora*).

2 – *Cryptocarya*

Cryptocarya é um gênero pantropical da família Lauraceae presente na América do Sul, África do Sul, Madagascar, Ásia, Austrália e Oceania. O gênero inclui cerca de 350 espécies, com aproximadamente 18 espécies neotropicais,

principalmente no sul do Brasil, mas também são encontradas no Chile, Guiana, Guiana Francesa, Surinami, Bolívia, Venezuela, Equador, Peru e Costa Rica (MORAES, et al., 2007).

Embora vinte e três espécies tenham sido descritas na América do Sul, Moraes (2005) em uma revisão taxonômica de *Cryptocarya* no Brasil reconheceu, publicou e validou oito espécies de *Cryptocarya*, das quais sete são endêmicas da Mata Atlântica: *Cryptocarya aschersoniana* Mez, *Cryptocarya citrifomis* (Vell.) P.L.R. Moraes, *Cryptocarya mandioccana* Meisn., *Cryptocarya micrantha* Meisn., *Cryptocarya moschata* Nees & Mart., *Cryptocarya saligna* Mez e *Cryptocarya subcorymbosa* Mez.

Devido a lectotipificação dos nomes de espécies de *Cryptocarya* no Brasil estabelecida por Moraes (2005), os nomes *Cryptocarya moschata* Nees & Mart. e *Cryptocarya aschersoniana* Mez, anteriormente usados por Bastos (2003), Cavalheiro e Yoshida (2000), Mantovani (2004), Nehme (2001), Nehme, Moraes e Cavalheiro (2002), Nehme e colaboradores (2005), Pascoli (2001), Ricardo e colaboradores (2004) e Telascrea (2006) têm atualmente o nome de *Cryptocarya mandioccana* Meisn. e *Cryptocarya moschata* Nees & Mart., respectivamente, devido aos problemas de nomenclatura.

Muitas espécies de *Cryptocarya* têm sido estudadas sob enfoque fitoquímico e farmacológico.

A partir do extrato das cascas do tronco de *C. amygdalina* foram isolados dois novos ácidos olefinicos: ácido criptocárico (**1**) e ácido amidalínico (**2**) (BORTHAKUR; MAHANTA; RASTOGI, 1981), (Figura 2, pág. 36).

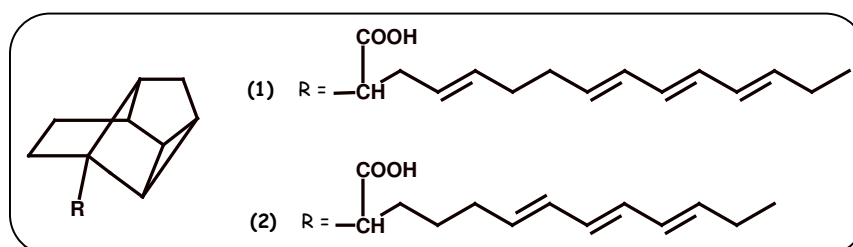


Figura 2: Substâncias isoladas das cascas do tronco de *C. amygdalina*.

Bastos (2003) isolou das folhas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) seis flavonóides derivados da mesma porção aglicona flavonoídica: quercetina-3-O-

ramnopiranosídeo (3), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (4), quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (5), quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo (6), quercetina-3-*O*-arabinofuranosídeo (7) e quercetina-3-*O*-6''-acetilalopiranosídeo (8); e duas estilipironas: gniotalamina (9) e 4'-hidróxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (10), sendo esta última inédita na literatura. Ainda das folhas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) foram isoladas por Telascrea (2006) 6-estiril-2-pirona (11), seu fotodímero simétrico, 1,3-difenil-2,4-di-[6-(2-pironil)]-ciclobutano (12), um sesquiterpeno, 1,6-diidroxi-4-(15)-eudesmeno (13) e gniotalamina (9). As substâncias (9), (11) e (13) apresentaram atividades contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. A substância (9) apresentou ainda significativa atividade contra as linhagens celulares UACC 62 (melanoma), MCF-7 (mama), 786-0 (renal), PC3 (próstata) e HT-29 (cólon) (TELASCREA, 2006). Três substâncias inéditas na literatura, 4'-hidróxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (10), éster metílico do ácido 3,5-diidroxi-7-fenil-6-heptenóico (14), fotodímero não simétrico (15) da substância 6-estiril-2-pirona (11) e gniotalamina (9) foram isoladas das folhas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) por Martinelli (dados não publicados). Atividade inibidora de acetilcolinesterase foi observada com as substâncias (9), (10) e (15). As substâncias (9), (10), (14) e (15) foram ativas contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As estilipironas (9) e (10) apresentaram atividades contra os fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* e o fotodímero não simétrico (15) da substância 6-estiril-2-pirona (11) apresentou atividade contra os fungos *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (MARTINELLI, dados não publicados). O fracionamento biomonitorado do extrato etanólico das folhas de plântulas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) levou ao isolamento de dois flavonóides glicosilados, quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (4) e quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (5) que exibiram atividade antioxidante (RICARDO, et al., 2004). Investigações do extrato etanólico da raiz e do caule das plântulas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) levaram ao isolamento de uma estilipirona ativa contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, gniotalamina (9), e duas δ -lactona- α,β -insaturada, 6-[(4'-etil-9'-oxabicyclo[3.3.1]non-6'-en-3'-il)metil]-5,6-diidro-2-pirona (16) e 6-propil-5,6-diidro-2-pirona (17) (RICARDO, et al., 2004). As substâncias isoladas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*) estão apresentadas na Figura 3, pág. 38.

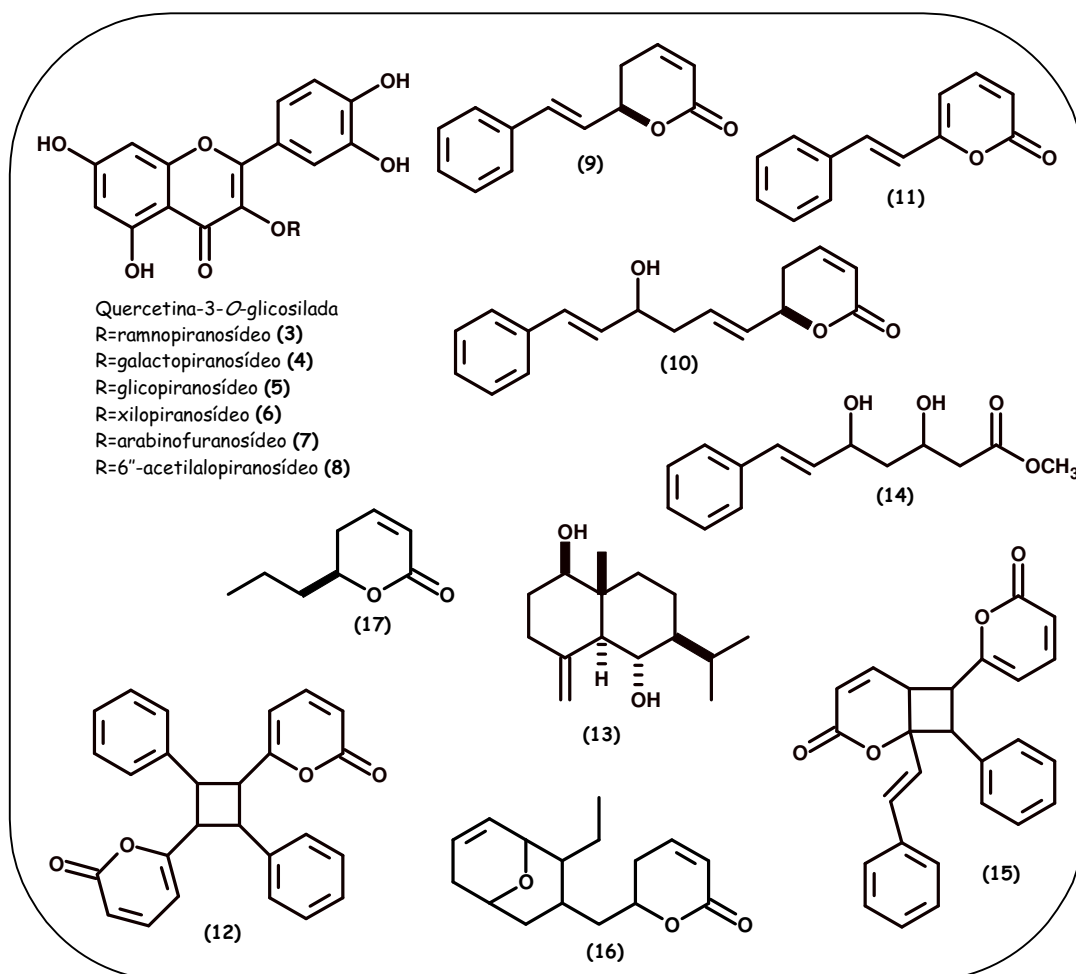


Figura 3: Substâncias isoladas das folhas e das plântulas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*).

Saidi e colaboradores (2007) isolaram 6,7,8 trimetoxicumarina (**18**) a partir do extrato das cascas do tronco de *C. bracteolata*, (Figura 4, pág. 38).

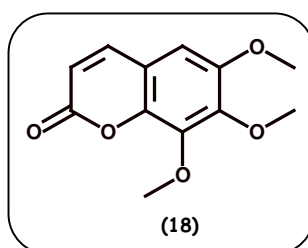


Figura 4: Substância isolada das cascas do tronco de *C. bracteolata*.

Investigações de extratos etanólicos das folhas de *C. chinensis* resultaram no isolamento dos alcalóides (\pm) romineina (**19**) (LEE; CHEN; LIU, 1993b), (-) *N*-óxido-isocariaquina (**20**), *N*-óxido- β -isoboldina (**21**) e 1-hidróxi-criproquina (**22**) (LIN; WU; WU, 2001). O fracionamento do extrato etanólico das cascas do tronco de *C. chinensis* levou ao isolamento de alcalóides pavínicos, neocariaquina (**23**) (LEE; LIU; CHEN, 1990), (+) *N*-óxido-esquicoltizidina (**24**), (-) 12-hidróxi-criproquina (**25**), (-) 12-hidróxi-*O*-metilcarioquina (**26**) e (-) *N*-desmetilcriproquina (**27**) (WU; LIN, 2001), de alcalóides proaporfínicos, (+) criproquina (**28**) (LEE; CHEN; LIU, 1993b), isocriproquina (**29**), prooxocriproquina (**30**), isoamuronina (**31**) e (+) 8,9-diidroestefarina (**32**) (WU; LIN, 2001), de alcalóides *N*-óxidos pavínicos, (-) *N*-óxido-isocariaquina B (**33**), (+) *N*-óxido-isocariaquina (**34**), (-) *N*-óxido-carioquina (**35**), e de alcalóide isoquinolínico, 6,7-metilenodióxi-*N*-metilisoquinolínico (**36**) (LIN; WANG; WU, 2002). As substâncias isoladas de *C. chinensis* estão apresentadas na Figura 5, pág. 40.

A partir do extrato etanólico das cascas do tronco de *C. crassinervia* foi isolada uma lignana, (-) grandisina (**37**) que apresentou baixa atividade contra células tumorais humanas (SAAD, et al., 1991), (Figura 6, pág. 41).

Dumontet e colaboradores (2001) relataram o isolamento e a citotoxicidade da criptocariona (**38**), de uma nova diidrochalcona, infectocariona (**39**), de duas novas diidroflavanonas, criptocarianona A (**40**) e criptocarianona B (**41**), e de oito novos biflavonóides, bicarianona A (**42**), bicarianona B (**43**), bicarianona C (**44**), bicarianona D (**45**), chalcocarianona A (**46**), chalcocarianona B (**47**), chalcocarianona C (**48**) e chalcocarianona D (**49**), obtidos a partir do extrato metanólico das cascas do tronco de *C. infectoria*. Os monômeros (**38**), (**39**), (**40**) e (**41**) foram ativos contra linhagens celulares do tipo KB. Criptocariona (**38**) também exibiu citotoxicidade contra células eritroleucêmicas K562 e doxorubicina-resistente K562 (DUMONTET, et al., 2001). As substâncias isoladas de *C. infectoria* estão apresentadas na Figura 7, pág. 41.

Lee e colaboradores (1993a) relataram o isolamento da (+) (1*R*,1*aR*) 1*a*-hidroximagnocurarina (**50**) do extrato etanólico das cascas do tronco de *C. konishii*, (Figura 8, pág. 41).

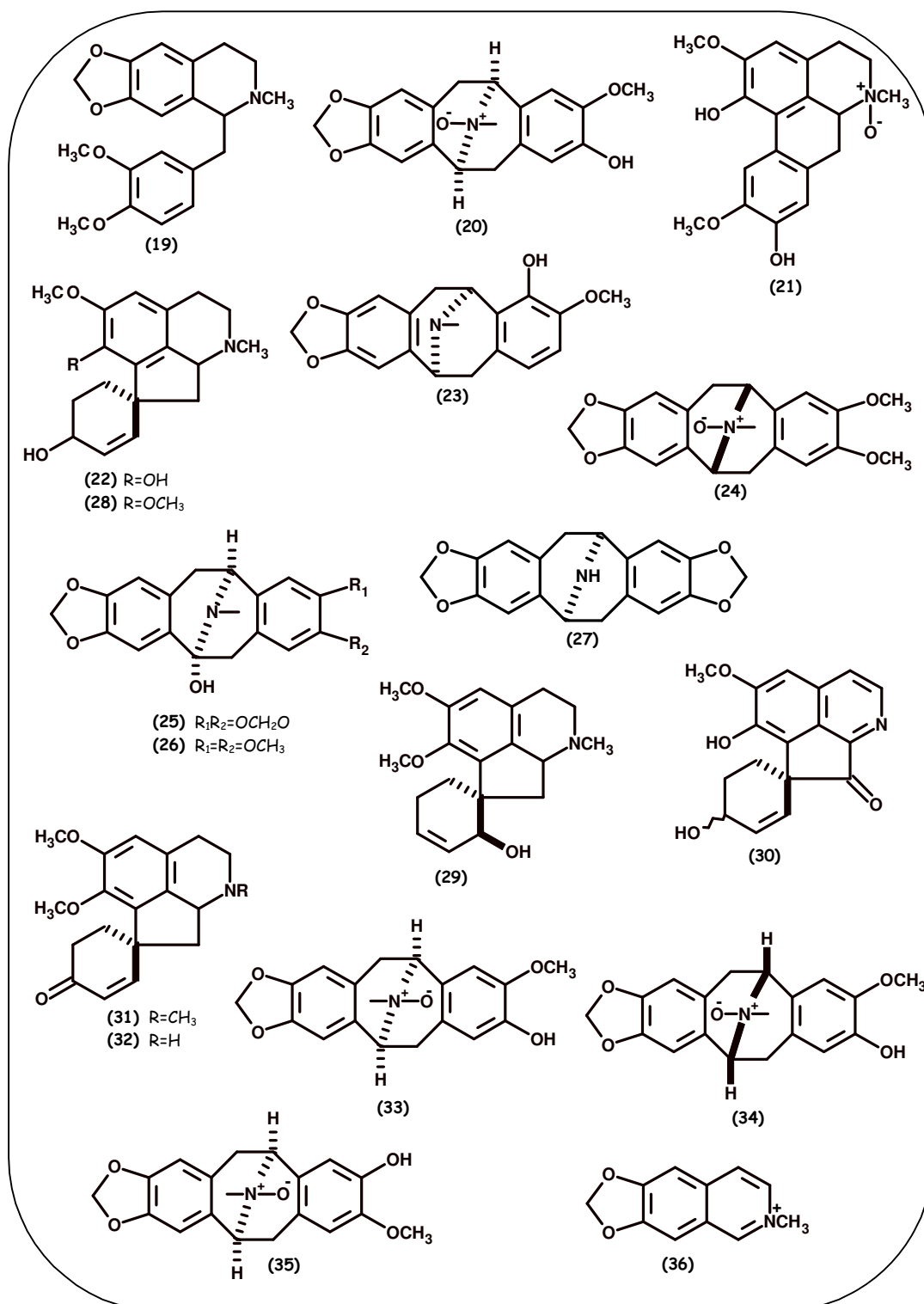


Figura 5: Substâncias isoladas das folhas e das cascas do tronco de *C. chinensis*.

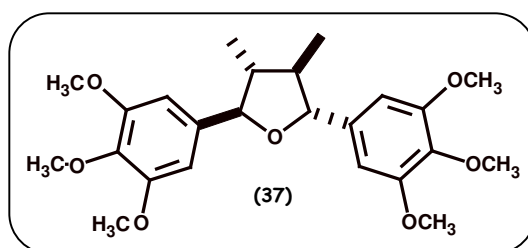


Figura 6: Substância isolada das cascas do tronco de *C. crassinervia*.

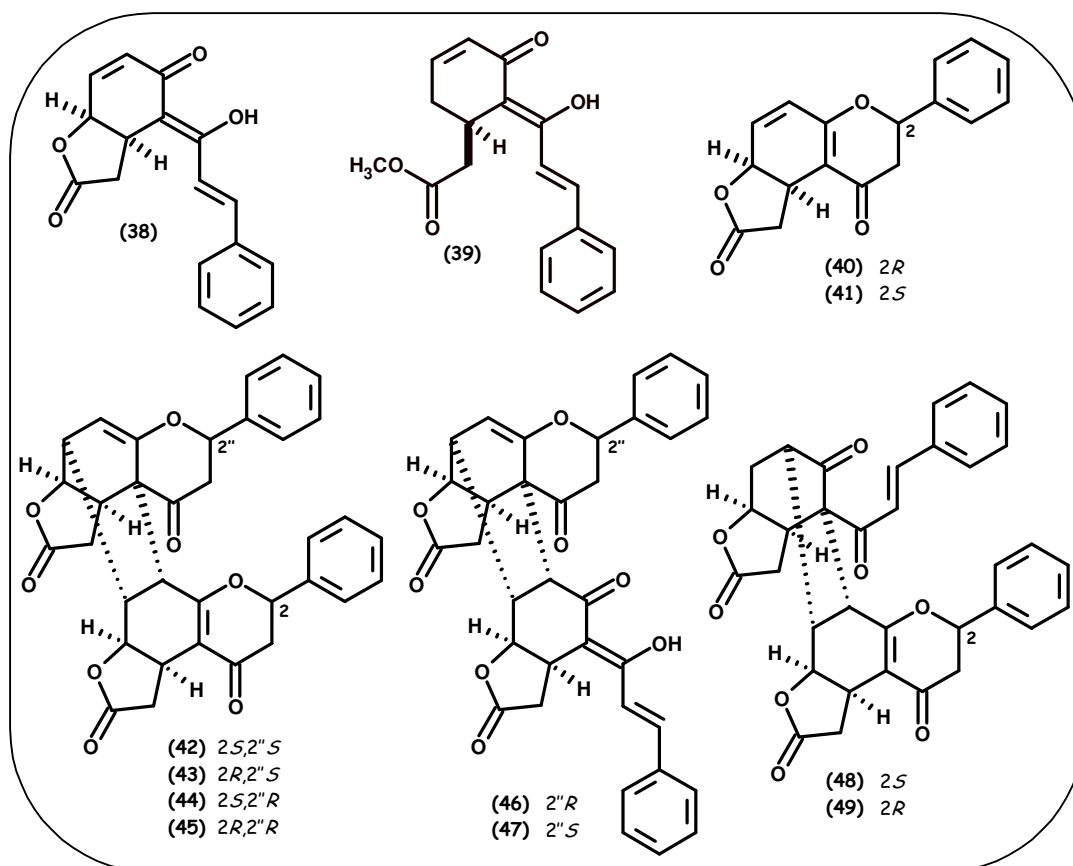


Figura 7: Substâncias isoladas das cascas do tronco de *C. infectoria*.

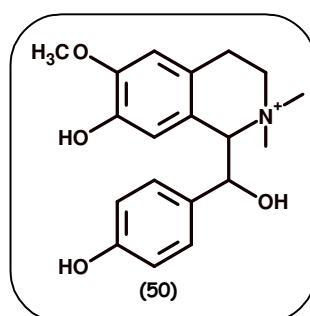


Figura 8: Substância isolada das cascas do tronco de *C. konishii*.

O fracionamento biomonitorado de extratos etanólicos das folhas de *C. kurzii* levou ao isolamento de quatro flavanonas, kurziflavolactonas A (**51**), B (**52**), C (**53**) e D (**54**), de uma chalcona (**55**) (FU, et al., 1993a) e de uma δ -lactona- α,β -insaturada, kurzilactona (**56**) (FU, et al., 1993b). As substâncias isoladas de *C. kurzii* estão apresentadas na Figura 9, pág. 42.

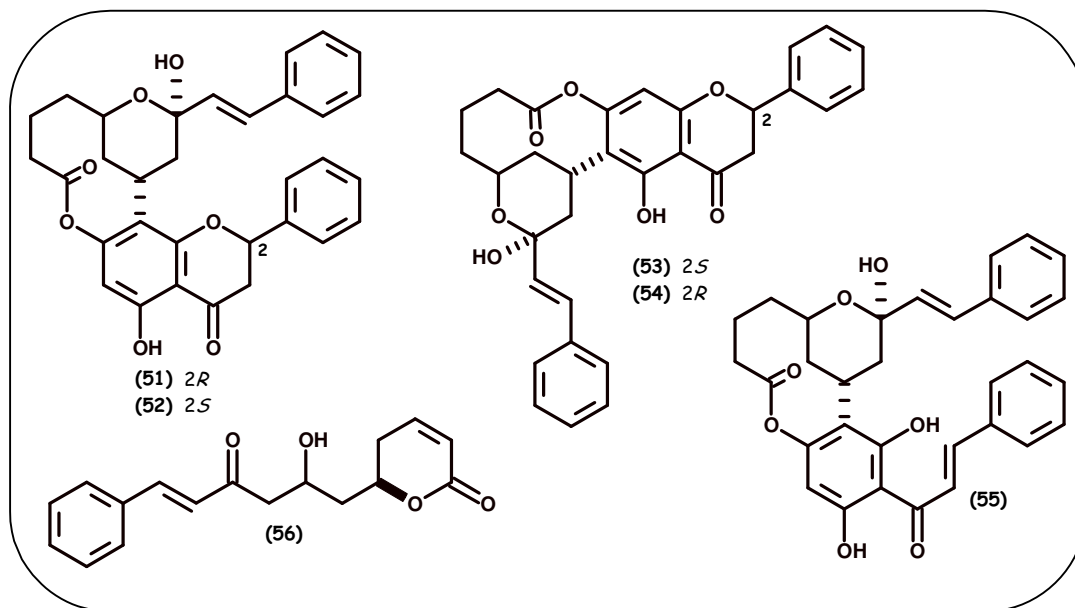


Figura 9: Substâncias isoladas das folhas de *C. kurzii*.

Três novas δ -lactona- α,β -insaturada, (2',4'-diacetóxi)-6-pentil-5,6-diidro-2-pirona (**57**), (2',4',6'-triacetóxi)-6-heptil-5,6-diidro-2-pirona (**58**) e (2'-acetóxi)-6-hept-4-enil-5,6-diidro-2-pirona (**59**) foram isoladas do extrato das cascas do tronco de *C. latifolia* (DREWES, et al., 1995, DREWES; HORN; WIJEWARDENE, 1996). Além dessas substâncias dois novos dioxabicyclos, criptocariolona (**60**) e criptocariolona diacetato (**61**) foram obtidos em menor concentração do extrato do mesmo órgão dessa planta (DREWES, et al., 1995). As substâncias isoladas de *C. latifolia* estão apresentadas na Figura 10, pág. 43.

Uma nova δ -lactona- α,β -insaturada, a strictifoliona (**62**), foi isolada das cascas do tronco de *C. strictifolia* (JULIAWATY, et al., 2000), (Figura 11, pág. 43).

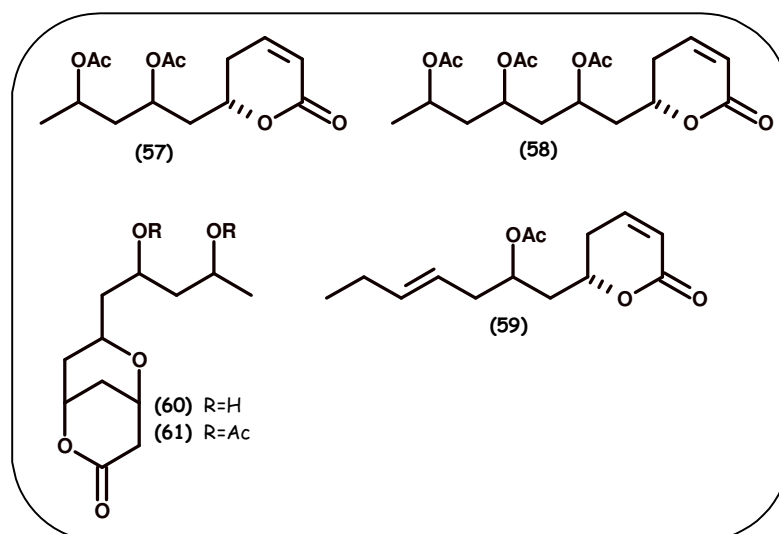


Figura 10: Substâncias isoladas das cascas do tronco de *C. latifolia*.

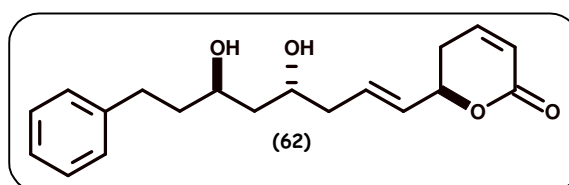


Figura 11: Substância isolada das cascas do tronco de *C. strictifolia*.

Uma δ -lactona- α,β -insaturada, obolactona (63) e três chalconas, kurzichalcolactona A (64), kurzichalcolactona B (65) e obochalcolactona (66) foram isoladas do extrato etanólico das cascas do tronco de *C. obovata*. Duas flavanonas, oboflavanona A (67) e oboflavanona B (68) foram isoladas do extrato etanólico dos frutos. Obolactona (63) e obochalcolactona (66) apresentaram significativa atividade citotóxica contra linhagens celulares do tipo KB (DUMONTET, et al., 2004). As substâncias isoladas de *C. obovata* estão apresentadas na Figura 12, pág. 44.

Cinco fenantroindolizidinas, (-) 13a- α -antofina (69), (-) 14- β -hidróxi-13a- α -antofina (70), (-) 13a- α -6-*O*-desmetilantofina (71), ficuseptina (72) e (-) *N*-óxido-10- β -13a- α -antofina (73) foram isoladas das folhas de *C. oubatchensis*. Das cascas do tronco de *C. oubatchensis* foi isolado um novo alcalóide *seco*-dibenzopirrocólínico, oubatchensina (74) além de fenantroindolizidina (69). As fenantroindolizidinas (69-71) exibiram pronunciada citotoxicidade contra linhagens celulares do tipo KB

(TORIBIO, et al., 2006). As substâncias isoladas de *C. oubatchensis* estão apresentadas na Figura 13, pág. 44.

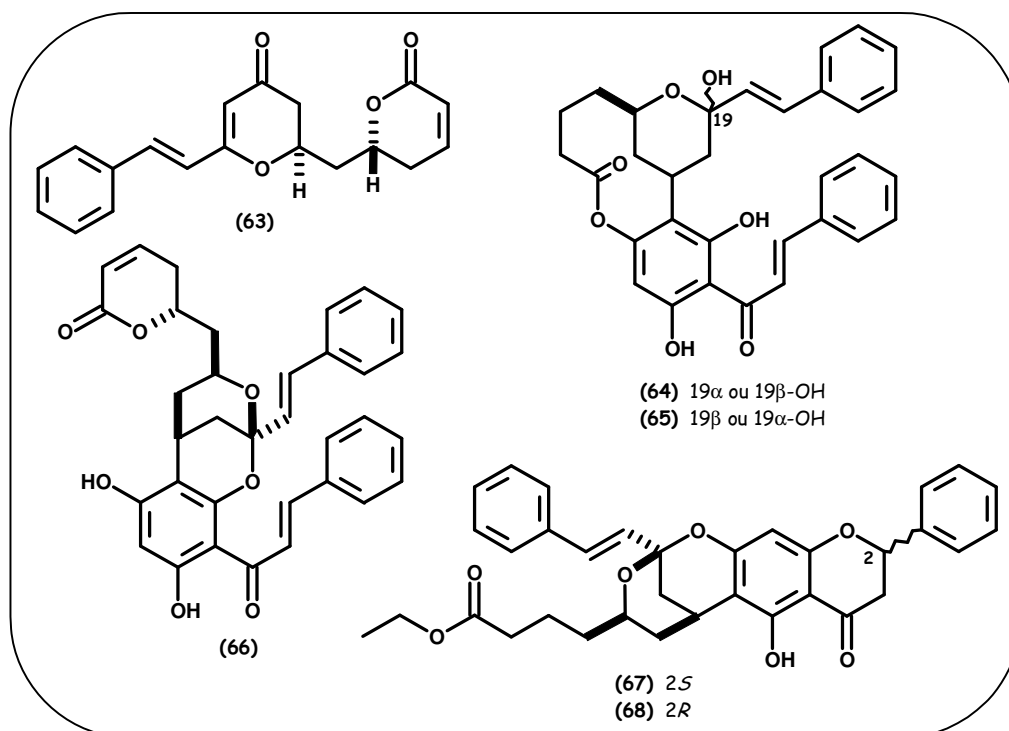


Figura 12: Substâncias isoladas das cascas do tronco e dos frutos de *C. obovata*.

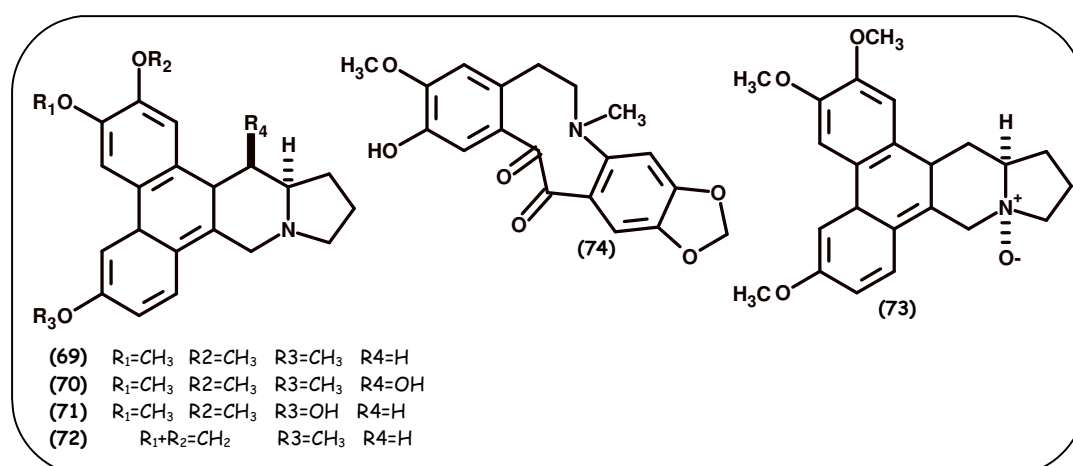


Figura 13: Substâncias isoladas das folhas e das cascas do tronco de *C. oubatchensis*.

Patentes foram registradas para extratos e substâncias isoladas de espécies de *Cryptocarya*: são relatados o uso do extrato de *C. oubatchensis* como agente

antimicrobiano em composições dermatológicas ou cosméticas (OREAL S. A., 2000), a atividade bactericida do extrato de *C. aromatica* (LOTTE CONFECTIONERY, 2000) e a atividade biológica, antitumoral e imunomoduladora, de espirocetais (75) (Figura 14, pág. 45) isolados de *Cryptocarya* (ECOBIOLOGICS LIMITED, 2007).

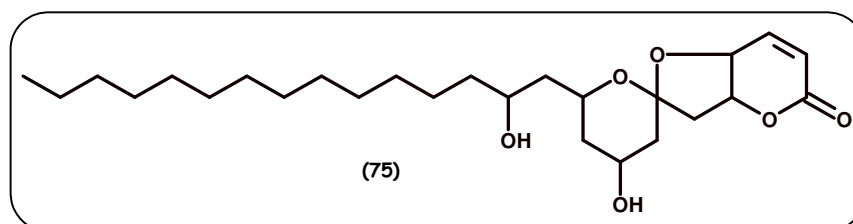


Figura 14: Espirocetal isolado de *Cryptocarya*.

Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies de *Cryptocarya* revelaram a presença principalmente de alcalóides, flavonóides e estilipironas com importantes atividades biológicas.

3 – *Cryptocarya mandioccana* Meisner

Cryptocarya mandioccana, popularmente conhecida como noz moscada do Brasil, é uma espécie arbórea de ampla distribuição. Ocorre principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo (Figura 15, pág. 46), Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No estado de São Paulo ocorre desde o litoral Norte (Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Picinguaba) até o Pontal do Paranapanema (Parque Estadual do Morro do Diabo, Teodoro Sampaio-SP) (PASCOLI, 2001).

Seus frutos são característicos pelo aroma e sabor e possuem propriedades estomacais. São largamente consumidos por primatas como o grande bugio ruivo (*Alouatta fusca*), o macaco-prego (*Cebus apella*) e o mono-carvoeiro ou muriqui (*Brachyteles arachnoides*). Suas cascas também apresentam propriedades estomacais e são usadas contra cólicas e diarréias. O chá de suas sementes raladas é usado contra dor de estômago e suas folhas esmagadas são usadas contra cólicas (MORAES, et al., 2007).

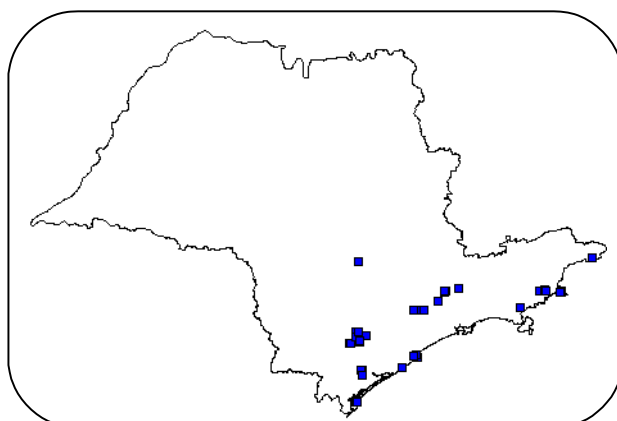


Figura 15: Ocorrência de *C. mandioccana* no estado de São Paulo registrada no Atlas Sinbiota.

O indivíduo adulto e as partes estruturais da *C. mandioccana* estão representados na Figura 16, pág. 46.

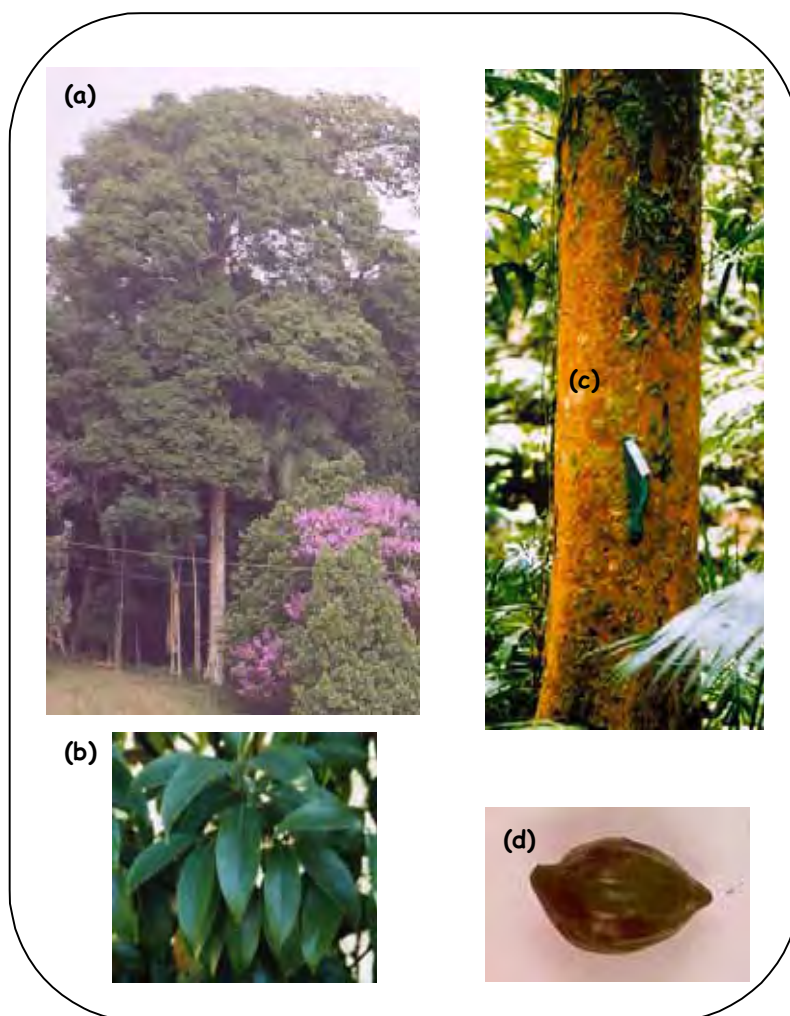


Figura 16: Fotos do indivíduo adulto e das partes da *C. mandioccana*: (a) – indivíduo adulto; (b) – folhas; (c) – tronco; (d) – fruto.

3.1 – Estudo fitoquímico e farmacológico

Estudos fitoquímicos realizados com *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) revelaram a presença de estirilpironas nas cascas do tronco e dos galhos (CAVALHEIRO; YOSHIDA, 2000). Foi descrita a ocorrência de 13 pironas, incluindo a já conhecida goniotalamina (9) e criptofoliona (76), e onze novas pironas denominadas criptomoscatoa D1 (77), criptomoscatoa D2 (78), criptomoscatoa E1 (79), criptomoscatoa E3 (80), criptomoscatoa F1 (81), criptopiranomoscatoa A1 (82), criptopiranomoscatoa B1 (83), criptopiranomoscatoa A2 (84), criptopiranomoscatoa B2 (85), criptopiranomoscatoa A3 (86) e criptopiranomoscatoa B4 (87).

Investigações fitoquímicas da polpa dos frutos verdes de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) conduziram ao isolamento de um flavonol, 5-hidróxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol (88) e duas estirilpironas inéditas, (+)-(6*R*)-[(2'*R*^{*})-6'-fenil-2'-hidróxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona (89) e (+)-(6*R*)-[(2'*S*^{*})-6'-fenil-2'-hidróxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona (90). Adicionalmente, quatro estirilpironas previamente descritas, criptofoliona (76), criptomoscatoa D1 (77), criptomoscatoa E3 (80), criptomoscatoa F1 (81) foram isoladas. As substâncias foram submetidas ao bioensaio específico com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. A estirilpirona (90) mostrou atividade fraca, porém seletiva, inibindo o crescimento das linhagens Rad 6, Rad 52Y e RS 321N de *Saccharomyces cerevisiae* (PASCOLI, 2001). Ainda dos frutos de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) foi isolado um ácido graxo policíclico, inédito na literatura atual, que foi denominado ácido moscático (91) (MANTOVANI, 2004).

Estudos fitoquímicos realizados com folhas de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) levaram ao isolamento de seis flavonóides glicosilados, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo (3), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (4), quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (5), quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo (6), quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo (92), quercetina-3-*O*-alopiranosídeo (93), (NEHME, 2001, NEHME, et al., 2005). Ainda das folhas de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) foram isolados as estirilpironas criptofoliona (76), criptomoscatoa D2 (78), desacetilcriptocarilactona (94), criptomoscatoa Ea (95), criptomoscatoa Eb (96), criptomoscatoa Fa (97), criptopiranomoscatoa A3 (86), criptopiranomoscatoa Ax (98), criptopiranomoscatoa B2 (85), criptopiranomoscatoa B4 (87),

criptopiranomoscatona X **(99)**, MT2 **(100)** e os flavonóides quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo **(3)**, 5-hidróxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol **(88)**, 5,3'-diidróxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol **(101)** e 5-hidróxi-7,4'-dimetoxiflavanona **(102)**. As substâncias **(76)**, **(94)**, **(95)**, **(96)** e **(97)** apresentaram atividades contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. A substância **(78)** apresentou ainda significativa atividade contra a linhagem celular 786-0 (renal). A substância **(94)** apresentou significativa atividade contra as linhagens celulares UACC 62 (melanoma) e NCI-ADR/RES (mama resistente). A substância **(100)** apresentou atividade contra a linhagem celular UACC 62 (melanoma) (TELASCREA, 2006).

As substâncias isoladas das folhas, frutos verdes, cascas do tronco e dos galhos de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) estão apresentadas na Figura 17, pág. 49.

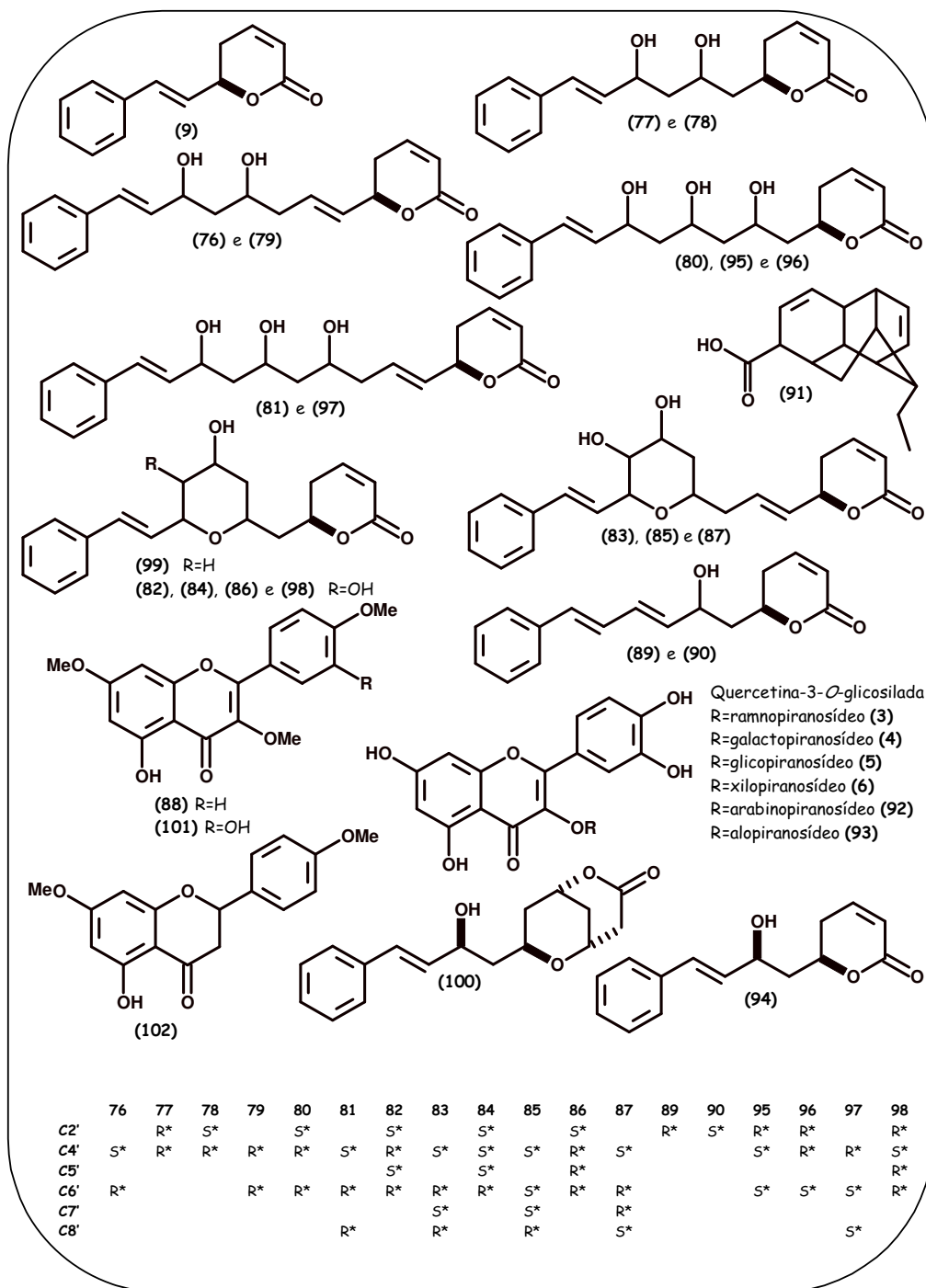


Figura 17: Substâncias isoladas das folhas, frutos verdes, cascas do tronco e dos galhos de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*); * configuração relativa.

3.2 – Variabilidade de metabólitos em *C. mandioccana*

A variabilidade química dos metabólitos polares das folhas de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) foi descrita por Nehme (2001), Nehme, Moraes e Cavalheiro (2002), e Moraes e colaboradores (2007). Considerando quimiotipos como fenótipos químicos diferentes, esse estudo de variabilidade química permitiu caracterizar quatro quimiotipos F, FS1, FS2 e FS3 (Figura 18, pág. 51) pela diferença quali ou quantitativa na capacidade de produzir estilipironas. O quimiotipo F foi caracterizado pela predominância de flavonóides glicosilados (**F1** a **F6**) e pequenas quantidades de estilipironas. O quimiotipo FS foi caracterizado pela presença de flavonóides e estilipironas e foram diferenciados em função das estilipironas predominantes. No quimiotipo FS1, o pico mais intenso de estilipirona foi atribuído à desacetilcriptocarialactona (**S5**) um tricetídeo formado por uma unidade de cinamato e três unidades de acetato. No quimiotipo FS2 os três picos mais intensos de estilipironas foram atribuídos à criptomoscatoana E3 (**S1**), criptomoscatoana F1 (**S4**) e criptomoscatoana E1 (**S6**), formadas por uma unidade de cinamato e cinco ou seis unidades de acetato. O pico mais intenso de estilipirona no quimiotipo FS3 foi atribuído à criptomoscatoana D1 (**S2**), um tetracetídeo formado por uma unidade de cinamato e quatro unidades de acetato. No entanto, o perfil de flavonóides glicosilados parece ser muito similar para todos os quimiotipos, sempre com quercetrina (**F6**) como o pico mais intenso.

A variabilidade genética de isoenzimas em populações de *C. mandioccana* (ex *C. moschata*) foi descrita por Moraes e colaboradores (2007). Esse estudo permitiu identificar cinco grupos de isoenzimas que podem estar associadas aos quimiotipos F, FS1, FS2 e FS3.

Estudos mostram que a variabilidade na composição química de estilipironas em *C. mandioccana* pode estar relacionada a fatores genéticos. Isso é evidenciado com um par de indivíduos que estão localizados a poucos metros um do outro e que pertencem a diferentes quimiotipos. Quimiotipos caracterizados por estilipironas diferentes no tamanho da cadeia policetílica podem estar relacionados a policetídeo sintases com diferença na cavidade do sítio ativo (NEHME; MORAES; CAVALHEIRO, 2002).

No entanto, há um indicativo de influências ambientais na ocorrência do quimiotipo F, pois indivíduos com baixo nível de estilipironas foram mais freqüentes

em solos com baixos teores de potássio, cálcio e magnésio. O quimiotipo F foi predominante na população de PESM-NP, enquanto que o quimiotipo FS2 foi mais freqüente nas populações de PECB e EEJI-NA. Os raros quimiotipos FS1 e FS3 foram encontrados somente nas populações de PESM-NP e PECB, respectivamente (MORAES, et al., 2007).

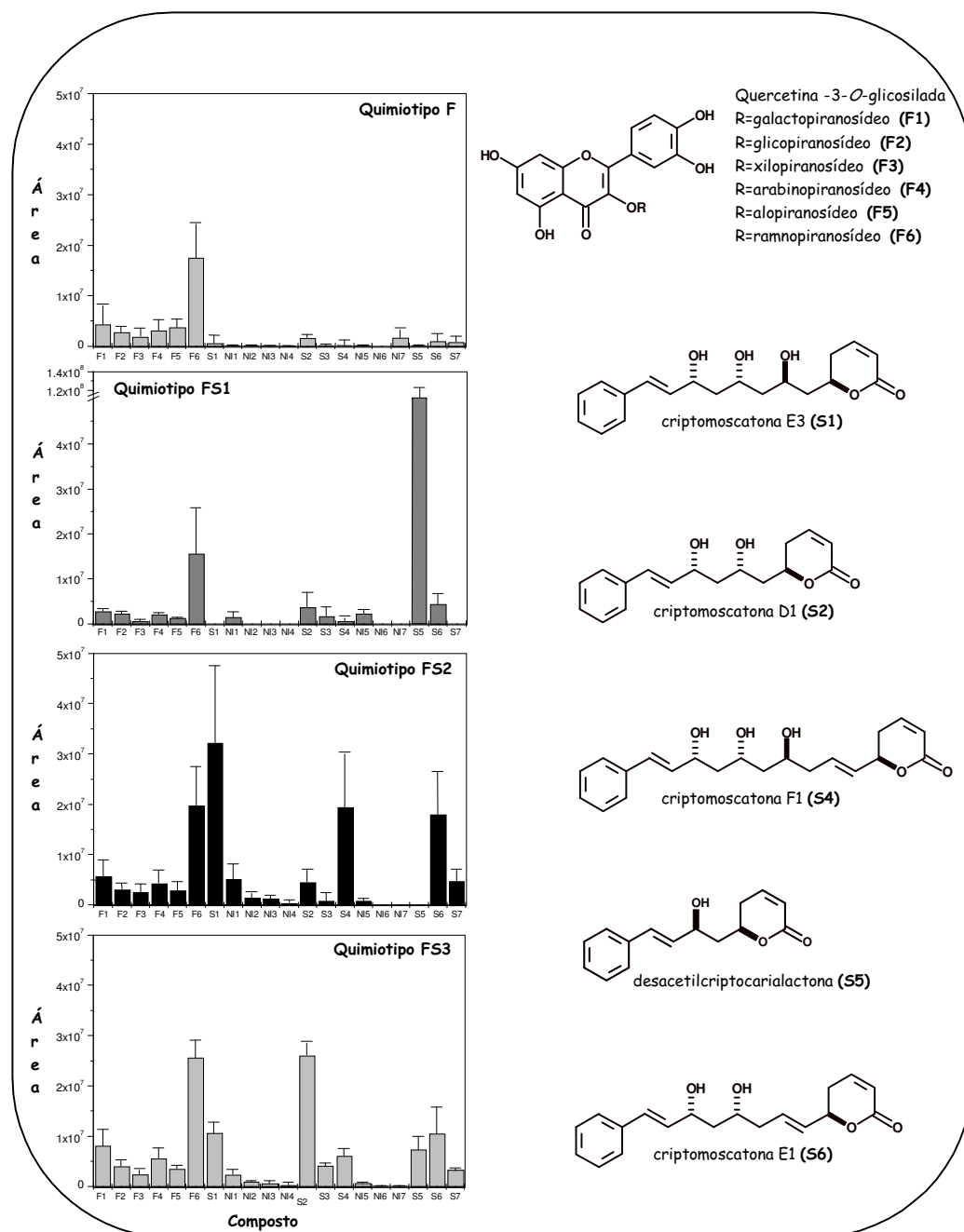


Figura 18: Quimiotipos caracterizados pela variabilidade química em *C. mandiocana* (ex *C. moschata*) (MORAES, et al., 2007).

3.3 – Biossíntese dos metabólitos secundários de *C. mandioccana*

3.3.1 – Biossíntese dos policetídeos: flavonóides e estilipironas

Os policetídeos pertencem a uma classe extraordinária de metabólitos secundários. Além de exibirem uma enorme diversidade estrutural e funcional, constituem uma fonte significativa de substâncias com importantes atividades farmacológicas incluindo bactericida, antitumoral, antifúngica e antiparasitária. O estudo dos policetídeos tem avançado enormemente, não somente nas pesquisas de elucidação estrutural das moléculas, mas também na clonagem, isolamento e caracterização das enzimas responsáveis por sua biossíntese (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Policetídeos são biossintetizados por um grupo de enzimas denominadas policetídeos sintases (PKS) classificadas em Tipo I (multifuncional: uma única enzima com vários sítios ativos), Tipo II (multienzimas: várias enzimas e cada uma com um sítio ativo) e Tipo III (“sítio ativo multifuncional”: uma única enzima e um único sítio ativo). As PKS dos Tipos I e II, presentes em bactérias e fungos, usam a proteína acil carregadora (ACP) para ativar os substratos acil SCoA. Já as PKS do Tipo III, as policetídeos sintases exclusivas de plantas, são independentes da ACP e agem diretamente nos tioésteres de CoA dos ácidos carboxílicos. Diferentemente das PKS dos Tipos I e II, as PKS do Tipo III usam um único sítio ativo para realizar uma série de reações de descarboxilação, condensação, ciclização e aromatização (STAUNTON; WEISSMAN, 2001, SHEN, 2003).

Chalcona sintase (CHS), a mais bem conhecida representante das PKS Tipo III, está envolvida na biossíntese dos flavonóides. Os flavonóides apresentam funções biológicas importantes, incluindo pigmentação, proteção contra raios UV, defesa contra patógenos e interação com microorganismos. De grande interesse à saúde humana, os flavonóides exibem atividades antioxidantes, antitumorais, antimalarial e antiasmática. São essas atividades que têm despertado interesse em caminhos de reengenharia para a produção desses metabólitos (STAUNTON; WEISSMAN, 2001, AUSTIN; NOEL, 2003). Ferrer e colaboradores (1999) determinaram a estrutura cristalina da chalcona sintase (CHS). A CHS funciona como um homodímero de polipeptídeos com 42 KDa. O homodímero contém dois sítios ativos funcionalmente independentes (Figura 19a, pág. 53). Quatro resíduos

de aminoácidos (Cys164, Phe215, His303 e Asn336) definem o sítio ativo da CHS (Figura 19b, pág. 53) e são conservados em outras enzimas relacionadas com a CHS.

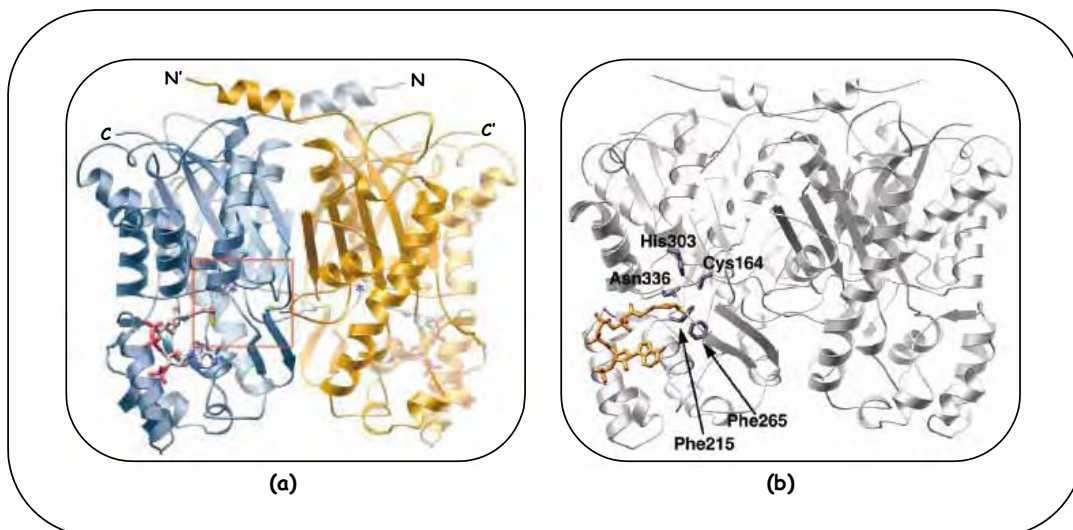


Figura 19: Chalcona sintase (CHS): **(a)** – homodímero de polipeptídeos com 42 KDa e sítios ativos* funcionalmente independentes; **(b)** – resíduos catalíticos (Cys164, Phe215, His303 e Asn336) do sítio ativo (AUSTIN, et al., 2004, JEZ; BOWMAN; NOEL, 2002).

Chalcona sintase (CHS) catalisa a formação de chalcona a partir de uma unidade de *p*-cumaroil SCoA e três unidades de malonil SCoA. A estrutura cristalina da CHS sugere que os quatro resíduos de aminoácidos (Cys164, Phe215, His303 e Asn336) participam nas reações de descarboxilação e condensação catalisadas por essa enzima. O aminoácido Cys164, ativado pelo aminoácido His 303, funciona como nucleófilo no ataque ao *p*-cumaroil SCoA. Os aminoácidos His303 e Asn336 catalisam o ataque nucleofílico ao *p*-cumaroil SCoA, a descarboxilação do malonil SCoA e a reação de condensação. O Phe215 orienta os substratos no sítio ativo durante o alongamento do policetídeo (AUSTIN; NOEL, 2003, FERRER, et al., 1999, JEZ, et al., 2000b) (Figura 20, pág. 54).

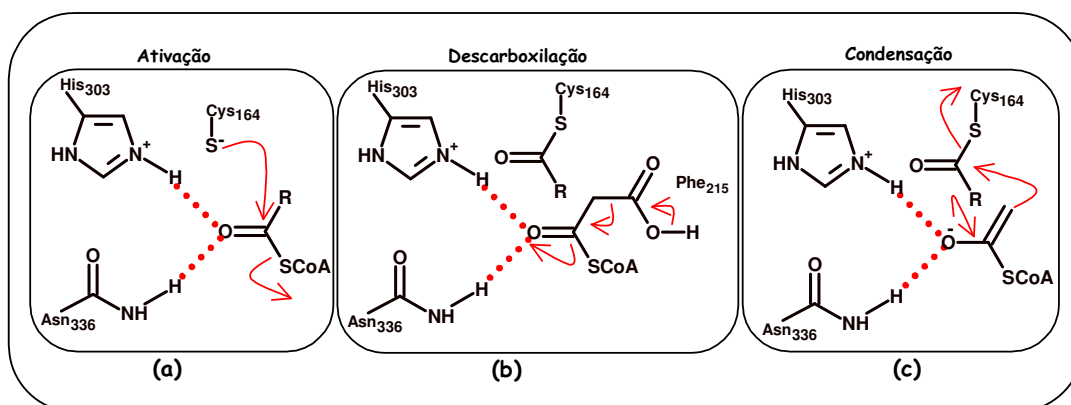


Figura 20: Mecanismo reacional proposto para a chalcona sintase: (a) – ativação; (b) – descarboxilação; (c) – condensação (AUSTIN; NOEL, 2003).

Estirilpirona sintase (SPS) pode estar envolvida na biossíntese de estilipironas. Estirilpironas são constituintes comuns em fungos principalmente em Hymenochaetaceae (Basidiomycetes), mas também ocorrem em algumas espécies de pteridófitas e em famílias mais primitivas de angiospermas, como Piperaceae, Lauraceae, Annonaceae, Ranunculaceae e Zingiberaceae (BECKERT, et al., 1997, SCHRODER, 1997). As estilipironas obtidas a partir de espécies do gênero *Goniothalamus* (*G. umbrosus*, *G. andersonii*, *G. macrophyllus*, *G. malayanus*) da família Annonaceae são potentes agentes antiproliferativos. *In vitro*, inibiram seletivamente a proliferação de muitas linhagens cancerígenas. *In vivo*, tiveram efeitos tumorídeos e tumoristáticos contra tumores mamários (LEE; AZIMAHTOL; TAN, 2003). Estirilpironas obtidas a partir de espécies do gênero *Cryptocarya* (*C. moschata* e *C. mandiocana*) da família Lauraceae apresentaram atividades antifúngicas e antiproliferativas (MARTINELLI, dados não publicados, RICARDO, et al., 2004, TELASCREA, 2006). Essas atividades confirmam a importância biológica dessas substâncias e despertam o interesse no entendimento dos mecanismos envolvidos na biossíntese desses metabólitos. Alguns estudos com estilipironas têm sido realizados sob enfoque biossintético.

Estudos biossintéticos de estilipironas em fungos pela incorporação de precursores isotopicamente marcados indicaram uma biotransformação similar à da chalcona sintase na etapa inicial da biossíntese de flavonóides. Estirilpironas também foram observadas como produtos liberados *in vitro* em ensaios com CHS (BECKERT, et al., 1997).

Equisetum arvense foi utilizada por Beckert e colaboradores (1997) para avaliar a ocorrência de estirilpirona sintase (SPS) sem interferência da chalcona sintase (CHS), já que essa pteridófito acumula estirilpironas e flavonóides em órgãos distintos (VEIT, et al., 1995). Estirilpironas são acumuladas em gametófitos e em rizomas do esporófito como constituinte fenólico majoritário sem presença de flavonóides e os brotos verdes do esporófito contêm vários flavonóides, mas nenhuma estirilpirona. Duas estirilpironas, bisnoriangonina e hispidina foram observadas como produtos liberados *in vitro* a partir dos ensaios realizados com SPS na presença de malonil SCoA e os substratos *p*-cumaroil SCoA e cafeoil SCoA respectivamente (BECKERT, et al., 1997, HERDERICH; BECKERT; VEIT, 1997). Esse estudo possibilitou a identificação da estirilpirona sintase, uma poliketídeo sintase de planta, com peso molecular de 56-77 KDa. Beckert e colaboradores (1997) sugeriram ainda uma relação evolucionária entre CHS e SPS, sendo essa última a mais primitiva.

Jez e colaboradores (2000a) determinaram a estrutura cristalina da 2-pirona sintase (2-PS), uma enzima que catalisa a formação da 6-metil-4-hidróxi-2-pirona a partir de uma unidade de acetil SCoA e duas unidades de malonil SCoA. As enzimas 2-PS e CHS são poliketídeos sintases de plantas que possuem 74% de homologia na seqüência de aminoácidos, conservam os mesmos resíduos catalíticos que definem o sítio ativo e possuem o mesmo mecanismo de reação. No entanto a cavidade do sítio ativo na 2-PS é menor que na CHS, (Figura 21, pág. 55).

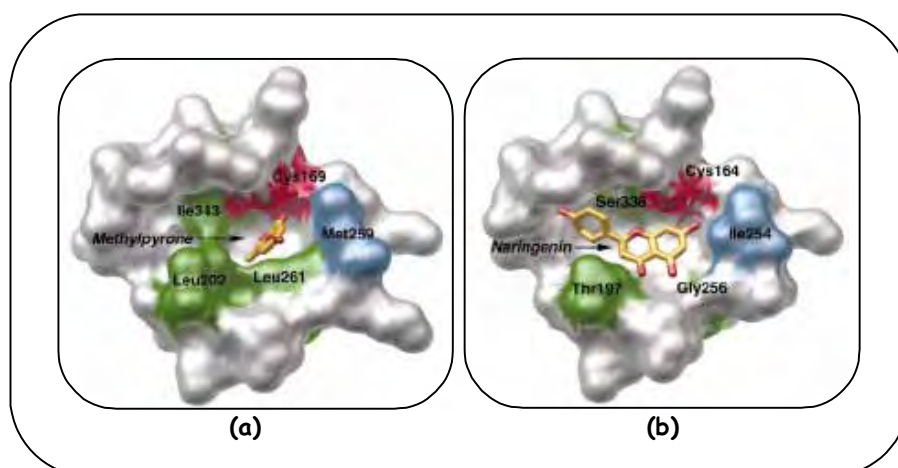


Figura 21: Cavidade do sítio ativo: (a) – 2-PS; (b) – CHS (JEZ, et al., 2000a).

Munidos dessa informação, Jez e colaboradores (2000a) mostraram a conversão da CHS em 2-PS através da redução da cavidade do sítio ativo onde ocorre a iniciação/alongamento da cadeia policetílica. Esses estudos demonstraram que o volume da cavidade do sítio ativo influencia tanto na escolha da molécula iniciadora como no controle do tamanho do policetídeo formado.

Ao contrário dos outros organismos que biossintetizam policetídeos, em *C. mandioccana* foram descritas estirilpironas resultantes de cadeias policetílicas de vários comprimentos, mais longas, incluindo desde tricetídeos até hexacetídeos. Essas estirilpironas poderiam ser resultantes de estirilpironas sintases pouco específicas, com controle pouco preciso da extensão da cadeia policetílica, ou policetídeos com cadeias de comprimentos diferentes poderiam estar relacionados a isoenzimas específicas, com diferenças no sítio de alongamento da cadeia carbônica. Os quimiotipos de *C. mandioccana* são modelos interessantes para avaliar essas possibilidades, fornecendo subsídios para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na biossíntese de estirilpironas, principalmente no que concerne ao controle da extensão das cadeias carbônicas dessa classe de metabólitos secundários. Futuramente esses estudos poderiam possibilitar a produção biotecnológica desses metabólitos, já que possuem importantes atividades biológicas.

Em resumo, chalcona sintase (CHS) estaria envolvida na biossíntese de flavonóides das folhas de *C. mandioccana*, enquanto que estirilpirona sintase (SPS) poderia estar envolvida na biossíntese de estirilpironas e sua expressão poderia estar relacionada aos quimiotipos encontrados em *C. mandioccana*.

A biogênese desses metabólitos é baseada em uma rota biossintética mista envolvendo a via do chiquimato na formação das unidades C₆-C₃ e a via do acetato responsável pela extensão da cadeia carbônica (DEWICK, 1997a) (Figura 22, pág. 57). A *L*-fenilalanina é precursor de um grande número de produtos naturais. A *trans*-desaminação da *L*-fenilalanina, catalisada pela PAL, gera o ácido *trans*-cinâmico. Esta reação é de fundamental importância, uma vez que o ácido *trans*-cinâmico é responsável pela formação de uma gama de metabólitos secundários. Após reação de hidroxilação o ácido *trans*-cinâmico resulta no ácido *p*-cumárico. Esses precursores estão diretamente envolvidos na biossíntese de muitas substâncias acumuladas em plantas, dentre elas estirilpironas e flavonóides. A partir da biossíntese dos precursores fenilpropanoídicos, estes são esterificados a tioésteres

de CoA, pelas SCoA ligases, os quais por meio de condensações com unidades de malonil SCoA, catalisadas por SPS e CHS seriam responsáveis pela formação dos diversos esqueletos carbônicos de estilipironas e flavonóides respectivamente encontrados em *C. mandioccana*.

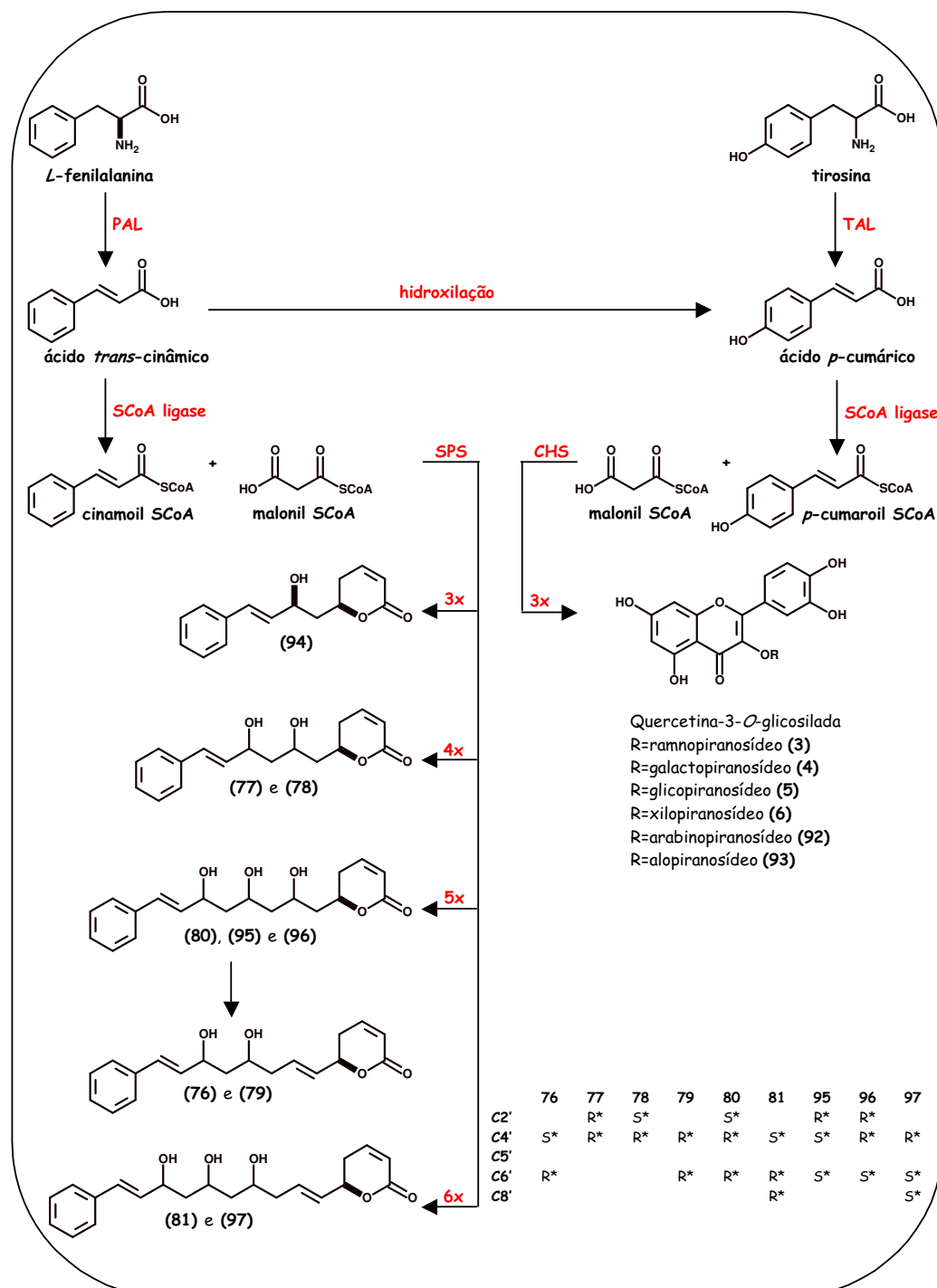


Figura 22: Biogênese de flavonóides e estilipironas em *C. mandioccana*; * configuração relativa.

3.3.2 – Biossíntese de alcalóides

Alcalóides, geralmente definidos como moléculas naturais contendo nitrogênio, são metabólitos secundários abundantes em plantas, mas que também ocorrem em microorganismos e animais. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias. Alcalóides contendo um sistema quaternário também são encontrados na natureza (DEWICK, 1997b, STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005). Esses metabólitos possuem muitas atividades farmacológicas incluindo antitumoral, bactericida, fungicida, inseticida, antioxidante, antimalarial, antiparkinsoniana e anti-HIV (KASHIWADA, et al., 2005, TORIBIO, et al., 2006, ZHANG, et al., 2007). Os alcalóides são biossintetizados a partir de aminoácidos precursores. Entre esses aminoácidos estão a ornitina, a lisina, o ácido nicotínico, a tirosina, o triptofano, o ácido antranílico e a histidina (DEWICK, 1997b). Alcalóides aporfínicos quaternários encontrados em *C. mandioccana* têm como precursor a (S)-reticulina, uma tetraidrobenzilisoquinolina derivada do esqueleto formado a partir de duas unidades de tirosina. A condensação dessas duas unidades, catalisada pela (S)-norcoclaurina sintase, gera a (S)-norcoclaurina. O-metilação seguido de N-metilação leva à (S)-N-metilcoclaurina. Hidroxilação e posterior metilação levam à (S)-reticulina, a intermediária chave na formação dos alcalóides aporfínicos. Os aporfínicos são formados em plantas pelo acoplamento oxidativo intramolecular da (S)-reticulina nas posições *orto-orto*, formando o esqueleto com padrão de substituição da (S)-menisperina ou na posição *orto-para* dando origem ao esqueleto com padrão de substituição da (S)-xantoplanina (DEWICK, 1997b, STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005). A biogênese dos alcalóides aporfínicos encontrados em *C. mandioccana* está apresentada na Figura 23, pág. 59.

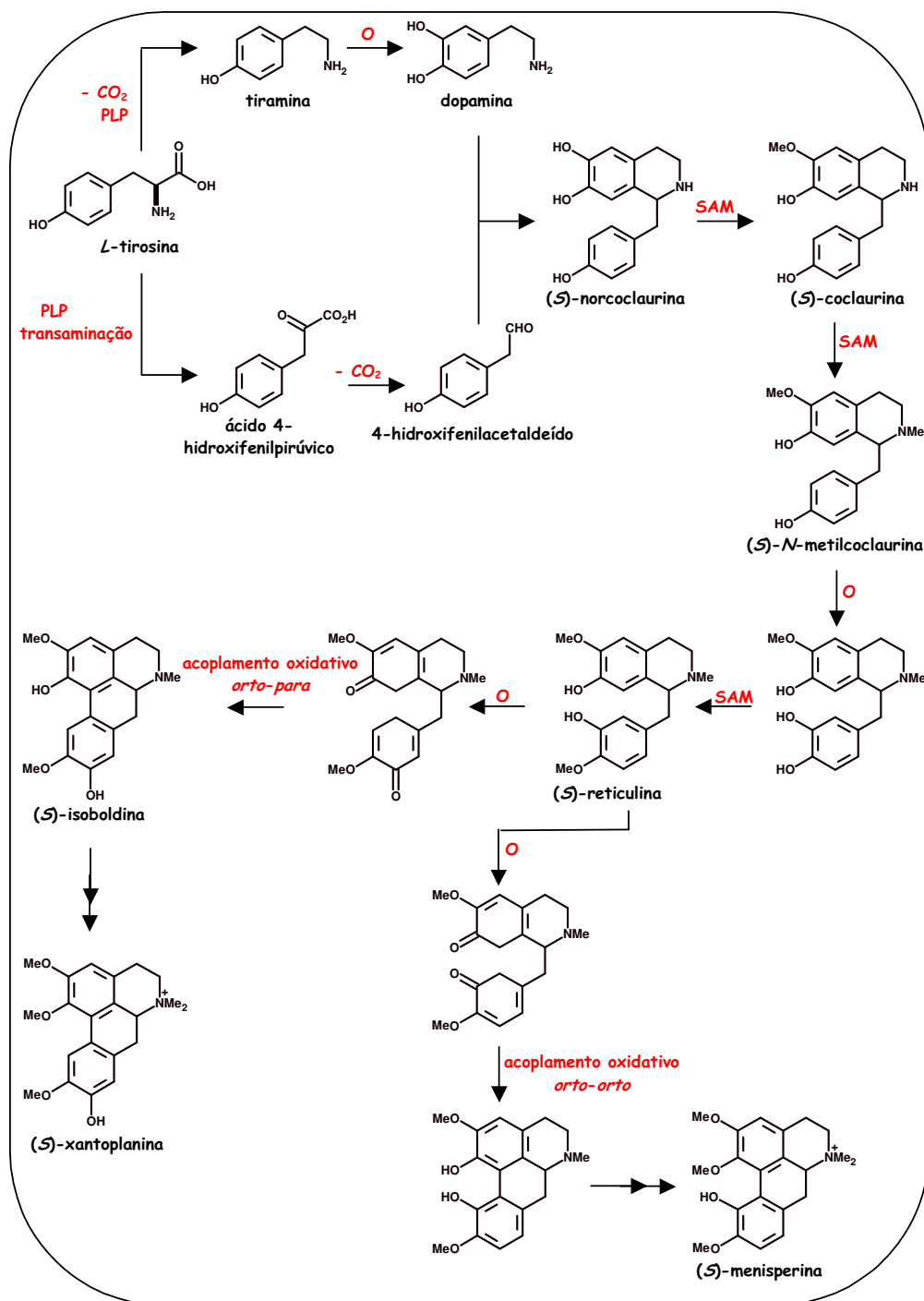


Figura 23: Biogênese de alcalóides aporfínicos quaternários em *C. mandioccana*.

3.3.3 – Enzimas

A fonte de uma enzima é em geral um tecido animal, vegetal ou célula microbiana. As células precisam ser rompidas e a enzima obtida em uma solução chamada de extrato enzimático. Uma vez pronto o extrato enzimático, estão disponíveis vários métodos para a separação das enzimas presentes no mesmo. Os métodos cromatográficos para separar as enzimas aproveitam-se das propriedades exibidas pelas mesmas, como a carga elétrica, o tamanho e a solubilidade, as quais variam de uma enzima para outra. Os métodos não cromatográficos incluem a precipitação seletiva de enzimas com sais, ácidos ou altas temperaturas. Outro importante método existente para a separação de enzimas baseia-se na migração das mesmas em um campo elétrico, um processo chamado eletroforese. Sua vantagem é que as enzimas podem ser separadas e visualizadas permitindo determinar rapidamente o grau de pureza de uma preparação particular de enzimas. A eletroforese permite também a determinação de propriedades cruciais de uma enzima, tais como o seu ponto isoelétrico e seu peso molecular aproximado. Quando desejamos purificar uma enzima é essencial dispormos de um ensaio capaz de detectar e quantificar esta enzima, mesmo quando ela está misturada com muitas outras (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

3.3.3.1 – Preparação de extrato enzimático de plantas

No processo de extração enzimática, o rompimento das células da planta libera enzimas no meio exterior. O método utilizado no rompimento das células pode variar de acordo com a matriz utilizada. Por possuírem parede celular, as células vegetais são geralmente mais difíceis de serem rompidas do que as células animais. O método mais apropriado para romper a parede celular é triturar o tecido vegetal juntamente com materiais abrasivos, como sílica ou areia. Este processo pode ser facilitado utilizando N₂ líquido para congelar o material vegetal antes de triturá-lo. A adição de tampão e centrifugação para facilitar a separação do material insolúvel são as etapas seguintes para se obter o extrato enzimático (SILVA, 2004). Em qualquer experimento que vise a determinação da atividade enzimática, alguns critérios devem ser monitorados, a fim de evitar a perda da atividade enzimática durante o rompimento de tecidos ou células incluindo:

Controle do pH

A maioria das enzimas é ativa em uma determinada faixa de pH e, quando expostas a pHs fora desta faixa podem perder irreversivelmente suas atividades. Para assegurar uma extração enzimática eficiente é necessária a utilização de uma solução tampão pré-estabelecida na faixa de pH desejada. Na escolha do tampão, é importante observar se este mostra algum efeito sobre a ação da enzima de interesse (SILVA, 2004).

Controle da temperatura

Durante o rompimento celular, a temperatura pode variar consideravelmente. Para evitar que isso ocorra, é aconselhável que se utilize banho de gelo para dissipar o calor gerado durante a extração enzimática. É aconselhável que a temperatura não ultrapasse 4°C, para minimizar a desnaturação das enzimas e reduzir a atividade das proteinases. Entretanto, existem algumas enzimas que podem sofrer inativação e dissociação se submetidas a baixas temperaturas. Dessa maneira, é importante que se saiba qual o efeito da temperatura sobre a enzima de interesse (SILVA, 2004).

Controle da proteólise

O controle da degradação das enzimas por proteinases endógenas durante ou após a extração é um dos problemas mais difíceis de serem contornados. Quando ocorre a proteólise, a proteína ou a enzima é isolada em quantidade desprezível, há perda da atividade enzimática durante o experimento e até mesmo, discrepâncias entre as propriedades das enzimas isoladas e aquelas relatadas na literatura. Para controlar a proteólise é necessário trabalhar em baixas temperaturas ou adicionar inibidores específicos de proteinases. Para a inibição de serina e cisteína, proteinases de tecido vegetal, é adicionado PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonila), DCI (3,4-dicloroisocumarina), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) ou E64 (*L-trans*-epoxisuccinil leucilamido (4-guanidino) butano) (BERGAMO, 2003, DEUTSCHER, 1990, GEGENHEIMER, 1990, SILVA, 2004).

Proteção dos grupos tióis

Durante o processo de extração, os grupos tióis da cisteína presentes nas enzimas podem sofrer modificações químicas. Para proteger os grupos tióis das enzimas, são adicionados ao extrato reagentes contendo grupos tióis, como o 2-mercaptoetanol ou o 1,4-ditiotreitól (DTT). A intenção é que os grupos tióis presentes nestes reagentes sofram reação com o oxigênio ao invés dos grupos tióis da cisteína. O 2-mercaptoetanol é usado geralmente em uma concentração de 10-20 mM e é bastante tóxico. O DTT, por sua vez, devido ao seu poder redutor efetivo pode ser utilizado em concentrações menores (1 mM) e é bem menos tóxico do que o 2-mercaptoetanol. A principal desvantagem do uso do DTT é o seu preço elevado. (GEGENHEIMER, 1990, SILVA, 2004).

Proteção contra metais pesados

Metais pesados, tais como Cu, Pb, Hg ou Zn podem inibir enzimas, principalmente por reagirem com a cisteína. A adição de EDTA ($\leq 1\text{mM}$) no meio extrator minimiza o efeito destes metais pesados; entretanto, é importante verificar se o EDTA não irá remover algum íon metálico essencial para a atividade da enzima. Neste caso, pode ser necessário utilizar concentrações menores de EDTA, ou suplementar o meio com o íon metálico requerido pela enzima (BERGAMO, 2003, SILVA, 2004).

Efeitos de diluição

Quando as proteínas são extraídas de um tecido ou célula, pode haver diluição. A concentração protéica, estimada em 500mgmL^{-1} em compartimentos celulares, pode ser reduzida a 5mgmL^{-1} em extratos celulares e até mesmo a 5µgmL^{-1} na solução da enzima pura. Estudos realizados mostram que muitas enzimas perdem suas atividades se armazenadas em soluções diluídas. Este efeito pode ser minimizado pela adição de uma proteína inerte, tal como albumina sérica bovina ($1\text{-}10\text{mgmL}^{-1}$) na solução. A proteína adicionada age como substrato de sacrifício frente à atividade das proteinases, protegendo dessa maneira a estabilidade da enzima de interesse. Existem relatos de que a presença de polióis, tais como glicerol e sacarose, aumenta a estabilidade das enzimas, principalmente se estas tiverem que ser submetidas ao congelamento para serem estocadas (SILVA, 2004).

3.3.3.2 – Precipitação de proteínas

Há vários métodos de concentração de proteínas, entre eles a precipitação (POHL, 1990). As proteínas podem ser precipitadas através de alterações causadas no solvente, que consistem em variação de pH, de força iônica ou de temperatura. Além disso, as propriedades dos solventes podem ser modificadas pela adição de altas concentrações de determinados sais ou solventes orgânicos miscíveis em água (ENGLARD; SEIFTER, 1990).

Uma das técnicas mais utilizadas é a precipitação provocada pela adição de sais em altas concentrações e com alta força iônica. A precipitação ocorre pela neutralização das cargas da superfície do sal, pela redução da atividade química da enzima e/ou pela diminuição da concentração efetiva da água. A concentração de qualquer sal necessário para a precipitação de uma proteína em particular está relacionada ao número e distribuição de cargas e de grupos polares não iônicos na superfície da proteína, embora o tamanho e a forma da proteína também contribua com a precipitação da proteína (BERGAMO, 2003).

O sulfato de amônio é o agente precipitante mais utilizado. Suas principais vantagens são:

1. saturação: em altas concentrações provoca a precipitação da maioria das proteínas;
2. calor de solução: não possui um grande calor de solução, sendo assim o calor gerado é facilmente dissipado;
3. baixa densidade ($1,235 \text{ gcm}^{-3}$): mesmo em solução saturada (4,04M a 20°C) não interfere na sedimentação da maioria das proteínas;
4. em soluções concentradas previne e/ou diminui o crescimento da maioria das bactérias;

3.3.3.3 – Determinação da concentração de proteínas

Muitos métodos utilizados na determinação de proteínas podem ser encontrados e a escolha correta do método a ser utilizado depende principalmente de cinco critérios (STOSCHECK, 1990) incluindo:

1. quantidade de proteína disponível para o ensaio
2. concentração da proteína
3. especificidade do ensaio
4. presença de substâncias químicas que possam interferir no ensaio
5. confiabilidade do ensaio

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) foi baseado na observação de que o corante Coomassie Brilliant Blue G25 existe em duas diferentes cores, vermelha e azul. A ligação do corante com a proteína provoca o deslocamento no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm. O complexo corante-proteína formado tem uma alta absorvidade conduzindo assim a uma excelente sensibilidade. Embora a intensidade da cor seja totalmente dependente do pH, soluções tampão apropriadas permitem a determinação da concentração de proteína, com nível de detecção de 0,1 g de proteínas. A simplicidade do método de Bradford está associada à sua alta sensibilidade, configurando-se no método geralmente escolhido (BERGAMO, 2003).

3.3.3.4 – Eletroforese

Eletroforese é o processo de movimento de moléculas carregadas sobre a influência de um campo elétrico. Devido ao fato das moléculas moverem-se com uma velocidade dependente de suas cargas, forma e tamanho, a eletroforese tem sido extensivamente utilizada na separação de macromoléculas. Como ferramenta analítica, a eletroforese é simples e relativamente rápida (BERGAMO, 2003).

A eletroforese de macromoléculas é normalmente conduzida pela aplicação de uma fina camada de amostra em uma matriz porosa. A matriz pode ser composta de diferentes materiais incluindo papel, celulose, acetato, ou géis feitos de poliacrilamida, agarose ou amido. Em géis de poliacrilamida e agarose, a matriz também atua como uma peneira seletiva por tamanho durante a separação (BERGAMO, 2003).

Os géis de agarose e poliacrilamida apresentam ligações cruzadas formando estruturas como esponjas. O tamanho dos poros desses géis é similar ao tamanho da maioria das proteínas e ácidos nucléicos. O movimento das moléculas através do

gel pela aplicação da corrente elétrica permite que as moléculas maiores sejam retidas pelo gel em detrimento das menores (BERGAMO, 2003).

Uma vez finalizado o experimento, o gel pode ser analisado quali ou quantitativamente. A maioria das proteínas e todos os ácidos nucleicos usualmente não são diretamente visíveis, portanto devem ser processados para determinar a localização e quantidade de moléculas presentes. O procedimento analítico mais utilizado é o tingimento do gel. As proteínas são usualmente reveladas com Coomassie Brilliant Blue em uma solução fixadora, ou depois das proteínas serem fixadas ao gel, podem ser reveladas com nitrato de prata por um processo semelhante à revelação fotográfica. Com Coomassie Brilliant Blue é possível detectar aproximadamente 1 μg de proteína em uma banda, enquanto que a revelação com prata é 100 vezes mais sensível, detectando aproximadamente 10 ng de proteína, (BERGAMO, 2003).

Objetivos

OBJETIVOS

1 – Geral

Considerando os quimiotipos encontrados em *C. mandioccana* pela diferença quali e quantitativa na capacidade de produzir estilipironas com cadeias policetídicas de vários comprimentos, pretende-se usar *C. mandioccana* como modelo nos estudos de biossíntese e de ecofisiologia, visando o entendimento da função e o desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de metabólitos secundários de interesse.

2 – Específicos

- ✓ Otimizar e validar um método cromatográfico para análise simultânea dos principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandioccana*: alcalóides, flavonóides e estilipironas;
- ✓ Identificar alcalóides presentes nas folhas de *C. mandioccana*;
- ✓ Verificar a composição e o teor de alcalóides, flavonóides e estilipironas durante o desenvolvimento das folhas de indivíduos dos quimiotipos F e FS e avaliar se há paralelo com o perfil de estilipironas observadas em folhas;
- ✓ Verificar a composição e o teor de alcalóides, flavonóides e estilipironas em diferentes órgãos de indivíduos dos quimiotipos F e FS e avaliar se há paralelo com o perfil de estilipironas observadas em folhas;
- ✓ Verificar a presença de estilipironas em plântulas de *C. mandioccana*;
- ✓ Estudar a biossíntese de estilipironas em folhas de plântulas de *C. mandioccana* através da avaliação da atividade da PAL e da SPS.

Desenvolvimento

Capítulo I
Desenvolvimento e
Validação de Método Cromatográfico

PARTE EXPERIMENTAL

1 – Materiais e Equipamentos

1.1 – Materiais

- Material vegetal:

Folhas do indivíduo CB 353 do quimiotipo FS de *Cryptocarya mandioccana*
Casca do tronco dos indivíduos CB 231, 283, 301, 314, 354 do quimiotipo F e dos indivíduos CB 230, 300, 302, 316, 353 do quimiotipo FS de *Cryptocarya mandioccana*

- Padrões:

Menisperina e xantoplanina isoladas a partir das cascas do tronco de *C. mandioccana*, quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*-alopiranosídeo, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo isoladas a partir das folhas de *C. mandioccana*, criptomoscatoína E3, criptomoscatoína D1, criptomoscatoína F1, desacetilcriptocarialactona, criptomoscatoína E1 isoladas a partir das cascas do tronco e folhas de *C. mandioccana* e goniotalamina isolada a partir das folhas de *C. moschata*.

- Solventes:

Hexano, MeOH e CHCl₃ (Synth, grau analítico)
ACN e MeOH (J.T.Backer, grau HPLC)
H₂O (ultrapura preparada em sistema Mili-Q)
CD₃OD (Cambridge Isotope Laboratories)

- Reagentes:

Ácido Acético, Ácido Fosfórico e Hidróxido de Amônio (Synth)
Trietilamina (Vetec)

- Adsorventes:
Sílica gel 60 (Merck 40-63 μm)
- Softwares:
Star Chromatography Workstation 5.52
Statística 6.0
ChemSketch 4.0
Microcal Origin 5.0
Microsoft Office Excel

1.2 – Equipamentos

- Balança:
Analítica – Mettler Toledo, modelo AG245
- Ultra-som:
Elma, modelo Transsonic 570, frequência 35 KHz
- Centrífuga:
Celm, modelo Combate, rotação 2800 rpm (1200 *g*)
- Rotaevaporador:
Buch, modelo R-114
- CLAE-DAD:
Módulos: 1-Bomba: ProStar 240 Solvent Delivery Module; 2-Detector: ProStar 330 Photodiode Array Detector; 3-Injetor Automático: ProStar 410 Auto-Sampler; 4-Integrador: Microcomputador (processador Pentium III, 500 MHz), com “software” “Star Chromatography Workstation”
- Colunas cromatográficas:
Coluna Phenomenex Luna[®] C18, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm
Coluna Phenomenex Luna[®] C8, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm
Coluna Phenomenex Luna[®] Fenil-Hexil, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm

- RMN:
Varian Inova 500 (11,7 T)
- Polarímetro:
Polarimeter P-1020 Jasco

2 – Metodologia

Para o estudo da variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos de *C. mandioccana* avaliando a produção desses metabólitos em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos foi necessário desenvolver um método cromatográfico para análise simultânea dos principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandioccana* (alcalóides, flavonóides e estirilpironas) e identificá-los. Considerando a importância desses estudos, tornou-se necessário validar o método proposto para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

2.1 – Desenvolvimento de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana*

Métodos analíticos são necessários para analisar os metabólitos secundários de *C. mandioccana* nos estudos de variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos dessa espécie. Um método cromatográfico para análise de flavonóides glicosilados e estirilpironas em espécies de *Cryptocarya* foi desenvolvido por Nehme e colaboradores (2005). Uma coluna cromatográfica C₁₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) foi usada no sistema CLAE-DAD. A fase móvel foi composta de A (Tampão: 7,2 mM de TEA e 17,0 mM de H₃PO₄, pH≅2,0) e B (ACN). A separação foi realizada em um sistema gradiente de 85:15 (A:B) a 60:40 (A:B) em 45 min seguida por uma eluição isocrática com 60:40 (A:B) por 10 min em um fluxo de 1,0 mLmin⁻¹. No entanto, sob essas condições, alguns picos permaneceram mal resolvidos. Dentre eles, encontram-se os picos atribuídos aos alcalóides aporfínicos. Para aumentar a resolução cromatográfica, o desenvolvimento de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana* foi proposto e envolveu etapas que compreenderam:

2.1.1 – Coleta e preparação do material vegetal

Folhas do indivíduo CB 353 do quimiotipo FS de *C. mandioccana* foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho em São Miguel Arcanjo – SP. As folhas coletadas foram secas em estufa à 40°C, com circulação de ar, por 24 horas, moídas e estocadas a 25°C. O indivíduo coletado foi identificado pelo Dr. Pedro L. R. Moraes. Exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBSP).

2.1.2 – Extração

Foi realizado um protocolo de extração e pré-tratamento da amostra estabelecido por Nehme e colaboradores (2005) com pequenas modificações.

1. Pesagem com exatidão de 100 mg de folhas secas e moídas de *C. mandioccana* em um tubo de vidro (10,0 mL) para centrífuga, com tampa.
2. Adição de 4,0 mL de hexano.
3. Extração em ultra-som por 30 min.
4. Adição de 4,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).
5. Extração em ultra-som por 30 min.
6. Centrifugação por 10 min a 1200 *g*.
7. Retirada de uma alíquota (1,5 mL) da fase hidroalcoólica.
8. Filtração da amostra em membrana Millipore® (0,45 µm) e acondicionamento em frasco para injeção automática (CLAE).

2.1.3 – Desenvolvimento cromatográfico

O método cromatográfico estabelecido por Nehme e colaboradores (2005) foi utilizado como ponto de partida para o desenvolvimento do novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana*. O desenvolvimento cromatográfico foi conduzido em duas etapas:

2.1.3.1 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa I

Fatores avaliados

A separação cromatográfica das substâncias é influenciada por diversos fatores incluindo tipo de fase estacionária, composição, fluxo e pH da fase móvel.

A retenção de substâncias com grupos ácidos e básicos é complexa e depende do pH da fase móvel (Figura 24, pág. 74). Em $\text{pH} < \text{pKa}$ há inibição da ionização das substâncias ácidas que se tornam menos hidrofílicas e mais retidas na fase reversa. Por outro lado, substâncias básicas são protonadas, tornando-se mais hidrofílicas e menos retidas na fase reversa. O controle do pH da fase móvel pode ser feito pela adição de tampão.

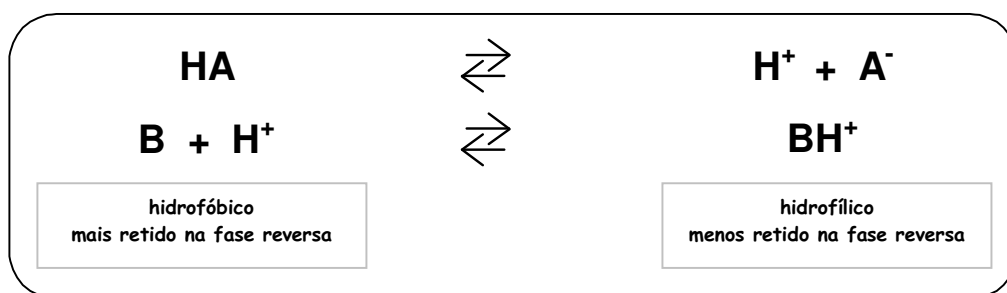


Figura 24: Retenção de substâncias ácidas e básicas.

Além disso, substâncias catiônicas podem interagir com silanóis residuais. A adição de modificadores orgânicos diminui essa interação bloqueando os silanóis residuais, diminuindo assim, a retenção das substâncias catiônicas (SNYDER; KIRKILAND; GLAJCH, 1997).

Experimentos foram conduzidos para avaliar a influência da concentração de trietilamina (TEA), um modificador orgânico, a influência da concentração de ácido fosfórico (H₃PO₄), em uma fase móvel composta de A (tampão, $\text{pH} \approx 2$) e B (ACN) e a influência do tipo de fase estacionária na separação dos metabólitos presentes nas folhas de *C. mandioccana* utilizando um planejamento fatorial composto central.

Planejamento fatorial composto central

Um planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001c; GALDÁMEZ, 2002) foi realizado

para otimizar as condições cromatográficas de análise dos metabólitos de *C. mandioccana*. Esse planejamento consistiu de um fatorial 2^k mais $2k$ pontos axiais e n pontos centrais, onde k representa o número de fatores avaliados. A configuração de um experimento fatorial composto central com dois fatores ($k=2$) pode ser visualizada pela Figura 25, pág. 75. O quadrado com círculos amarelos nas arestas representa o fatorial 2^2 , o círculo amarelo no centro representa o ponto central n , e o losango com quadrados azuis nas arestas representa os pontos axiais do experimento fatorial composto central.

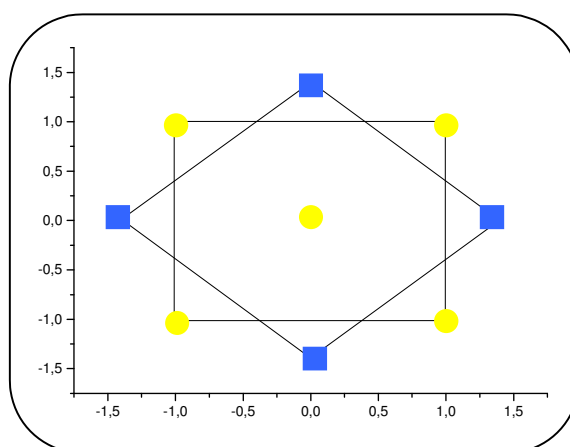


Figura 25: Representação gráfica do planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela.

Os níveis dos fatores (concentração de TEA e concentração de H_3PO_4) foram codificados pela Equação 1, pág. 76, para facilitar a construção do planejamento experimental, remover as unidades de medidas dos fatores, colocar a origem do eixo das variáveis no valor intermediário e definir uma nova escala (Tabela 1, pág. 76). Variáveis codificadas proporcionam também facilidade computacional, com aumento da exatidão na estimativa dos coeficientes do modelo e facilidade de interpretação desses coeficientes, pois todas as variáveis estão sendo estudadas dentro de um mesmo intervalo (TAQUEDA; COSTA; FARIA; 1998). A partir do planejamento fatorial composto central foram realizados 9 experimentos em triplicata para cada coluna cromatográfica (Tabela 2, pág. 76).

$$x = (T - \bar{T}) / (\Delta T / 2)$$

(1)

sendo que:

x é o valor codificado da variável

T é o valor original da variável a ser codificado

\bar{T} é a média entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original

ΔT é a variação entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original

Tabela 1: Níveis codificados para concentração de TEA e H₃PO₄

Fatores	Níveis codificados				
	-1,4	-1,0	0	+1,0	+1,4
[TEA]* mM	5,8	7,2	10,8	14,5	15,9
[H ₃ PO ₄]* mM	6,9	8,7	13,0	17,0	19,1

*[TEA]=concentração de TEA e [H₃PO₄]=concentração de H₃PO₄

Tabela 2: Experimentos realizados (x) em colunas Phenomenex Luna® (C8, C18 e fenil-hexil)

[TEA]* mM	+1,4			X		
	+1,0		X		X	
	0	X		X		X
	-1,0		X		X	
	-1,4			X		
	-1,4	-1,0	0	+1,0	+1,4	
	[H ₃ PO ₄]* mM					

*[TEA]=concentração de TEA e [H₃PO₄]=concentração de H₃PO₄

Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 3, pág. 77.

Tabela 3: Condições cromatográficas para desenvolvimento cromatográfico: Etapa I

Parâmetro	Condição
Fase Estacionária	C8, C18 e fenil-hexil
Fase Móvel: A (Tampão pH \approx 2)* B (ACN)	Gradiente Linear: 15-40% de B em 45 min 40% de B em 15 min 40-15% de B em 3 min
Tempo de Equilíbrio (min)	15
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0
λ (nm)	254
Volume de injeção (μ L)	20

* [TEA] e [H₃PO₄] estabelecidos no planejamento fatorial composto central

Resolução cromatográfica

Para estabelecer uma comparação entre as diferentes condições cromatográficas, a resolução cromatográfica, qualidade da separação entre dois picos, foi avaliada (SNYDER; KIRKILAND; GLAJCH, 1997).

A resolução cromatográfica pode ser calculada pela Equação 2, pág. 77:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (2)$$

sendo que:

R_s é a resolução cromatográfica

t_1 e t_2 são os tempos de retenção do primeiro e segundo pico

W_1 e W_2 são as larguras da linha base do primeiro e segundo pico

A Equação 2, pág. 77, pode ser usada para a medida da resolução quando os picos são bem separados para que os tempos de retenção e as larguras da linha de base possam ser determinadas com confiança. A determinação manual da largura da linha de base envolve a construção de tangentes para cada lado de cada pico e a medida da distância entre as intersecções dessas tangentes com a linha de base. Essa medida pode determinar um R_s impreciso. Uma alternativa aproximada dá mais confiança aos valores de R_s , usando largura à meia altura, Equação 3, pág. 78:

$$R_s = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5,1} + W_{0,5,2}} \quad (3)$$

sendo que:

R_s é a resolução cromatográfica

t_1 e t_2 são os tempos de retenção do primeiro e segundo pico

$W_{0,5,1}$ e $W_{0,5,2}$ são as larguras a meia altura do primeiro e segundo pico

No entanto, cálculos de R_s usando as Equações 2 e 3, pág. 77 e 78, respectivamente, podem não ser confiáveis quando R_s for menor que 1.

A comparação de dois picos adjacentes com curvas de resolução padrão pode também ser usada para determinar os valores de R_s . Essa aproximação não requer nenhum cálculo, é bastante conveniente e aplicada a sobreposições de picos ($0,4 < R_s < 1,3$). Representações ideais de dois picos sobrepostos pode ser calculado como função do tamanho relativo do pico e resolução. Picos reais sobrepostos podem ser comparados com curvas ideais o mais próximo possível.

Uma outra maneira de estimar R_s , baseada na altura do vale entre dois picos adjacentes, pode ser usada para $0,8 < R_s < 1,5$. Esse procedimento resulta em valores mais precisos de R_s , mas requer mais esforço que a curva de resolução padrão.

Por ser mais conveniente, o método de curvas de resolução padrão (Figura 26, pág. 79) foram utilizadas para estimar a resolução cromatográfica entre dois picos sobrepostos em um cromatograma através da comparação. A resolução cromatográfica global (R_sG) foi calculada pela razão entre a soma das resoluções de cada par de pico dividido pelo número total de picos analisados, Equação 4, pág. 78.

$$R_sG = \frac{\sum R_s}{n} \quad (4)$$

sendo que:

R_sG é a resolução cromatográfica global

R_s é a resolução para os pares de picos sobrepostos

n é o número de picos analisados

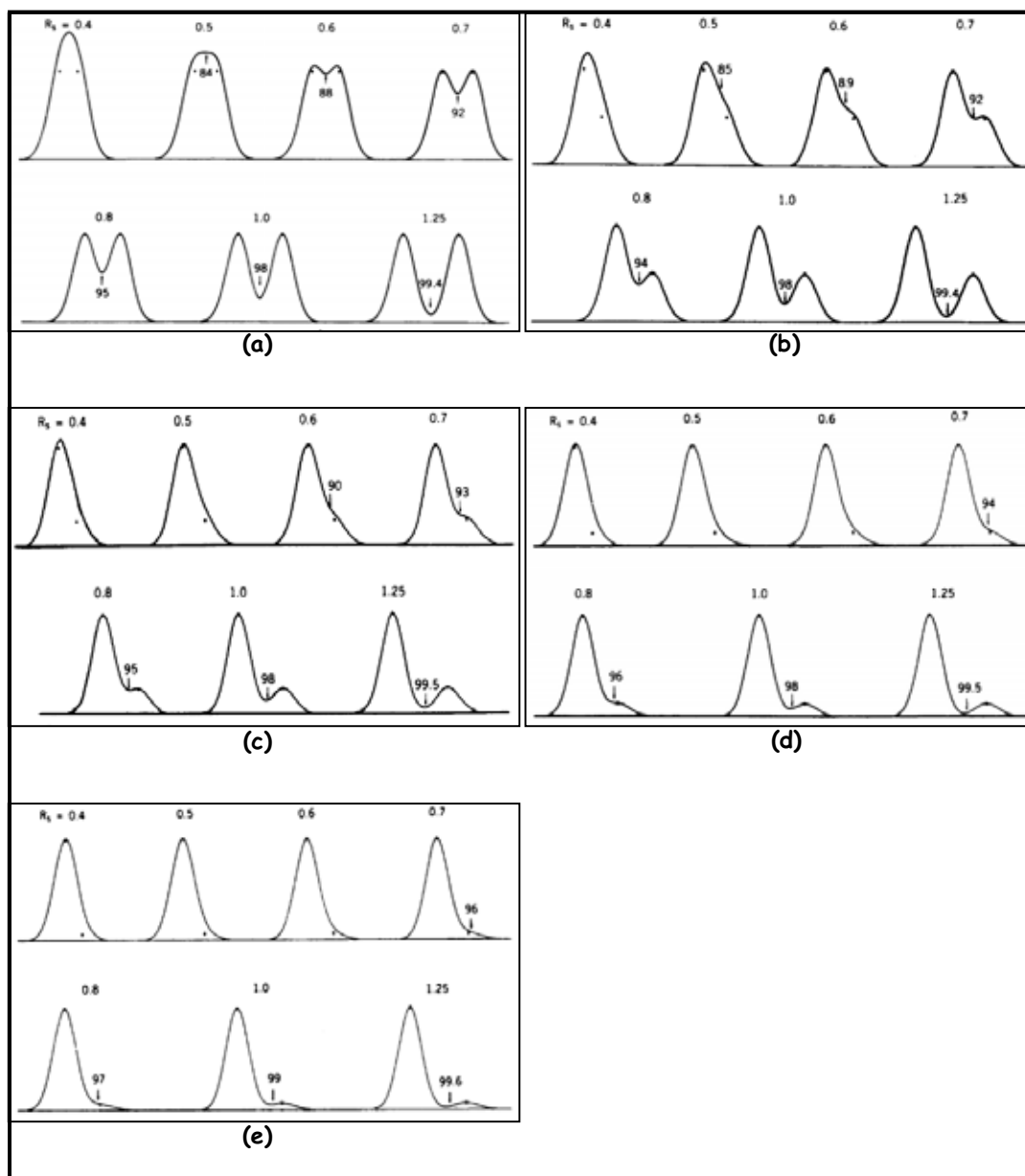


Figura 26: Curva de resolução calculada para diferentes valores de R_s e pares de bandas com uma razão de área de: (a) – 1:1; (b) – 2:1; (c) – 4:1; (d) – 8:1; (e) – 16:1 (SNYDER; KIRKILAND; GLAJCH, 1997).

Análise dos resultados

A influência da concentração de TEA, da concentração de H_3PO_4 e do tipo de fase estacionária na análise dos metabólitos das folhas de *C. mandioccana* foi avaliada através de superfícies de respostas. Superfícies de respostas foram construídas separadamente para cada coluna cromatográfica ajustando-se modelos quadráticos às respostas obtidas pelo planejamento fatorial composto central através

do programa Statistica (Equação 5, pág. 80). As superfícies de respostas foram estudadas na região de interesse tendo como objetivo determinar os níveis ótimos do sistema investigado através da localização do ponto estacionário, conjunto de pontos (x, y) para os quais as derivadas parciais da Equação 5, pág. 80, se igualam a zero.

$$z = b_0 + b_1x + b_2y + b_{12}xy + b_{11}x^2 + b_{22}y^2 \quad (5)$$

sendo que:

z é a resposta

x e y são os fatores experimentais

xy é a interação entre fatores experimentais

$b_0, b_1, b_2, b_{12}, b_{11}$ e b_{22} são os coeficientes do polinômio

O ponto estacionário pode representar um ponto de máximo, um ponto de mínimo ou um ponto de sela conforme apresentado na Figura 27, pág. 80.

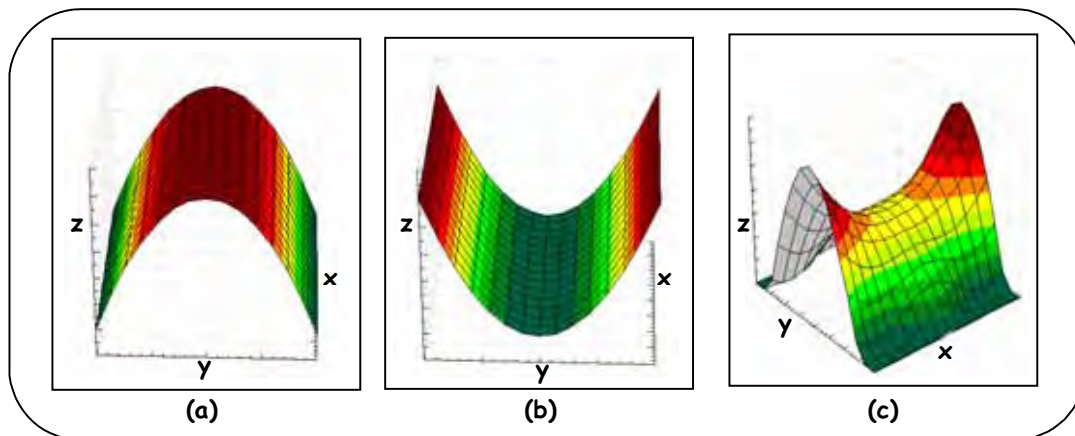


Figura 27: Ponto estacionário de uma superfície de resposta quadrática: (a) – ponto de máximo; (b) – ponto de mínimo; (c) – ponto de sela.

Análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar se o modelo construído foi realmente adequado ao sistema descrito (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001b).

O coeficiente de determinação do modelo, R^2 , foi calculado pela Equação 6, pág. 81.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \quad (6)$$

sendo que:

R^2 é o coeficiente de determinação do modelo

SQ_R é a soma quadrática devido à regressão

SQ_T é a soma quadrática em relação à média total

y é a resposta observada

\bar{y} é a resposta média global

\hat{y} é a resposta estimada pelo modelo

O valor máximo de R^2 é 1. Quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

Pode-se usar um teste F da razão $\frac{MQ_R}{MQ_r}$ para avaliar se a regressão é estatisticamente significativa:

$$\text{se } \frac{MQ_R}{MQ_r} = \frac{\frac{SQ_R}{V_R}}{\frac{SQ_r}{V_r}} > F_{V_R, V_r} \quad \text{então há uma regressão estatisticamente significativa}$$

sendo que:

MQ_R é a média quadrática devido à regressão

MQ_r é a média quadrática residual

SQ_R é a soma quadrática devido à regressão

SQ_r é a soma quadrática residual

V_R é o número de graus de liberdade da SQ_R ($p^* - 1$)

V_r é o número de graus de liberdade da SQ_r ($n^{**} - p^*$)

F_{V_R, V_r} é o valor tabelado da distribuição F no nível de confiança desejado

* p =número de parâmetros

** n =número de observações

O valor de F_{V_R, V_r} pode ser encontrado com o auxílio da Tabela apresentada no Anexo 1, pág. 214 no nível de 95% de confiança, na intersecção da coluna $v_1 = V_R$ com a linha correspondendo a $v_2 = V_r$.

A melhor condição cromatográfica encontrada foi testada experimentalmente. A partir dos valores experimentais de RsG foram calculados os limites inferiores e superiores da RsG no intervalo de 99% de confiança (Equação 7, pág. 82) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001a). O valor de RsG estimado foi avaliado para verificar a exatidão da superfície de resposta.

$$RsG_{lim} = \overline{RsG} \pm t \frac{DP}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

sendo que:

RsG_{lim} são os limites inferiores e superiores da RsG

\overline{RsG} é a média experimental das RsG

t é o número de Student

DP é o desvio padrão das RsG experimentais

n é o número de experimentos

O valor de t foi encontrado com o auxílio da Tabela apresentada no Anexo 2, pág. 215, no nível de 99% de confiança com o número de graus de liberdade (v) dado por $(n-1)$.

2.1.3.2 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa II

Fator avaliado

Após seleção da fase estacionária e das concentrações de TEA e H₃PO₄, experimentos foram conduzidos para otimizar a seletividade da fase móvel na separação dos metabólitos presentes nas folhas de *C. mandioccana* utilizando um planejamento experimental.

Planejamento experimental

Partindo da condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa I, coluna cromatográfica C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH≅2,0) e B (ACN) em um sistema gradiente de 85:15 (A:B) a 60:40 (A:B) em 45 min seguida por uma eluição isocrática com 60:40 (A:B) por 15 min, um planejamento experimental foi realizado para otimizar a seletividade da fase móvel na análise dos metabólitos presentes nas folhas de *C. mandioccana*. Mantendo a força de eluição do desenvolvimento cromatográfico: Etapa I e avaliando a seletividade, experimentos foram conduzidos variando a composição do solvente orgânico (ACN, ACN:MeOH, MeOH).

Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 4, pág. 83. Foram analisados cinco gradientes em triplicata (Tabelas 5 a 9, pág. 84) variando a composição da fase móvel.

Tabela 4: Condições cromatográficas para desenvolvimento cromatográfico: Etapa II

Parâmetro	Condição
Fase Estacionária	C8
Fase Móvel: A (Tampão pH≅2)* B (MeOH) C (ACN)	Gradiente Linear: Tabelas 5 a 9
Tempo de Equilíbrio (min)	15
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0
λ (nm)	254
Volume de injeção (µL)	20

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

Tabela 5: Gradiente Linear I

Gradiente Linear I			
Tempo	% Tampão	% MeOH	% ACN
0	85	0	15
45	60	0	40
60	60	0	40
63	85	0	15

Tabela 6: Gradiente Linear II

Gradiente Linear II			
Tempo	% Tampão	% MeOH	% ACN
0	83	6	11
45	57	13	30
60	57	13	30
63	83	6	11

Tabela 7: Gradiente Linear III

Gradiente Linear III			
Tempo	% Tampão	% MeOH	% ACN
0	79	13	8
45	55	25	20
60	55	25	20
63	79	13	8

Tabela 8: Gradiente Linear IV

Gradiente Linear IV			
Tempo	% Tampão	% MeOH	% ACN
0	77	19	4
45	52	38	10
60	52	38	10
63	77	19	4

Tabela 9: Gradiente Linear V

Gradiente Linear V			
Tempo	% Tampão	% MeOH	% ACN
0	75	25	0
45	50	50	0
60	50	50	0
63	75	25	0

Para o cálculo da % de MeOH equivalente à força de eluição do desenvolvimento cromatográfico: etapa I foi utilizada a Equação 8, pág. 84:

$$\%MeOH = 1,22 + 1,37(\%ACN) - 0,004(\%ACN)^2 \quad (8)$$

Resolução cromatográfica

Para estabelecer uma comparação entre as diferentes condições cromatográficas, a resolução cromatográfica, qualidade da separação entre dois picos, foi avaliada (SNYDER; KIRKILAND; GLAJCH, 1997). Por ser mais conveniente, curvas de resolução padrão (Figura 26, pág. 79) foram utilizadas para estimar a resolução cromatográfica entre dois picos sobrepostos em um cromatograma através da comparação. A resolução cromatográfica (R_s) ou a resolução cromatográfica global (R_{sG}), razão entre a soma das resoluções de cada par de pico dividido pelo número total de picos analisados (Equação 4, pág. 78), foi calculada para o alcalóide, alcalóide e flavonóides, e estirilpironas em cada condição cromatográfica. Um novo gradiente foi estabelecido em função da melhor resolução

cromatográfica (R_s) ou resolução cromatográfica global (R_sG) estabelecida para o alcalóide, alcalóide e flavonóides, e estilipironas.

Análise dos resultados

Folhas de *C. mandioccana* foram analisadas nas condições estabelecidas no desenvolvimento cromatográfico: etapas I e II e os cromatogramas foram comparados.

2.2 – Identificação dos principais metabólitos de *C. mandioccana*

Alcalóides (menisperina e xantoplanina) obtidos a partir das cascas do tronco de *C. mandioccana* (item 2.2.1, pág. 85), flavonóides (quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*-alopiranosídeo e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo) obtidos a partir das folhas de *C. mandioccana* (NEHME, et al., 2005) e estilipironas (criptomoscatona E3, criptomoscatoína D1, criptomoscatoína F1, desacetilcriptocarialactona e criptomoscatoína E1) obtidos a partir das cascas do tronco e folhas de *C. mandioccana* (CAVALHEIRO e YOSHIDA, 2000, TELASCREA, 2006) e identificados por UV e RMN foram utilizados como padrões para identificação dos metabólitos secundários das folhas de *C. mandioccana*. O extrato bruto das folhas de *C. mandioccana* preparado segundo o item 2.1.2, pág. 73, e os padrões solubilizados em MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v) foram analisados em CLAE-DAD no método cromatográfico desenvolvido e a identificação foi realizada comparando tempo de retenção e espectros na região do UV.

2.2.1 – Isolamento e identificação de alcalóides aporfínicos quaternários

Cryptocarya apresenta compostos bioativos tais como alcalóides (TORIBIO, et al., 2006), flavonóides e pironas (DUMONTET, et al., 2001, DUMONTET, et al., 2004, RICARDO, et al., 2004). Estudos fitoquímicos das cascas de *C. mandioccana* têm mostrado que estilipironas são os metabólitos secundários típicos presentes nessa espécie (CAVALHEIRO e YOSHIDA, 2000). Flavonóides glicosilados, bem como estilipironas têm sido detectados em folhas (NEHME, et al., 2005). Nenhuma investigação química de *C. mandioccana* resultou no isolamento de alcalóides; no

entanto, estudos fitoquímicos de outras espécies de *Cryptocarya* têm relatado a presença desses metabólitos em folhas e cascas do tronco (LEE, et al., 1993a, LEE; CHEN; LIU, 1993b, LIN; WANG; WU, 2002, WU; LIN, 2001). Muitos deles são antitumorais, bactericidas, fungicidas, inseticidas ou antioxidantes (TORIBIO, et al., 2006).

Cascas do tronco dos indivíduos CB 231, 283, 301, 314, 354 do quimiotipo F e dos indivíduos CB 230, 300, 302, 316, 353 do quimiotipo FS de *C. mandioccana* secas e moídas (100 g) foram extraídas com 800 mL de hexano em ultra-som por 30 min, seguida pela adição de 800 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v) em ultra-som por mais 30 min. Depois de filtrada, a fase hidroalcoólica foi separada da fase hexânica em funil de separação e concentrada em rota evaporador resultando em 12 g de extrato hidroalcoólico I. Parte desse extrato (989 mg) foi submetido a extração líquido-líquido com CHCl₃/MeOH/HAc 10% 2:1:1 (v/v) resultando em 470 mg de extrato hidroalcoólico II. Esse extrato foi fracionado por coluna cromatográfica em sílica gel (25,0 x 1,2 cm; 40-63 µm) eluída usando um sistema gradiente com CHCl₃/MeOH/NH₄OH_{conc} 70:30:10 a 63:37:10% (v/v) resultando no isolamento dos alcalóides **1** (38,0 mg) e **2** (7,7 mg), Figura 28, pág. 86.

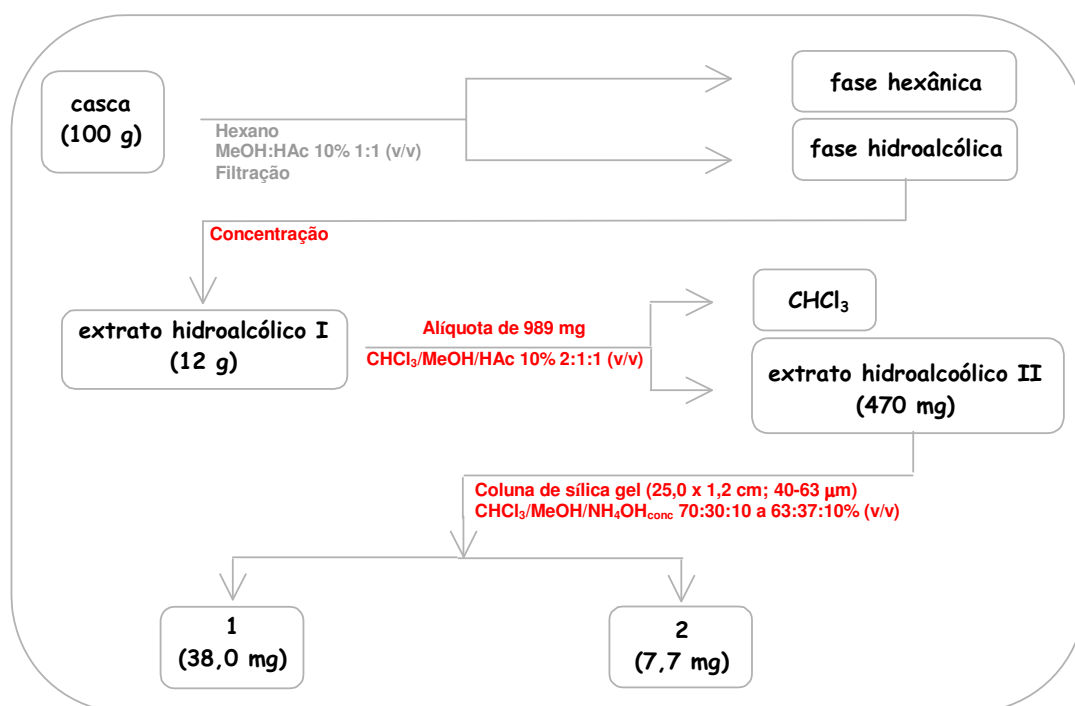


Figura 28: Isolamento de alcalóides aporfínicos quaternários.

2.3 – Validação de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana*

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A estratégia aplicada para a validação do método cromatográfico seguiu as normas propostas pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Um protocolo de validação foi estabelecido e critérios de aceitação foram definidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e estabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004).

2.3.1 – Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico empregado foi um cromatógrafo líquido Varian ProStar acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). Uma coluna Phenomenex Luna[®] C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) foi usada no sistema CLAE-DAD. A fase móvel foi composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH≈2,0), B (MeOH) e C (ACN). A separação foi realizada em um sistema gradiente (Tabela 10, pág.87) em um fluxo de 1,0 mLmin⁻¹. O espectro no UV foi registrado entre 200 e 400 nm e o comprimento de onda específico monitorado foi 254 nm. Uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema e as análises foram conduzidas em temperatura ambiente.

Tabela 10: Gradiente da composição ternária

Tempo	%Tampão*	% MeOH	% ACN
0	83	06	11
10	77	08	15
20	67	19	14
30	61	22	17
40	59	14	27
45	50	50	0
60	50	50	0
63	83	06	11

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

2.3.2 – Preparação dos padrões e das amostras

2.3.2.1 – Preparação dos padrões

Soluções estoque de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas dissolvendo 2,0 mg de cada analito em 5,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).

Solução estoque de padrão interno, goniotalamina, ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo 2,0 mg do analito em 5,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).

2.3.2.2 – Preparação das amostras

Soluções contendo 10, 15, 20, 30, 50, 75, 150 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona foram preparadas pela diluição apropriada das soluções estoque. Em cada solução foram adicionados $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goniotalamina pela diluição apropriada da solução estoque.

Goniotalamina, estilípirona obtida a partir das folhas de *C. moschata* (TELASCREA, 2006), ausente no extrato de folhas de *C. mandioccana* (Figura 29, pág. 88), foi utilizada como padrão interno. A utilização de padrão interno é o método utilizado com maior confiabilidade nas determinações cromatográficas quantitativas.

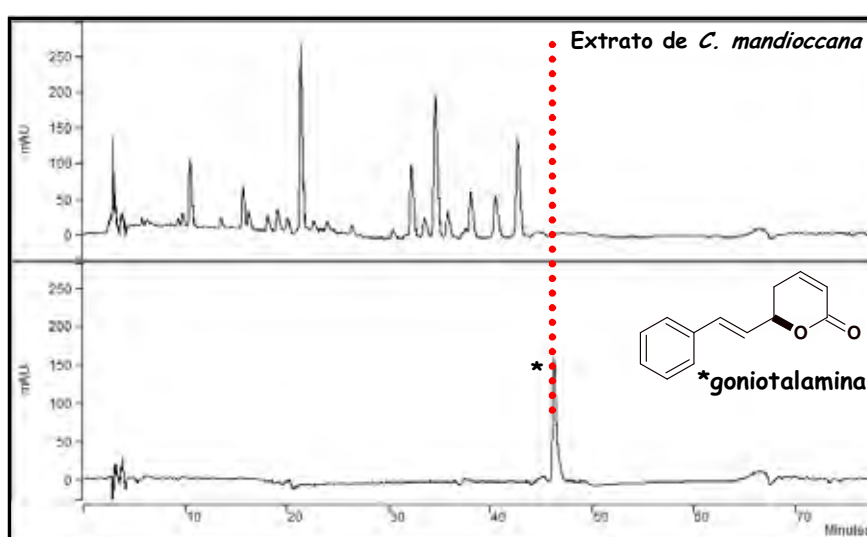


Figura 29: Ausência de goniotalamina, utilizada como padrão interno, no extrato de *C. mandioccana*.

2.3.3 – Parâmetros validados

A proposta de validação do método cromatográfico desenvolvido em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas estabelecida neste trabalho envolveu parâmetros que compreenderam:

2.3.3.1 – Seletividade

Em métodos cromatográficos deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico, com auxílio de detector de arranjo de diodos, é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004). A seletividade foi verificada pela análise em CLAE-DAD do extrato de folhas de *C. mandioccana* preparada segundo o item 2.1.2, pág. 73, e dos padrões menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona solubilizados em MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v). A pureza dos picos de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona na amostra foi verificada através do Software do detector de arranjo de diodos (PolyView) pela análise do espectro na região do UV em diferentes regiões dos picos.

2.3.3.2 – Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004).

A linearidade foi avaliada através dos coeficientes de correlação da curva analítica na faixa de concentração de 15 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona. A curva analítica com padronização interna, 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de goniotalamina, e com padronização externa foi construída com 7 níveis de concentração (15, 20, 30, 50, 75, 150 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3.3 – Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a aproximação de resultados de uma série de medidas obtidas de uma amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004). A precisão foi estimada pela medida da repetibilidade e da precisão intermediária em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para cada analito.

Para a padronização interna, na avaliação da repetibilidade amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Na avaliação da precisão intermediária amostras foram analisadas em triplicata em três dias consecutivos. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-O-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona e desvio padrão (DP) do tempo de retenção relativo médio (razão entre tempo de retenção do analito e tempo de retenção do padrão interno) em cada nível.

Para a padronização externa, na avaliação da repetibilidade amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Na avaliação da precisão intermediária amostras foram analisadas em triplicata em três dias consecutivos. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-O-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona e desvio padrão (DP) do tempo de retenção médio dos analitos em cada nível.

2.3.3.4 – Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004). O LD foi estimado pelo método visual.

2.3.3.5 – Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004). O LQ foi estimado pelo método visual.

2.3.3.6 – Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, RIBANI, et al., 2004). A exatidão foi avaliada pelo método de adição padrão. Esse método é utilizado quando é difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. Extratos de *C. mandioccana* não fortificados e fortificados com menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram analisados em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média de cada analito determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em cada nível.

2.3.3.7 – Estabilidade

Para a padronização interna e externa, a estabilidade da amostra foi avaliada em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em intervalos regulares de 24 horas durante três dias. Durante esse período, a amostra foi estocada a 4°C.

RESULTADOS

1 – Desenvolvimento de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana*

1.1 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa I

Os cromatogramas assim como as resoluções cromatográficas globais (R_sG) obtidos pelos experimentos realizados com as colunas cromatográficas C8, C18 e fenil-hexil estão apresentados nas Figuras 30 a 32, pág. 92 a 94, respectivamente. Com as resoluções cromatográficas globais (R_sG) foram construídas superfícies de respostas quadráticas em função das concentrações de TEA e H_3PO_4 para cada coluna cromatográfica (Figura 33, pág. 95).

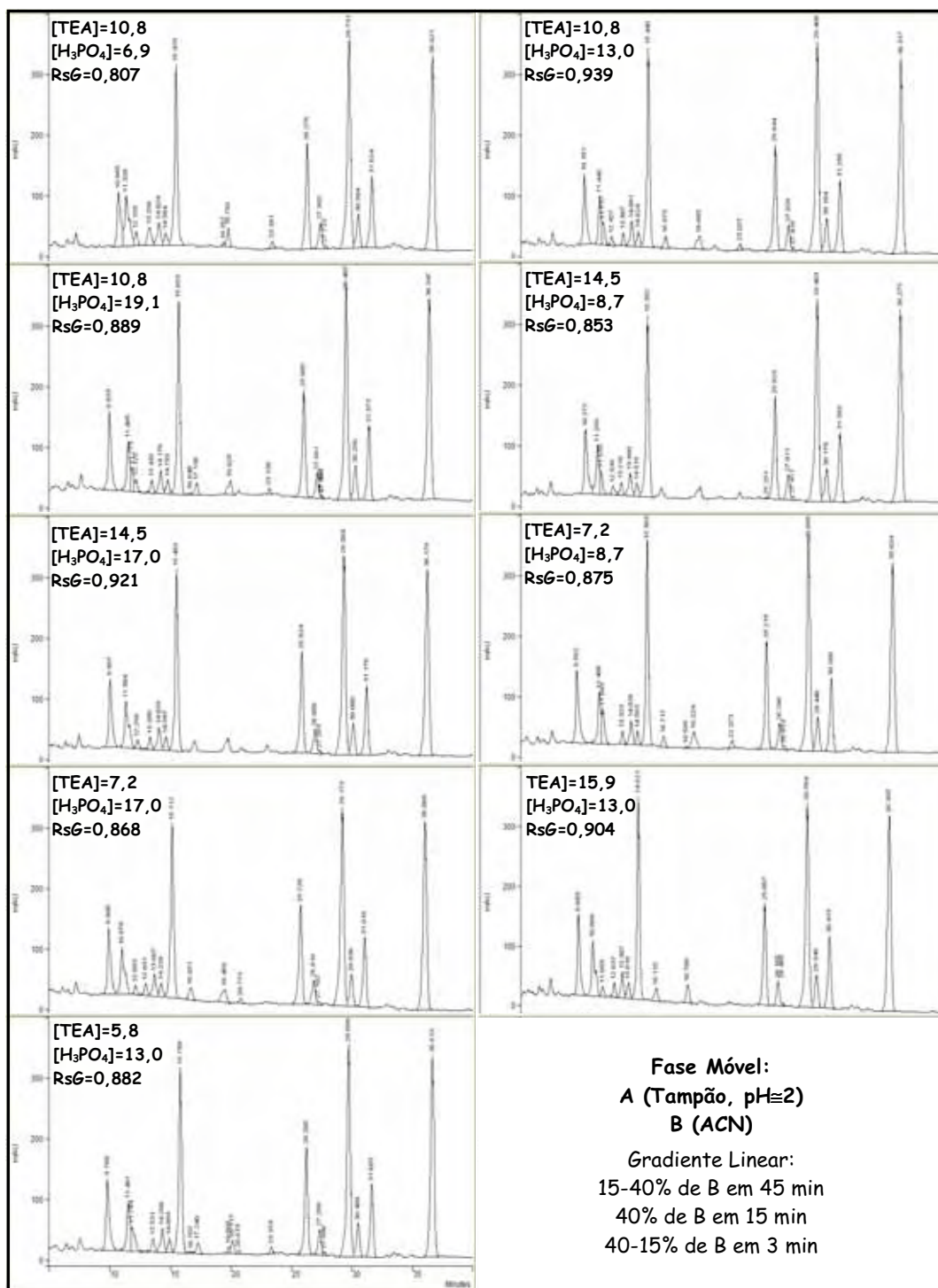


Figura 30: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (RsG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica C8.

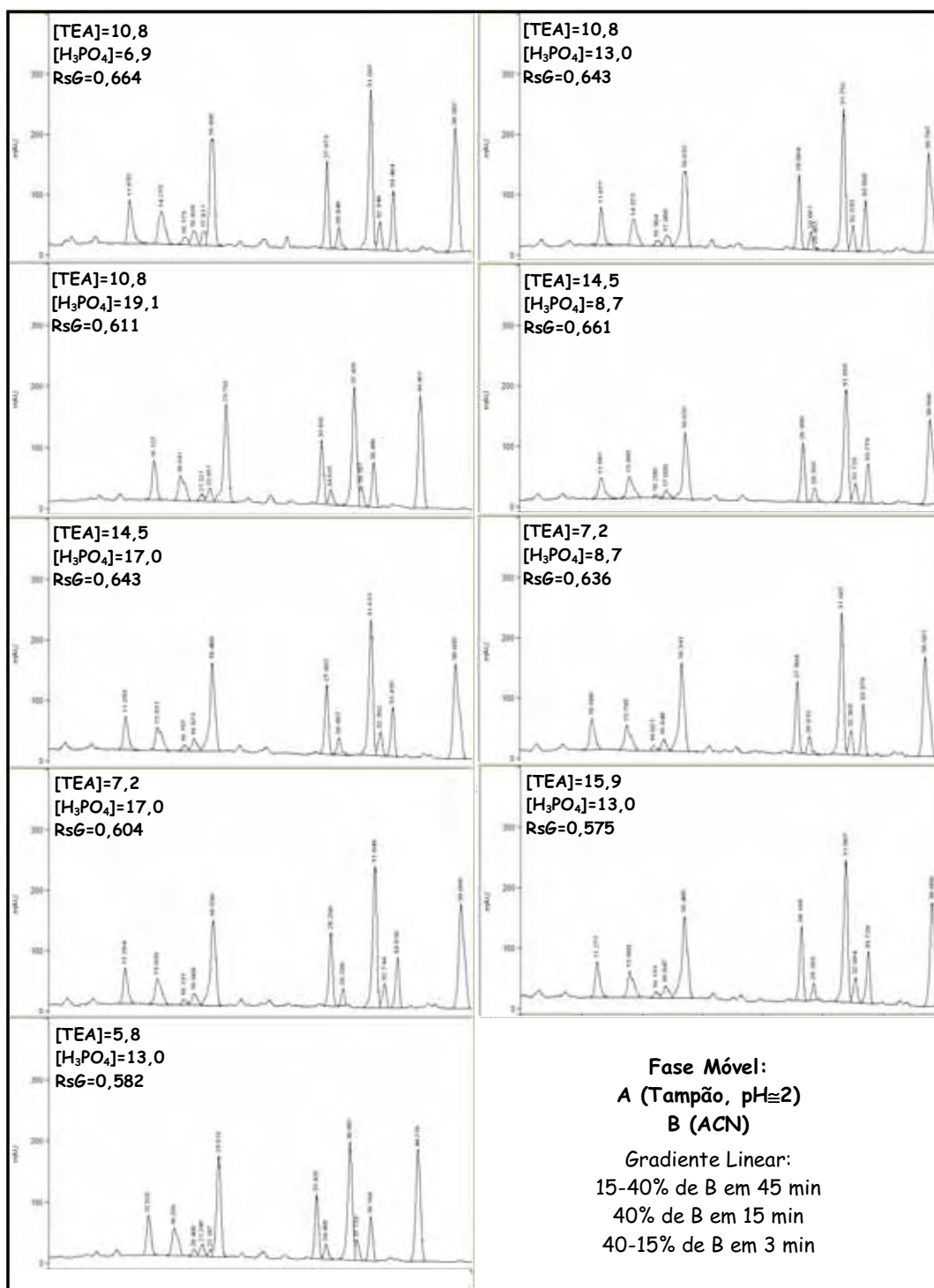


Figura 31: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (RsG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica C18.

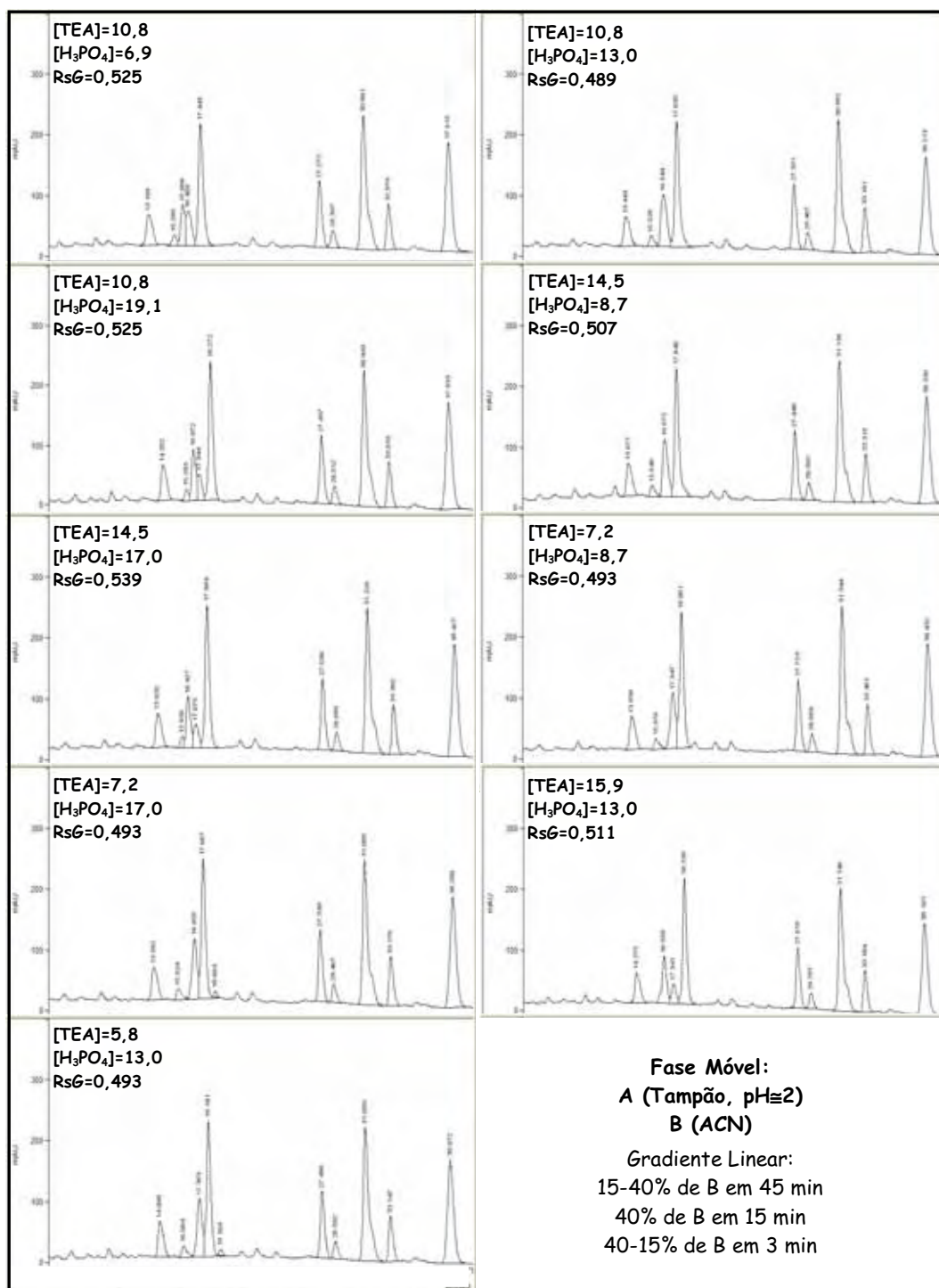


Figura 32: Cromatogramas e resoluções cromatográficas globais (RsG) obtidas pelos experimentos com coluna cromatográfica fenil-hexil.

x ([TEA]):	5,8 mM (-1,4)	y ([H ₃ PO ₄]):	6,9 mM (-1,4)
	7,2 mM (-1,0)		8,7 mM (-1,0)
	10,8 mM (0)		13,0 mM (0)
	14,5 mM (+1,0)		17,0 mM (+1,0)
	15,9 mM (+1,4)		19,1 mM (+1,4)

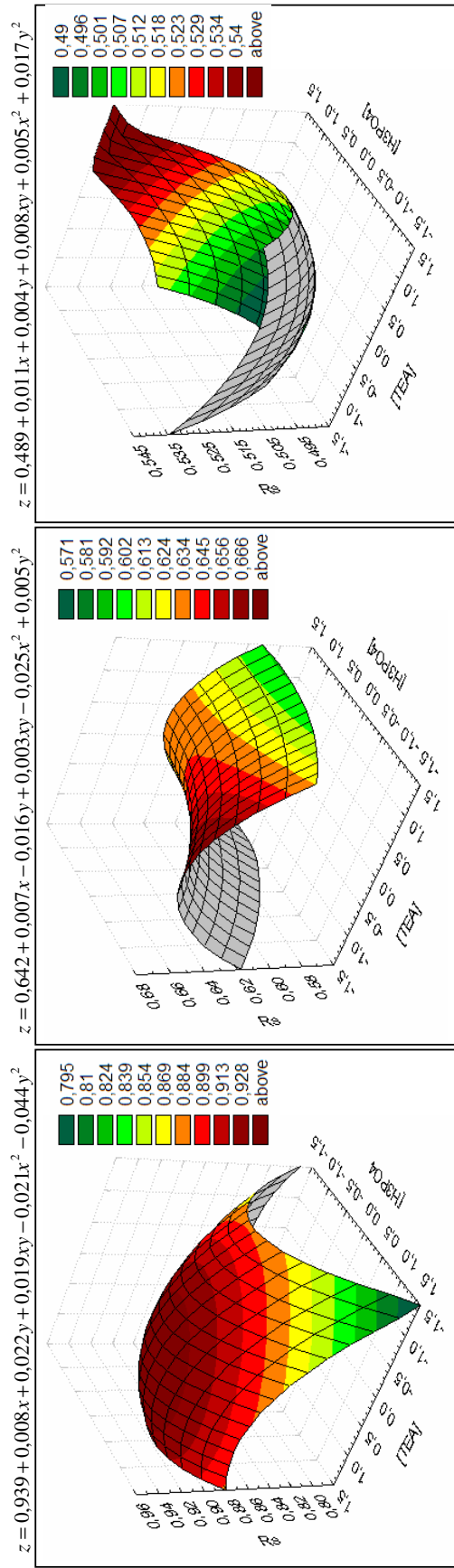


Figura 33: Superfícies de respostas aplicadas para a avaliação das condições ótimas na análise dos metabólitos de *C. mandiocana* em: **(a)** – coluna cromatográfica C8; **(b)** – coluna cromatográfica C18; **(c)** – coluna cromatográfica fenil-hexil.

A resolução cromatográfica global (R_sG) foi fortemente influenciada pelo tipo de coluna cromatográfica utilizada. O estudo das superfícies de respostas (Figura 33, pág. 95) possibilitou a localização do ponto estacionário (ponto onde as derivadas parciais da equação de regressão da superfície de resposta são iguais a zero). Para a coluna cromatográfica C18 um ponto de sela (Figura 33b, pág. 95) foi obtido como ponto estacionário com 11,6 mM de TEA, 19,5 mM de H_3PO_4 e R_sG de 0,63 (Tabela 11, pág. 96). Um ponto mínimo (Figura 33c, pág. 95) foi obtido como ponto estacionário para a coluna cromatográfica fenil-hexil com 6,5 mM de TEA, 13,9 mM de H_3PO_4 e R_sG de 0,48 (Tabela 11, pág. 96). A melhor condição estimada para a análise de metabólitos de folhas de *C. mandioccana* dada pelo ponto máximo estacionário (Figura 33a, pág. 95) envolveu 11,9 mM de TEA, 14,3 mM de H_3PO_4 com coluna cromatográfica C8 e R_sG de 0,94 (Tabela 11, pág. 96). Seus valores críticos estão dentro do intervalo experimental.

Tabela 11: Ponto estacionário (concentração de TEA e concentração de H_3PO_4) determinados a partir da superfície de resposta e R_sG estimados para cada coluna cromatográfica e verificação do modelo da superfície de resposta quadrática^a

Colunas Cromatográficas	Ponto Estacionário		Valores Estimados ^b	R^2
	[TEA]	[H_3PO_4]	R_sG	
C8	11,9	14,3	0,94	0,96
C18	11,6	19,5	0,63	0,73
Fenil-hexil	6,5	13,9	0,48	0,88

^a $Z = a_1 + a_2X + a_3Y + a_4X^2 + a_5XY + a_6Y^2$ onde Z = variável dependente, representando a resolução cromatográfica global (R_sG) e X e Y = variáveis independentes representando a concentração de TEA e a concentração de H_3PO_4 .

^b Valores estimados foram calculados a partir da respectiva superfície de resposta usando os pontos estacionários

Análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar se o modelo construído estava realmente adequado ao sistema descrito. O coeficiente de determinação do modelo, R^2 , foi calculado para cada superfície e o melhor ajuste foi encontrado com a coluna cromatográfica C8 (R^2 mais próximo de 1), (Tabela 11, pág. 96). A superfície de resposta para a coluna cromatográfica C8 foi estatisticamente significativa de acordo com o teste F ao nível de 95%. A condição ótima estimada foi testada experimentalmente e o valor estimado foi avaliado para verificar a exatidão da superfície construída. O valor estimado de R_sG esteve dentro dos limites inferiores e superiores da R_sG experimental no intervalo de 99% de confiança (Tabela 12, pág. 97).

Tabela 12: Teste da condição ótima determinada pela superfície de resposta

	Limite inferior intervalo de 99% de confiança	Valor experimental (n=3)	Limite superior intervalo de 99% de confiança	Valor estimado ^a
RsG	0,74	0,85	0,96	0,94

^a Determinado pelo ponto estacionário com base no modelo quadrático (ver Tabela 11, pág.96).

1.2 – Desenvolvimento cromatográfico: Etapa II

Os cromatogramas expandidos, a partir dos quais foi calculada a resolução cromatográfica (R_s) entre menisperina (pico 1) e o pico adjacente em cada condição cromatográfica, estão apresentados na Figura 34, pág. 99. A resolução cromatográfica (R_s) foi calculada entre menisperina (pico 1) e o pico adjacente em cada condição cromatográfica (Figura 34, pág. 99). A melhor condição cromatográfica encontrada para a resolução entre menisperina (pico 1) e o pico adjacente foi o gradiente linear II (Figura 34b, pág. 99, Tabela 13, pág. 102).

Os cromatogramas expandidos, a partir dos quais foi calculada a resolução cromatográfica global (R_sG) entre xantoplanina (pico 2), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (pico 3), quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (pico 4), quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo (pico 5), quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo (pico 6), quercetina-3-*O*-alopiranosídeo (pico 7) e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo (pico 8) em cada condição cromatográfica, estão apresentados na Figura 35, pág. 100. A resolução cromatográfica global (R_sG) foi calculada entre xantoplanina (pico 2), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (pico 3), quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (pico 4), quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo (pico 5), quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo (pico 6), quercetina-3-*O*-alopiranosídeo (pico 7) e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo (pico 8) em cada condição cromatográfica (Figura 35, pág. 100.). A melhor condição cromatográfica encontrada para a resolução entre xantoplanina (pico 2), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (pico 3), quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo (pico 4), quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo (pico 5), quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo (pico 6), quercetina-3-*O*-alopiranosídeo (pico 7) e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo (pico 8) foi o gradiente linear III (Figura 35c, pág. 100, Tabela 13, pág. 102).

Os cromatogramas expandidos, a partir dos quais foi calculada a resolução cromatográfica global (R_sG) entre as estilipironas do grupo I: criptomoscatoa E_3 (pico 9), criptomoscatoa D_1 (pico 10), pico não identificado 1 (pico NI_1) e pico não

identificado 2 (pico NI₂) e entre as estirilpironas do grupo II: criptomoscato n a F₁ (pico 11), desacetilcriptocarialactona (pico 12), criptomoscato n a E₁ (pico 13) e pico não identificado 3 (pico NI₃) em cada condição cromatográfica, estão apresentados na Figura 36, pág. 101. A resolução cromatográfica global (R_sG) foi calculada entre as estirilpironas do grupo I: criptomoscato n a E₃ (pico 9), criptomoscato n a D₁ (pico 10), pico não identificado 1 (pico NI₁) e pico não identificado 2 (pico NI₂) e entre as estirilpironas do grupo II: criptomoscato n a F₁ (pico 11), desacetilcriptocarialactona (pico 12), criptomoscato n a E₁ (pico 13) e pico não identificado 3 (pico NI₃) em cada condição cromatográfica (Figura 36, pág. 101). A melhor condição cromatográfica encontrada para a resolução entre as estirilpironas do grupo I: criptomoscato n a E₃ (pico 9), criptomoscato n a D₁ (pico 10), pico não identificado 1 (pico NI₁) e pico não identificado 2 (pico NI₂) foi o gradiente linear II (Figura 36b, pág. 101, Tabela 13, pág. 102) e a melhor condição cromatográfica encontrada para a resolução entre as estirilpironas do grupo II: criptomoscato n a F₁ (pico 11), desacetilcriptocarialactona (pico 12), criptomoscato n a E₁ (pico 13) e pico não identificado 3 (pico NI₃) foi o gradiente linear V (Figura 36e, pág. 101, Tabela 13, pág. 102).

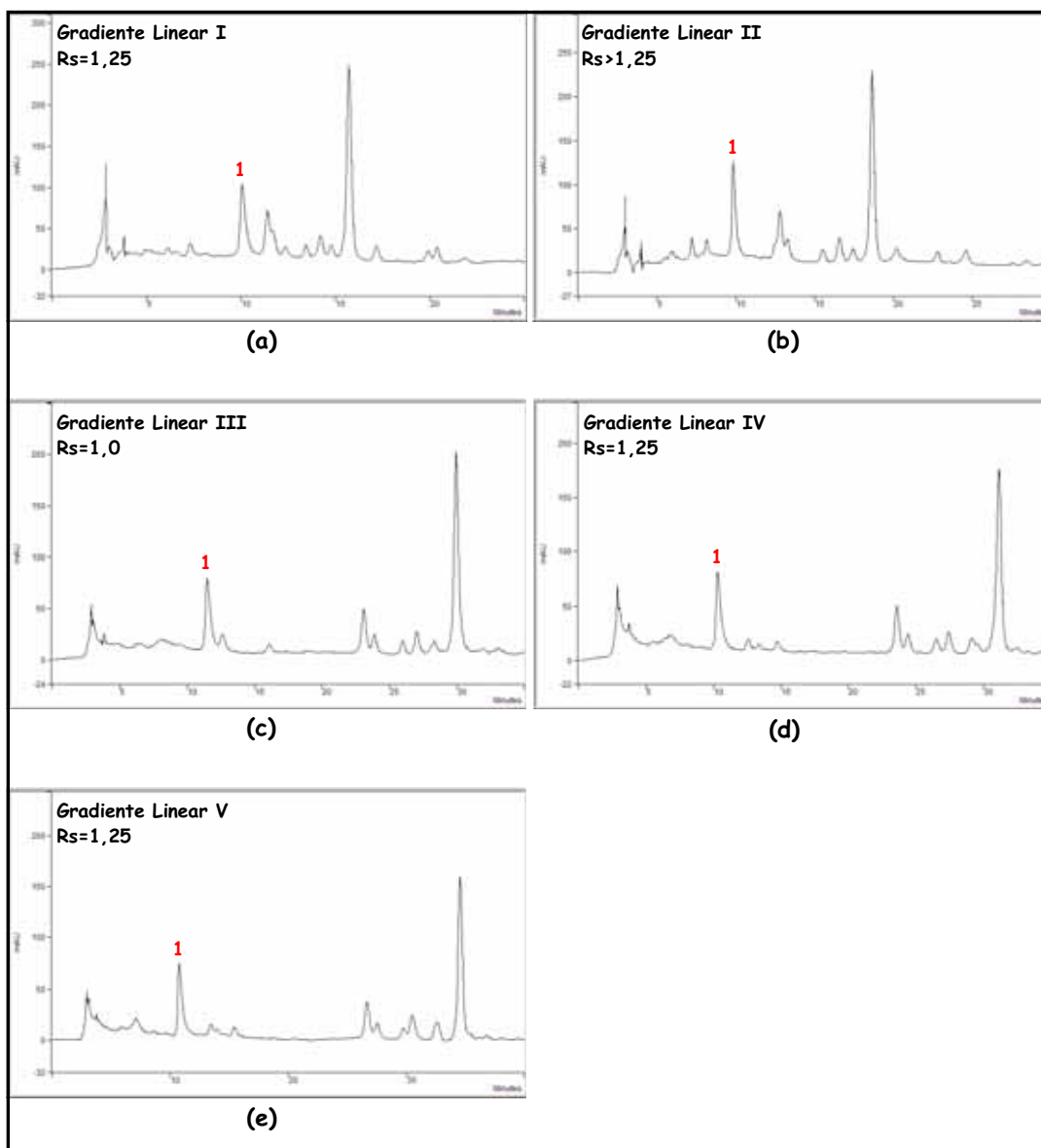


Figura 34: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas (R_s) calculadas entre menisperina (pico 1) e o pico adjacente em cada condição cromatográfica.

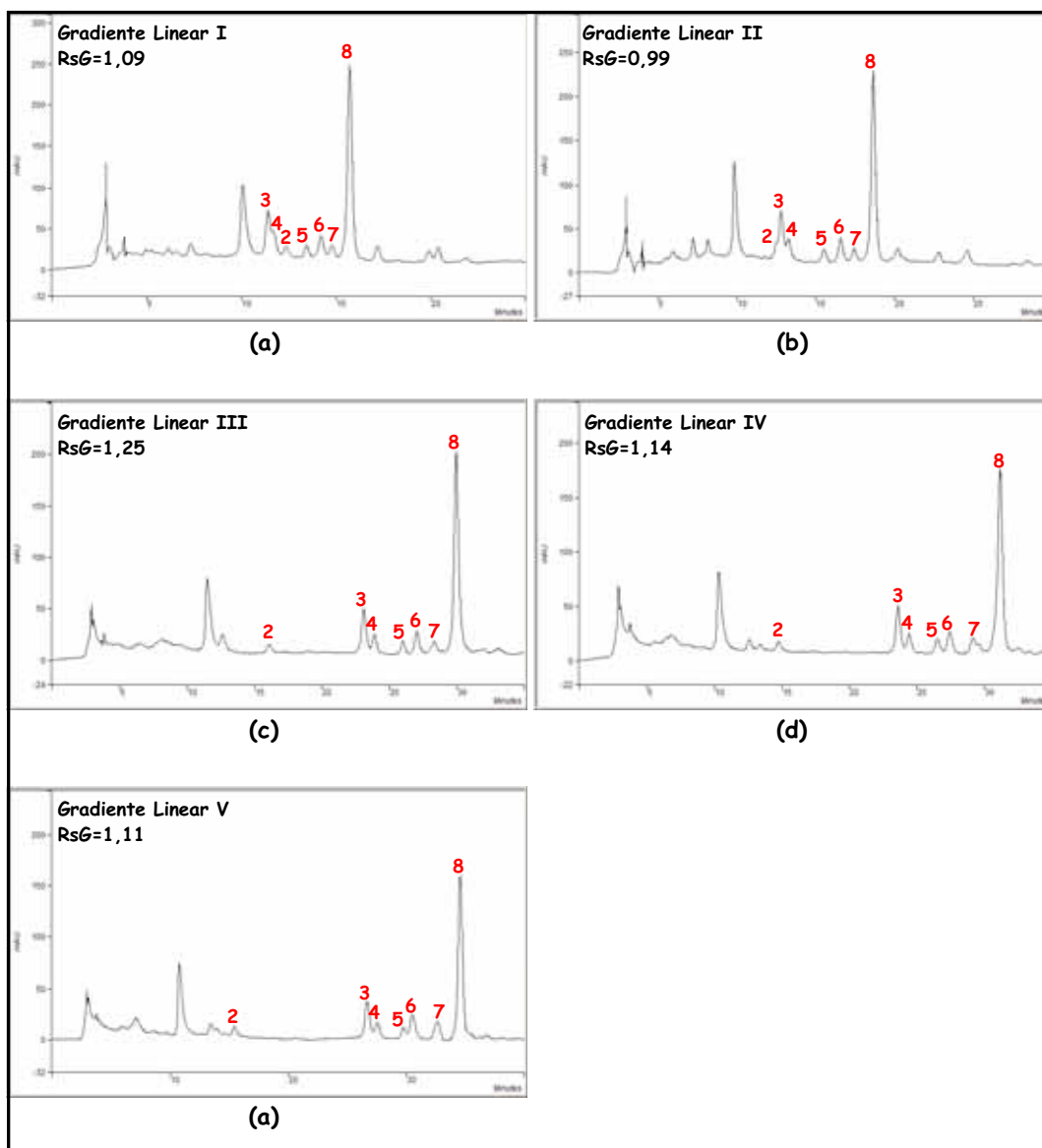


Figura 35: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas globais (RsG) calculadas entre xantoplanina (pico 2), quercetina-3-O-galactopiranosídeo (pico 3), quercetina-3-O-glicopiranosídeo (pico 4), quercetina-3-O-xilopiranosídeo (pico 5), quercetina-3-O-arabinopiranosídeo (pico 6), quercetina-3-O-alopiranosídeo (pico 7) e quercetina-3-O-ramnopiranosídeo (pico 8) em cada condição cromatográfica.

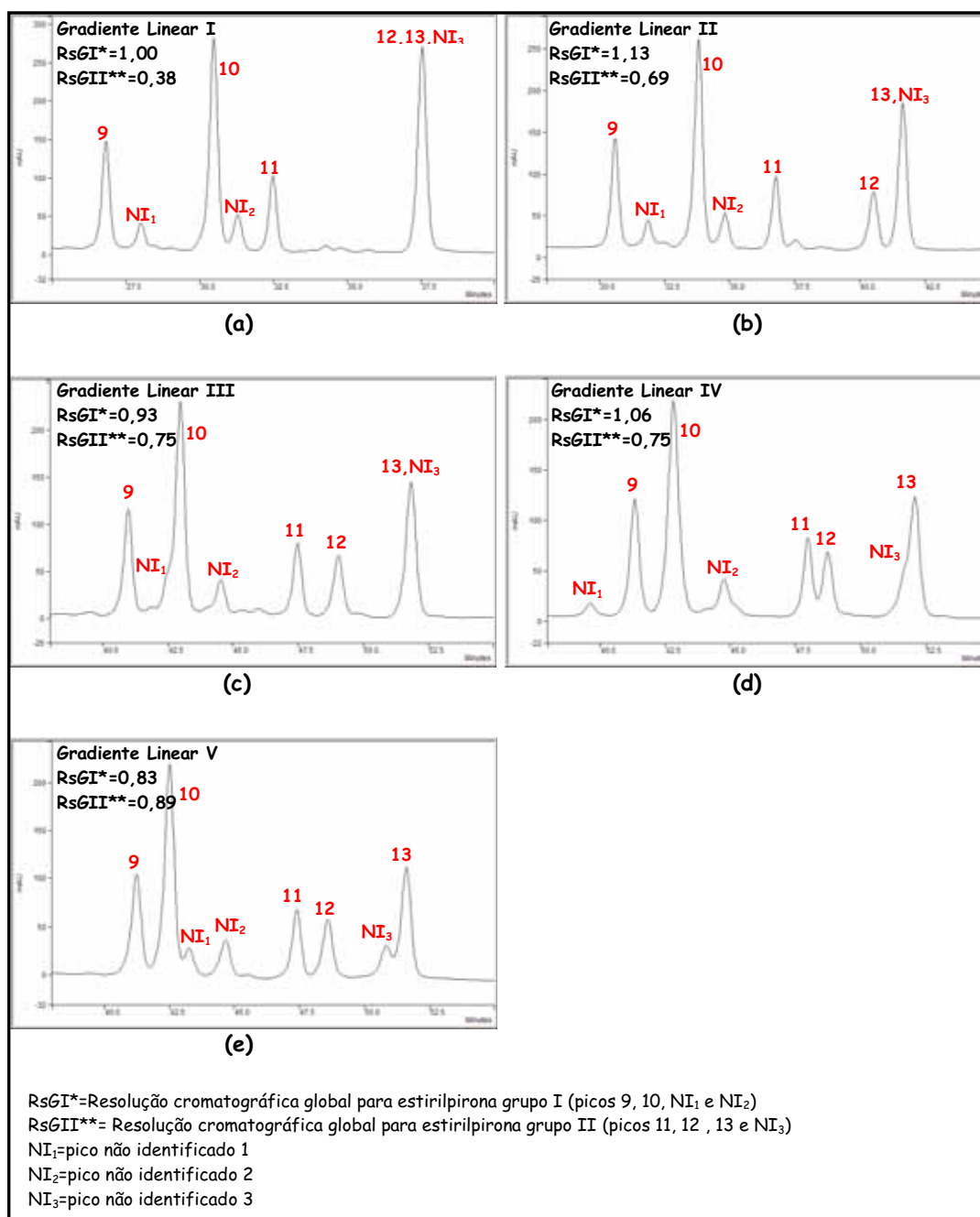


Figura 36: Cromatogramas expandidos e resoluções cromatográficas globais (RsG) entre as estirilpironas do grupo I: criptomoscatoana E_3 (pico 9), criptomoscatoana D_1 (pico 10), pico não identificado 1 (pico NI_1) e pico não identificado 2 (pico NI_2) e entre as estirilpironas do grupo II: criptomoscatoana F_1 (pico 11), desacetilcriptocarialactona (pico 12), criptomoscatoana E_1 (pico 13) e pico não identificado 3 (pico NI_3) em cada condição cromatográfica.

Tabela 13: Melhor resolução cromatográfica (R_s) ou resolução cromatográfica global (R_sG) para alcalóide, alcalóide e flavonóides, e estirilpironas grupo I e II

	Alcalóide	Alcalóide e flavonóides	Estirilpironas grupo I	Estirilpironas grupo II
Rs ou RsG	>1,25	1,25	1,13	0,89
Gradiente	II	III	II	V

Um novo gradiente com composição ternária (Tabela 14, pág. 102) foi estabelecido em função da melhor resolução cromatográfica (R_s) ou resolução cromatográfica global (R_sG) estabelecida para o alcalóide, alcalóide e flavonóides, e estirilpironas (Tabela 13, pág. 102).

Tabela 14: Novo gradiente e sua composição ternária

Tempo	% Tampão*	% MeOH	% ACN
0	83	06	11
10	77	08	15
20	67	19	14
30	61	22	17
40	59	14	27
45	50	50	0
60	50	50	0

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

Folhas de *C. mandioccana* foram analisadas na condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa I, coluna cromatográfica C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH≅2,0) e B (ACN) em um sistema gradiente de 85:15 (A:B) a 60:40 (A:B) em 45 min seguida por uma eluição isocrática com 60:40 (A:B) por 15 min, e na condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa II, coluna cromatográfica C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH≅2,0), B (MeOH) e C (ACN) em um sistema gradiente (Tabela 14, pág.102). Os cromatogramas obtidos nas duas condições foram comparados e estão apresentados na Figura 37, pág. 103.

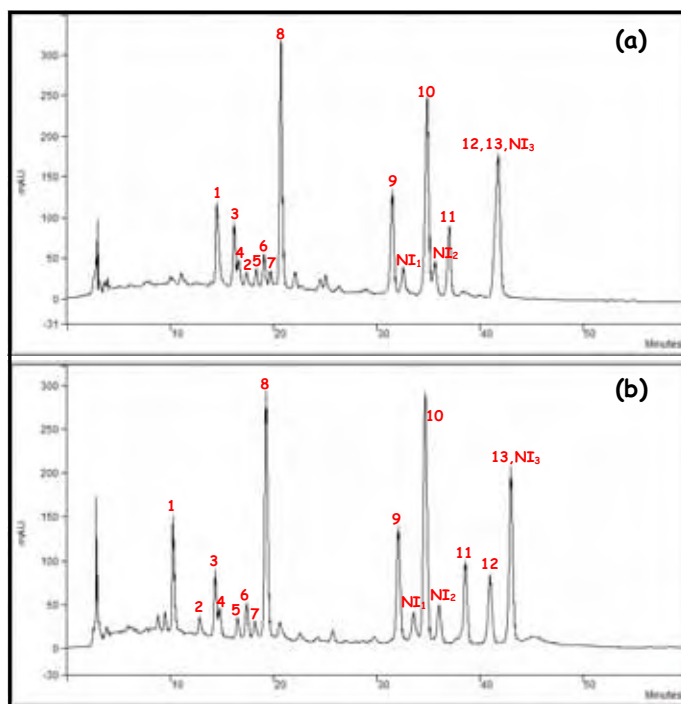


Figura 37: Cromatogramas de folhas de *C. mandioccana* analisadas nas condições estabelecidas no: **(a)** – desenvolvimento cromatográfico: etapa I; **(b)** – desenvolvimento cromatográfico: etapa II.

Através da análise dos cromatogramas (Figura 37, pág. 103), a melhor resolução foi encontrada com a condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa II (Figura 37b, pág. 103). Portanto, coluna cromatográfica C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH≈2,0), B (MeOH) e C (ACN) em um sistema gradiente (Tabela 14, pág. 102) foram selecionados para análise dos metabólitos de *C. mandioccana*.

2 – Identificação dos principais metabólitos de *C. mandioccana*

Alcalóides (menisperina e xantoplanina) obtidos a partir das cascas do tronco de *C. mandioccana* (item 2.1, pág. 106), flavonóides (quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*-alopiranosídeo e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo) obtidos a partir das folhas de *C. mandioccana* (NEHME, et al., 2005) e estilipironas (criptomoscatona E3, criptomoscatoana D1, criptomoscatoana F1, desacetilcriptocarialactona e criptomoscatoana E1) obtidos a partir das cascas do tronco e folhas de *C. mandioccana* (CAVALHEIRO e YOSHIDA,

2000, TELASCREA, 2006) e identificados por UV e RMN foram utilizados como padrões para identificação dos metabólitos secundários das folhas de *C. mandioccana*. O extrato bruto das folhas e os padrões foram analisados em CLAE-DAD no método cromatográfico desenvolvido e a identificação foi realizada comparando tempo de retenção e espectros na região do UV. De acordo com a Figura 38, pág. 105, os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 são menisperina, xantoplanina, quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*-alopiranosídeo, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo, criptomoscatoína E3, criptomoscatoína D1, criptomoscatoína F1, desacetilcriptocarialactona e criptomoscatoína E1.

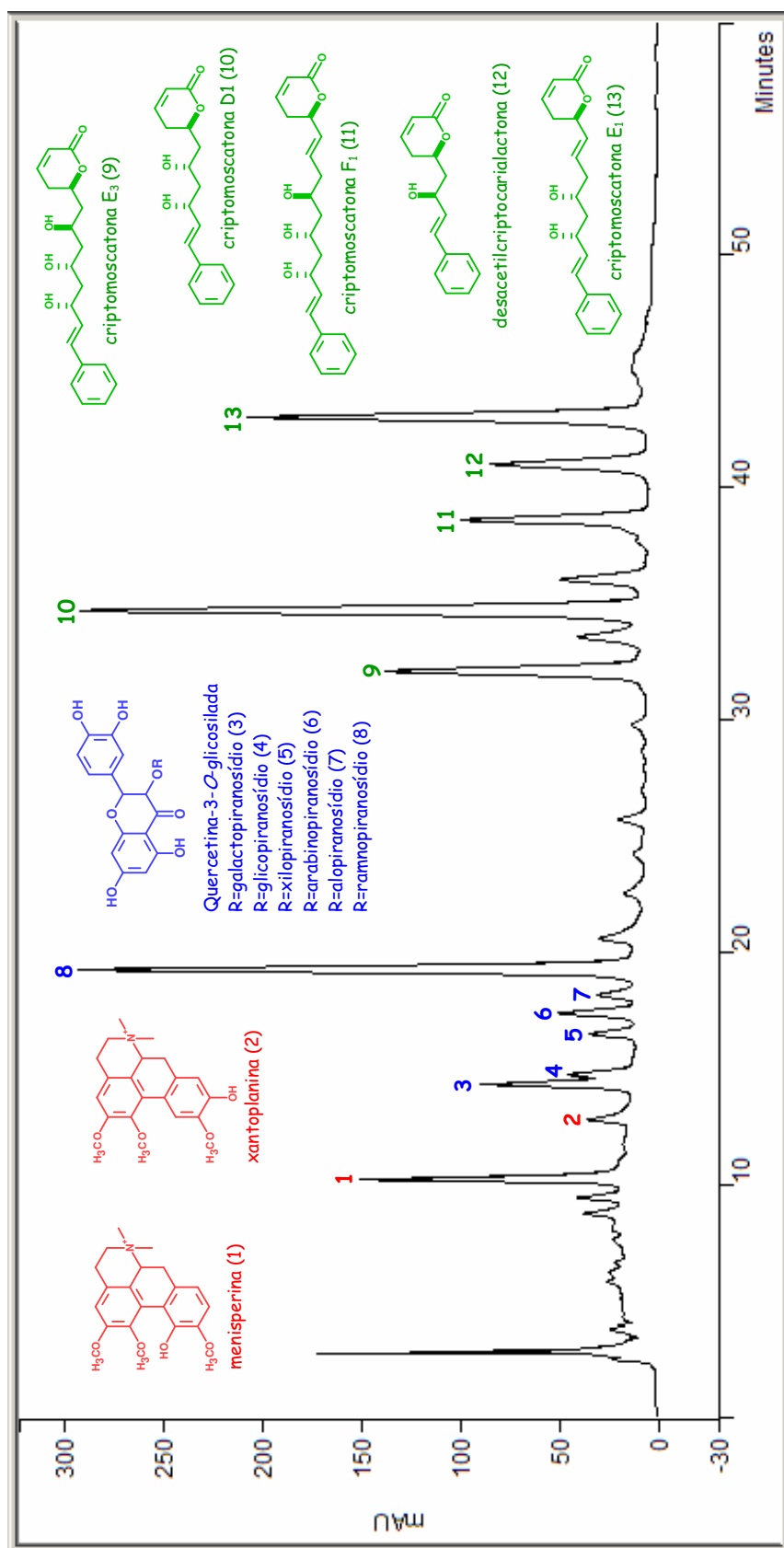


Figura 38: Cromatograma do extrato das folhas de *C. mandiocana* obtido na condição estabelecida no desenvolvimento cromatográfico: etapa II. Pico 1, *menisperina*; 2, *xantoplanina*; 3, quercetina-3-O-galactopiranosídeo; 4, quercetina-3-O-glicopiranosídeo; 5, quercetina-3-O-xilopiranosídeo; 6, quercetina-3-O-arabinopiranosídeo; 7, quercetina-3-O-alopiranosídeo; 8, quercetina-3-O-ramnopiranosídeo; 9, *criptomoscatona E₃*; 10, *criptomoscatona D1*; 11, *criptomoscatona F₁*; 12, *desacetilcriptocarilactona*; 13, *criptomoscatona E₁*.

2.1– Isolamento e identificação de alcalóides aporfínicos quaternários

A partir do extrato hidroalcoólico das cascas do tronco de *C. mandioccana* foram isolados dois alcalóides aporfínicos quaternários, menisperina (1) e xantoplanina (2) (Figura 39, pág. 106).

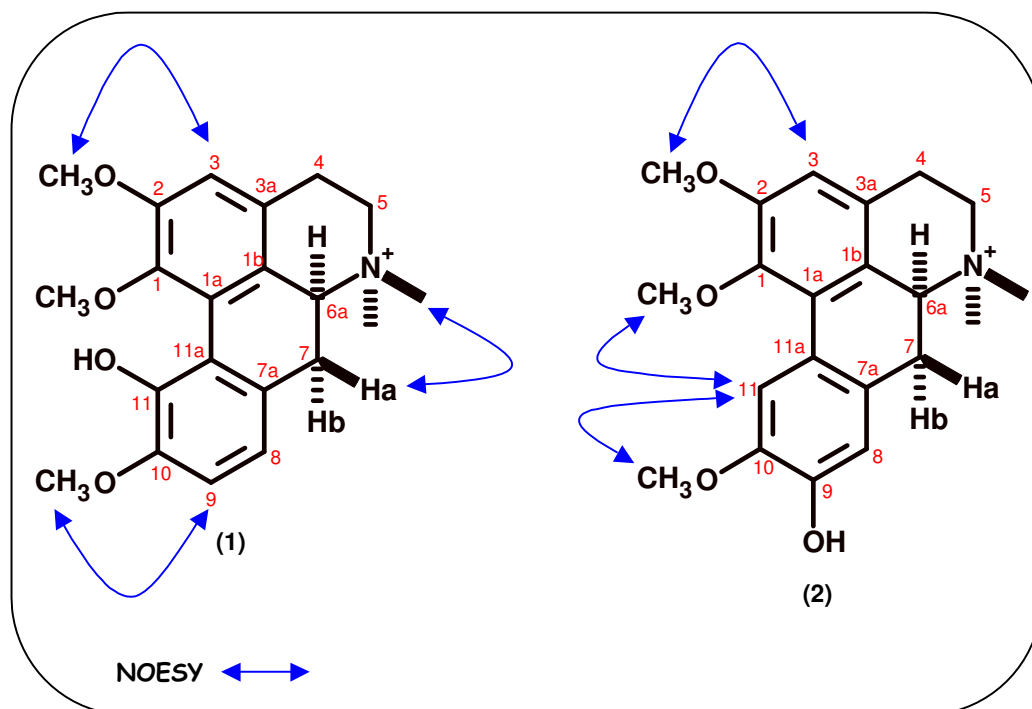


Figura 39: Alcalóides aporfínicos quaternários, menisperina (1) e xantoplanina (2), isolados das cascas do tronco de *C. mandioccana*.

2.1.1– Menisperina

Os espectros de UV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C sugeriram que a substância (1) era um alcalóide aporfínico quaternário (DWUMA-BADU, et al., 1980, MARSAIOLI, et al., 1979).

O espectro no UV mostrou três bandas de absorção em $\lambda=222, 271$ e 304 nm.

O espectro de RMN de ¹H em CD₃OD da substância (1) (Anexo 3, pág. 216 e Tabela 15, pág. 108) apresentou sinais em δ 7,04 (1H, s), δ 7,02 (1H, d, $J=8,0$ Hz) e δ 7,00 (1H, d, $J=8,0$ Hz) que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3, H-9 e H-8 do anel aromático. Os sinais em δ 3,97 (3H, s), δ 3,90 (3H, s) e δ 3,75 (3H, s) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios (2-OCH₃), (10-OCH₃) e (1-

OCH₃) dos grupos metoxílicos. A presença de sinais em δ 3,45 (3H, s) e δ 3,06 (3H, s) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios (*N*-CH_{3eq}) e (*N*-CH_{3ax}) dos grupos metílicos. O conjunto de sinais em δ 4,44 (1H, *dd*, $J=3,0$; 13,0 Hz), δ 3,36 (1H, *dd*, $J=3,0$; 13,0 Hz,) e δ 2,88 (1H, *t*, $J=13,0$ Hz,) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6a, H-7H_b e H-7H_a, cujas multiplicidades e constantes de acoplamento foram determinadas a partir do espectro de HOMODEC (Anexos de 4 a 7, pág. 217 a 220 e Tabela 15, pág. 108). O conjunto de sinais em δ 3,10 (1H, *m*), δ 3,40 (1H, *m*), δ 3,70 (1H, *m*) e δ 3,80 (1H, *m*) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-4H_a, H-4H_b, H-5H_a e H-5H_b através da análise dos espectros de HMQC (Anexos 8 e 9, pág. 221 e 222 e Tabela 15, pág. 108) e COSY (Anexo 10, pág. 223 e Tabela 15, pág. 108).

O espectro de RMN de ¹³C em CD₃OD da substância (**1**) (Anexos 11 a 13, pág. 224 a 226 e Tabela 15, pág. 108) apresentou sinais em δ 112,46, δ 113,35 e δ 120,68 que foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-3, C-9 e C-8 do anel aromático. Os sinais em δ 56,67, δ 56,82 e δ 62,49 foram atribuídos respectivamente aos carbonos (2-OCH₃), (10-OCH₃) e (1-OCH₃) dos grupos metoxílicos. A presença de sinais em δ 54,30 e δ 43,88 foram atribuídos respectivamente aos carbonos (*N*-CH_{3eq}) e (*N*-CH_{3ax}) dos grupos metílicos. O sinal em δ 145,31 foi atribuído ao carbono C-11 ligado a hidroxila e os sinais em δ 70,77 e δ 31,76 foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-6a e C-7.

Os espectros de NOE (Anexo 14 a 17, pág. 227 a 230 e Figura 39, pág. 106) possibilitaram a confirmação da estrutura da substância (**1**).

Esses dados comparados com os dados descritos na literatura (DWUMABADU, et al., 1980, MARSAIOLI, et al., 1979, NISHIYAMA, et al., 2004) e $[\alpha]_D^{20} = +199,3^\circ$ são indicativos de que a substância (**1**) é a (+)-menisperina, com configuração S no C-6a (Figura 39, pág. 106).

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância **(1)** em CD_3OD (11,7T)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidade	J (Hz)
1	145,55	-		
1a	127,21	-		
1b	122,34	-		
2	154,82	-		
3	112,46	7,04	s	-
3a	126,76	-		
4	24,92	3,10/3,40	m/m	
5	62,22	3,70/3,80	m/m	
6a	70,77	4,44	dd	3,0 e 13,0
7	31,76	2,88/3,36	t/dd	13,0/3,0 e 13,0
7a	127,06	-		
8	120,68	7,00	d	8,0
9	113,35	7,02	d	8,0
10	151,04	-		
11	145,31	-		
11a	120,08	-		
(N-CH₃_{eq})	54,30	3,45	s	-
(N-CH₃_{ax})	43,88	3,06	s	-
1-OCH₃	62,49	3,75	s	-
2-OCH₃	56,67	3,97	s	-
10-OCH₃	56,82	3,90	s	-

2.1.2– Xantoplanina

Os espectro de UV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C sugeriram que a substância **(2)** também era um alcalóide aporfínico quaternário (LEE, et al., 1993a, MARSAIOLI, et al., 1979).

O espectro no UV mostrou três bandas de absorção em $\lambda=220$, 283 e 304 nm.

O espectro de RMN de ^1H em CD_3OD da substância **(2)** (Anexos 18 e 19, pág. 231 e 232 e Tabela 16, pág. 109) difere da substância **(1)** por apresentar sinais em δ 6,89 (1H, s), δ 6,86 (1H, s) e δ 8,0 (1H, s) que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3, H-8 e H-11 do anel aromático. As multiplicidades e constantes de acoplamento dos hidrogênios H-6a, H-7H_b e H-7H_a foram determinadas a partir do espectro de HOMODEC (Anexo 20 a 23, pág. 233 a 236 e Tabela 16, pág. 109). O conjunto de sinais dos hidrogênios H-4H_a, H-4H_b, H-5H_a e H-5H_b foram determinados a partir dos espectros de HMQC (Anexo 24, pág. 237 e Tabela 16, pág. 109) e COSY (Anexo 25, pág. 238 e Tabela 16, pág. 109).

O espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (Anexos 26 a 28, pág. 239 a 241 e Tabela 16, pág. 109) da substância **(2)** difere da substância **(1)** por apresentar sinais em δ 148,14 e δ 113,34 que foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-9, ligado à hidroxila, e C-11 do anel aromático.

Os espectros de NOE (Anexo 29 a 32, pág. 242 a 245 e Figura 39, pág. 106) possibilitaram a confirmação da estrutura da substância **(2)**.

Esses dados comparados com os dados descritos na literatura (LEE, et al., 1993a, MARSAIOLI, et al., 1979, NISHIYAMA, et al., 2004) e $[\alpha]_D^{20} = +33,1^\circ$ são indicativos de que a substância **(2)** é a (+)-xantoplanina, com configuração *S* no C-6a (Figura 39, pág. 106).

Tabela 16: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância **(2)** em CD_3OD (11,7T)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidade	J (Hz)
1	146,96	-		
1a	129,06	-		
1b	120,62	-		
2	155,41	-		
3	111,69	6,89	<i>s</i>	-
3a	126,06	-		
4	24,97	3,10/3,40	<i>m/m</i>	
5	62,68	3,70/3,80	<i>m/m</i>	
6a	70,82	4,58	<i>dd</i>	3,75 e 13,5
7	30,01	2,96/3,25	<i>t/dd</i>	13,5/3,75 e 13,5
7a	127,03	-		
8	116,07	6,86	<i>s</i>	-
9	148,14	-		
10	148,53	-		
11	113,34	8,0	<i>s</i>	-
11a	123,58	-		
(N-CH₃_{eq})	54,22	3,44	<i>s</i>	-
(N-CH₃_{ax})	43,94	3,09	<i>s</i>	-
1-OCH₃	60,67	3,71	<i>s</i>	-
2-OCH₃	56,51	3,93	<i>s</i>	-
10-OCH₃	56,67	3,90	<i>s</i>	-

3 – Validação de método cromatográfico para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de *C. mandioccana*

A estratégia aplicada para a validação do método cromatográfico seguiu as normas propostas pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Um protocolo de validação foi estabelecido e critérios de aceitação foram definidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e estabilidade.

3.1 – Parâmetros validados

A proposta de validação do método cromatográfico desenvolvido em CLAE-DAD para análise simultânea de alcalóides, flavonóides e estirilpironas estabelecida neste trabalho envolveu parâmetros que compreenderam:

3.1.1 – Seletividade

Teste de pureza de pico com auxílio de detector de arranjo de diodos foi utilizado para demonstrar que os picos cromatográficos foram atribuídos a um só componente. A seletividade foi verificada pela análise em CLAE-DAD do extrato de folhas de *C. mandioccana* e dos padrões menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona. A pureza dos picos de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona no extrato foi confirmada através do Software do detector de arranjo de diodos (PolyView) pela análise do espectro no UV em três pontos distintos do pico de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona (Figura 40, pág. 111) e nenhum interferente foi observado.

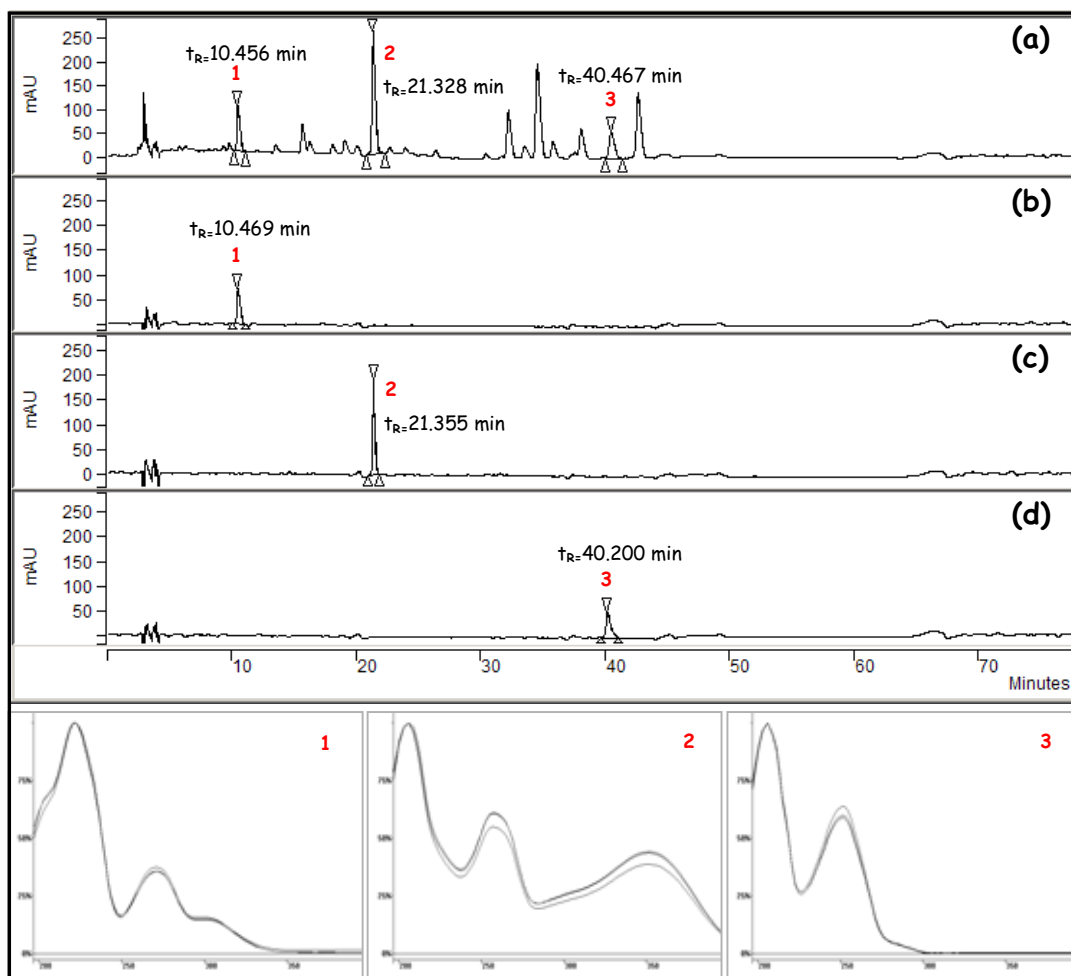
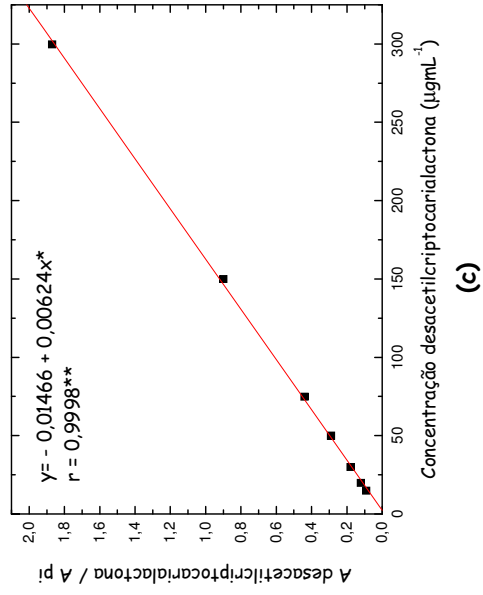
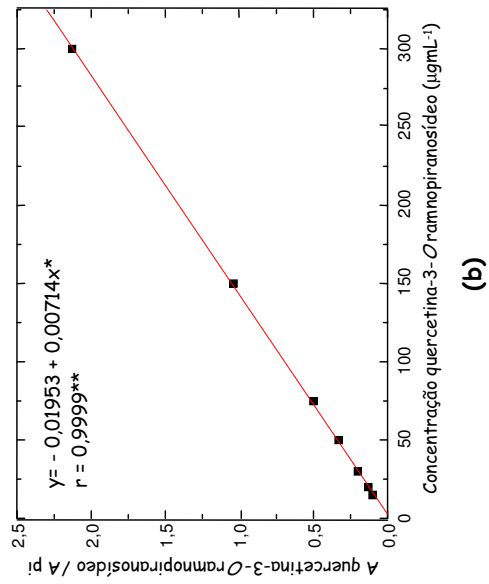
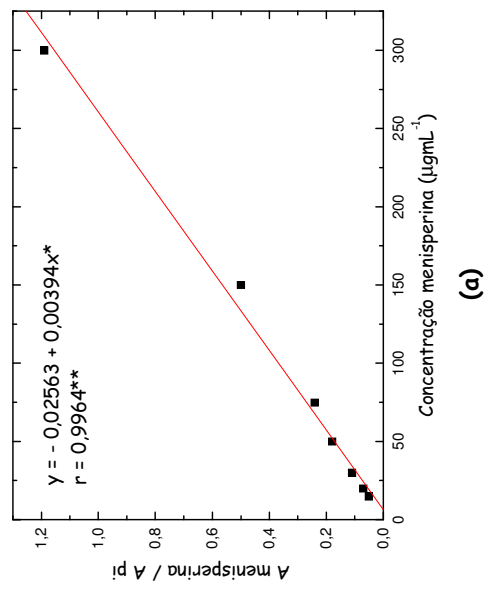


Figura 39: Espectro no UV em três pontos distintos dos picos de menisperina (1), quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo (2) e desacetilriptocarialactona (3) em: (a) – cromatograma do extrato; (b) – cromatograma da menisperina; (c) – cromatograma da quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo; (d) – cromatograma da desacetilriptocarialactona.

3.1.2 – Linearidade

A curva analítica com padronização interna, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goniotalamina, foi construída com 7 níveis de concentração na faixa de 15 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilriptocarialactona (Figura 41, pág. 113). A equação de regressão encontrada foi $y = -0,02563 + 0,00394x$ com coeficiente de correlação de $r = 0,9964$ e DPR < 3,0% para menisperina, $y = -0,01953 + 0,00714x$, com coeficiente de correlação de $r = 0,9999$ e DPR < 1,5% para quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e $y = -0,01466 + 0,00624x$, com coeficiente de correlação de $r = 0,9998$ e DPR < 1,3% para desacetilriptocarialactona.

A linearidade da curva analítica com padronização interna foi avaliada através dos coeficientes de correlação da curva na faixa de concentração de 15 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona. A relação entre área do pico do analito/área do pico do padrão interno e concentração do analito foi linear no intervalo considerado para todos os metabólitos. Os coeficientes de correlação lineares estiveram dentro do critério de aceitação ($r=0,99$).



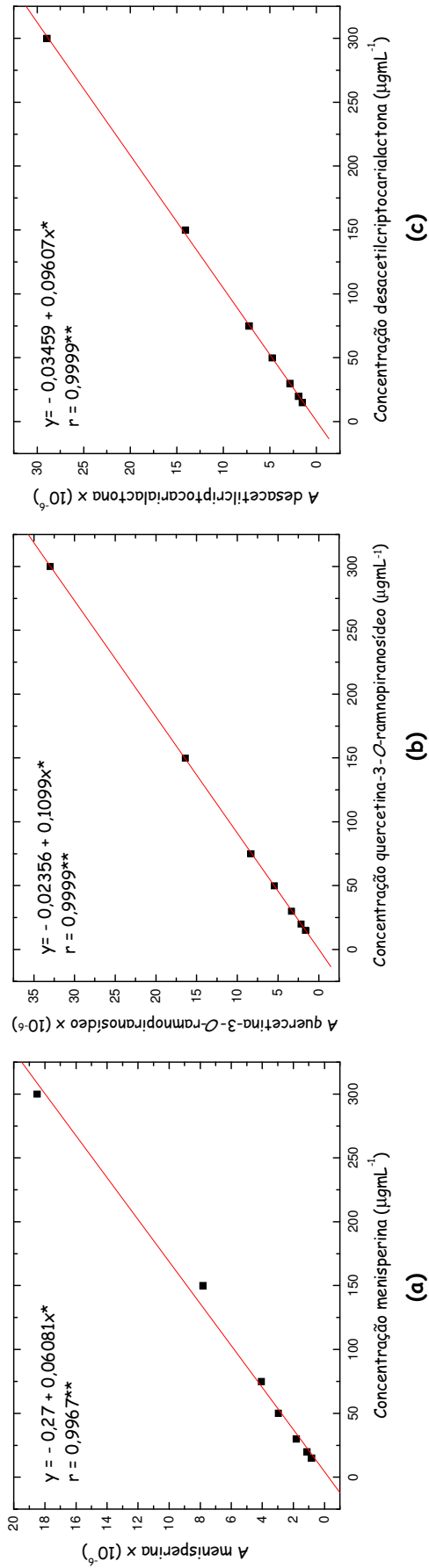
* equação de regressão
 ** coeficiente de correlação

Figura 41: Curva analítica com padronização interna, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goniotalamina, na faixa de 15 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para: (a) – menisperina; (b) – quercetina-3-O-ramnopiranosídeo; (c) – desacetilicriptocarialactona.

A curva analítica com padronização externa, foi construída com 7 níveis de concentração na faixa de 15 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona (Figura 42, pág. 115).

A equação de regressão encontrada foi $y = -0,27 + 0,06081x$ com coeficiente de correlação de $r = 0,9967$ e DPR < 4,0% para menisperina, $y = -0,02356 + 0,1099x$, com coeficiente de correlação de $r = 0,9999$ e DPR < 3,6% para quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e $y = -0,03459 + 0,09607x$, com coeficiente de correlação de $r = 0,9999$ e DPR < 4,4% para desacetilcriptocarialactona.

A linearidade da curva analítica com padronização externa foi avaliada através dos coeficientes de correlação da curva na faixa de concentração de 15 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona. A relação entre área do pico do analito e concentração do analito foi linear no intervalo considerado para todos os metabólitos. Os coeficientes de correlação linear estiveram dentro do critério de aceitação ($r=0,99$).



* equação de regressão
 ** coeficiente de correlação

Figura 42: Curva analítica com padronização externa na faixa de 15 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para: **(a)** – menisperina; **(b)** – quercetina-3-O-ramnopiranosídeo; **(c)** – desacetilriptocarilactona.

3.1.3 – Precisão

A precisão, considerando a padronização interna, foi estimada pela medida da repetibilidade e da precisão intermediária em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para cada analito. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona e desvio padrão (DP) do tempo de retenção relativo médio (razão entre tempo de retenção do analito e tempo de retenção do padrão interno) em cada nível.

Na avaliação da repetibilidade amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Os resultados estão apresentados na Tabela 17, pág. 117. A partir da Tabela 17, pág. 117, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excederam 0,48, 1,58 e 1,16% respectivamente, considerando os três níveis de concentração. O desvio padrão (DP) do tempo de retenção relativo médio (razão entre tempo de retenção do analito e tempo de retenção do padrão interno) não foi maior que 0,006, 0,005 e 0,003 respectivamente para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração.

Na avaliação da precisão intermediária, amostras foram analisadas em triplicata em três dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na Tabela 17, pág. 117. A partir da Tabela 17, pág. 117, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excederam 3,83, 2,90 e 4,53% respectivamente, considerando os três níveis de concentração. O desvio padrão (DP) do tempo de retenção relativo médio (razão entre tempo de retenção do analito e tempo de retenção do padrão interno) não foi maior que 0,005, 0,005 e 0,002 respectivamente para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração. A precisão esteve dentro do critério de aceitação ($\text{DPR} \leq 5\%$).

Tabela 17: Repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração para menisperina^a, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo^b e desacetilcriptocarialactona^c com padronização interna

Repetibilidade						
	n=3		n=3		n=3	
	(300 µg mL ⁻¹)		(50 µg mL ⁻¹)		(15 µg mL ⁻¹)	
	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****
alcalóide ^a	0,28	0,24 ± 0,005	0,46	0,24 ± 0,001	0,48	0,24 ± 0,006
flavonóide ^b	0,89	0,47 ± 0,005	1,58	0,47 ± 0,001	0,29	0,48 ± 0,005
estirilpirona ^c	0,55	0,88 ± 0,002	0,39	0,88 ± 0,001	1,16	0,88 ± 0,003
Precisão Intermediária						
	n=9		n=9		n=9	
	(300 µg mL ⁻¹)		(50 µg mL ⁻¹)		(15 µg mL ⁻¹)	
	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R relativo*** ± DP****
alcalóide ^a	1,74	0,23 ± 0,005	3,45	0,23 ± 0,004	3,83	0,23 ± 0,005
flavonóide ^b	0,74	0,47 ± 0,003	2,33	0,47 ± 0,004	2,90	0,47 ± 0,005
estirilpirona ^c	2,61	0,88 ± 0,002	2,57	0,87 ± 0,001	4,53	0,88 ± 0,002

*Conc=concentração

**DPR = desvio padrão relativo (%)

***t_R relativo= t_R analito/ t_R padrão interno

****DP = desvio padrão, n=3 e 9

A precisão, considerando a padronização externa, foi estimada pela medida da repetibilidade e da precisão intermediária em três níveis de concentração (15, 50 e 300 µg mL⁻¹) para cada analito. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona e desvio padrão (DP) do tempo de retenção médio dos analitos em cada nível.

Na avaliação da repetibilidade amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Os resultados estão apresentados na Tabela 18, pág. 118. A partir da Tabela 18, pág. 118, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excederam 2,43, 3,45 e 4,22% respectivamente, considerando os três níveis de concentração. O desvio padrão (DP) do tempo de retenção médio dos analitos não foi maior que 0,39, 0,43 e 0,50 respectivamente para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração. A repetibilidade esteve dentro do critério de aceitação (DPR≤5%).

Na avaliação da precisão intermediária, amostras foram analisadas em triplicata em três dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na Tabela 18, pág. 118. A partir da Tabela 18, pág. 118, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina e desacetilcriptocarialactona excedeu 5,0%, considerando os três níveis de concentração. O desvio padrão (DP) do tempo de retenção médio dos analitos não foi maior que 0,36, 0,39 e 0,49 respectivamente para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração.

Tabela 18: Repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração para menisperina^a, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo^b e desacetilcriptocarialactona^c com padronização externa

Repetibilidade						
	n=3		n=3		n=3	
	(300 µg mL ⁻¹)		(50 µg mL ⁻¹)		(15 µg mL ⁻¹)	
	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****
alcalóide ^a	1,11	11,21 ± 0,34	1,42	10,99 ± 0,02	2,43	11,06 ± 0,39
flavonóide ^b	1,72	22,14 ± 0,43	2,18	22,06 ± 0,06	3,45	22,21 ± 0,43
estirilpirona ^c	0,79	41,31 ± 0,48	0,96	40,83 ± 0,13	4,22	40,86 ± 0,50
Precisão Intermediária						
	n=9		n=9		n=9	
	(300 µg mL ⁻¹)		(50 µg mL ⁻¹)		(15 µg mL ⁻¹)	
	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****	Conc* (DPR)**	t _R analito*** ± DP****
alcalóide ^a	5,37	10,80 ± 0,36	4,02	10,73 ± 0,22	4,84	10,82 ± 0,33
flavonóide ^b	3,91	21,86 ± 0,33	2,34	21,82 ± 0,24	3,85	21,84 ± 0,39
estirilpirona ^c	2,12	40,76 ± 0,49	3,45	40,57 ± 0,22	7,27	40,50 ± 0,39

*Conc=concentração

**DPR = desvio padrão relativo (%)

***t_R analito= tempo de retenção do analito

****DP = desvio padrão, n=3 e 9

Considerando a avaliação da precisão intermediária para a padronização externa em três dias consecutivos, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina e desacetilcriptocarialactona excede 5,0%, considerando os três níveis de concentração (Tabela 18, pág. 118 e Figura 43b, pág. 119) não estando dentro do critério de aceitação (DPR≤5%). No entanto, considerando dois dias consecutivos de análise, o desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excedem 5,0% considerando os três níveis de concentração estando dentro do critério de aceitação (DPR≤5%) (Figura 43, pág. 119).

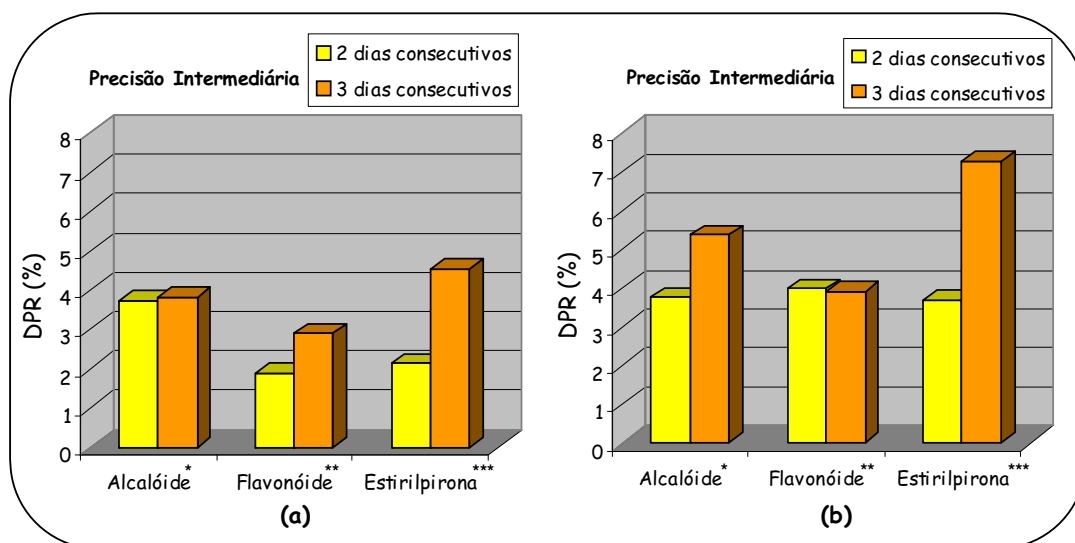


Figura 43: Desvio padrão relativo (DPR) da concentração de *menisperina, **quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração em dois e três dias consecutivos de análise na avaliação da precisão intermediária: (a) – padronização interna; (b) – padronização externa.

3.1.4 – Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi estimado pelo método visual e o resultado foi $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada metabólito.

3.1.5 – Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estimado pelo método visual e o resultado foi $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada metabólito.

3.1.6 – Exatidão

A exatidão, considerando a padronização interna, foi avaliada utilizando o método de adição padrão. Extratos de *C. mandioccana* não fortificados e fortificados com menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona em três níveis de concentração (15 , 50 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram analisados em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média de cada analito determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em cada nível. Os resultados estão apresentados na Tabela 19, pág. 120. A partir da

Tabela 19, pág. 120, a exatidão para a determinação de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona esteve no intervalo de 80-120% considerando os três níveis de concentração, exceto para quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo em 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 19: Exatidão em três níveis de concentração para menisperina^a, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo^b e desacetilcriptocarialactona^c com padronização interna

Exatidão (%)			
	n=3	n=3	n=3
	(300 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(50 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(15 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
alcalóide ^a	115,4	106,5	113,3
flavonóide ^b	111,6	107,2	124,2
estirilpirona ^c	81,5	96,5	93,8

A exatidão, considerando a padronização externa, foi avaliada utilizando o método de adição padrão. Extratos de *C. mandioccana* não fortificados e fortificados com menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram analisados em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média de cada analito determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em cada nível. Os resultados estão apresentados na Tabela 20, pág. 121. A partir da Tabela 20, pág. 120, a exatidão para a determinação de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona estiveram no intervalo de 80-120% considerando os três níveis de concentração.

Tabela 20: Exatidão em três níveis de concentração para menisperina^a, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo^b e desacetilcriptocarialactona^c com padronização externa

Exatidão (%)			
	n=3	n=3	n=3
	(300 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(50 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(15 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
alcalóide ^a	109,7	88,6	92,5
flavonóide ^b	104,3	86,7	113,0
estirilpirona ^c	83,2	84,5	105,9

3.1.7 – Estabilidade

A estabilidade da amostra, considerando a padronização interna, foi verificada em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias (Figura 44, pág. 122). As amostras permaneceram estáveis em 72h ($\text{DPR} \leq 5\%$) com desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excedendo 3,83, 2,90 e 4,53% respectivamente considerando os três níveis de concentração.

A estabilidade da amostra, considerando a padronização externa, foi verificada em três níveis de concentração (15, 50 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias (Figura 45, pág. 123). As amostras permaneceram estáveis em 48h ($\text{DPR} \leq 5\%$) com desvio padrão relativo (DPR) da concentração de menisperina, quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e desacetilcriptocarialactona não excedendo 3,75, 3,98 e 4,22% respectivamente considerando os três níveis de concentração.

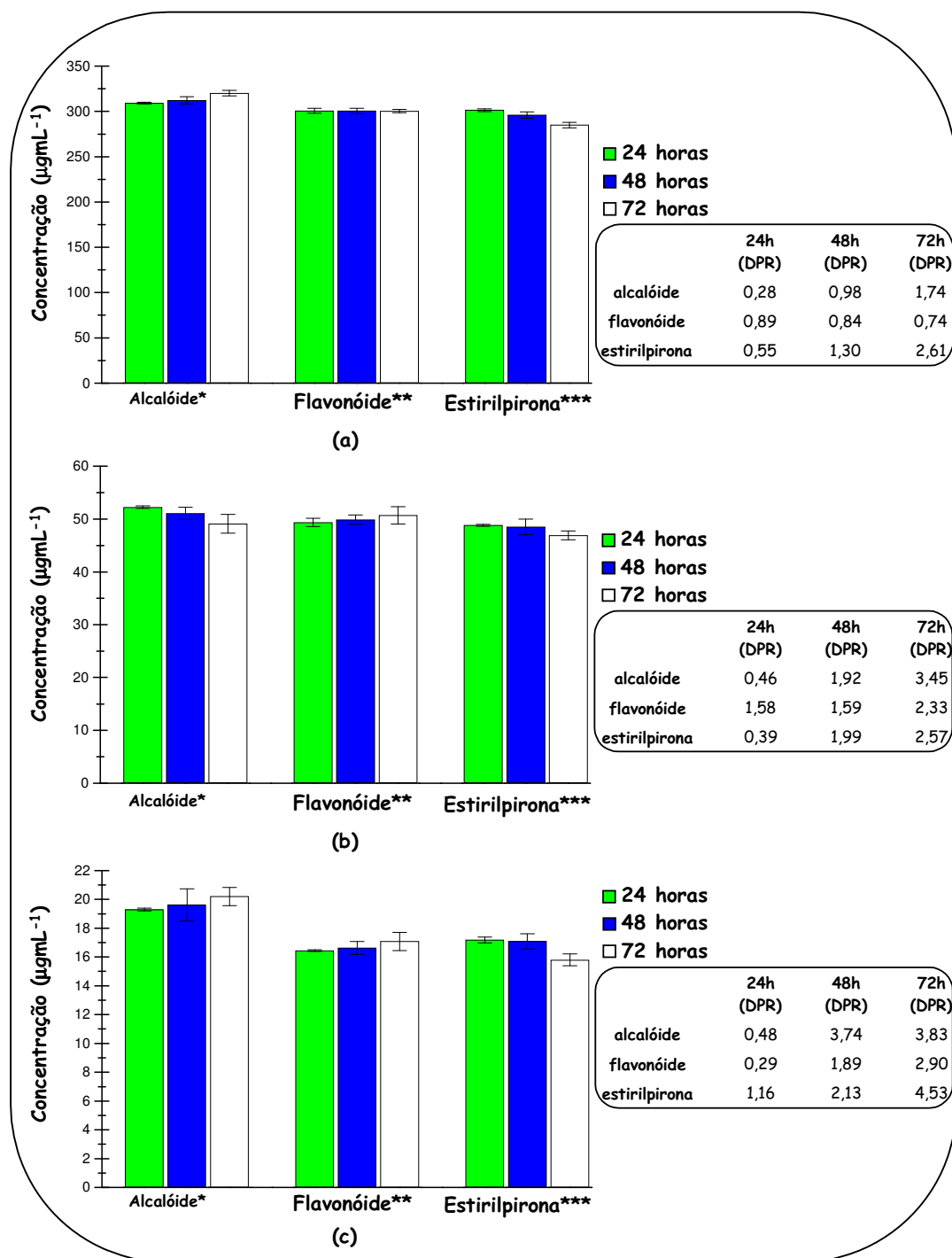


Figura 44: Estabilidade para *menisperina, **quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e ***desacetilriptocarialactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias, para a padronização interna, em três níveis de concentração: (a) – 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (c) – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

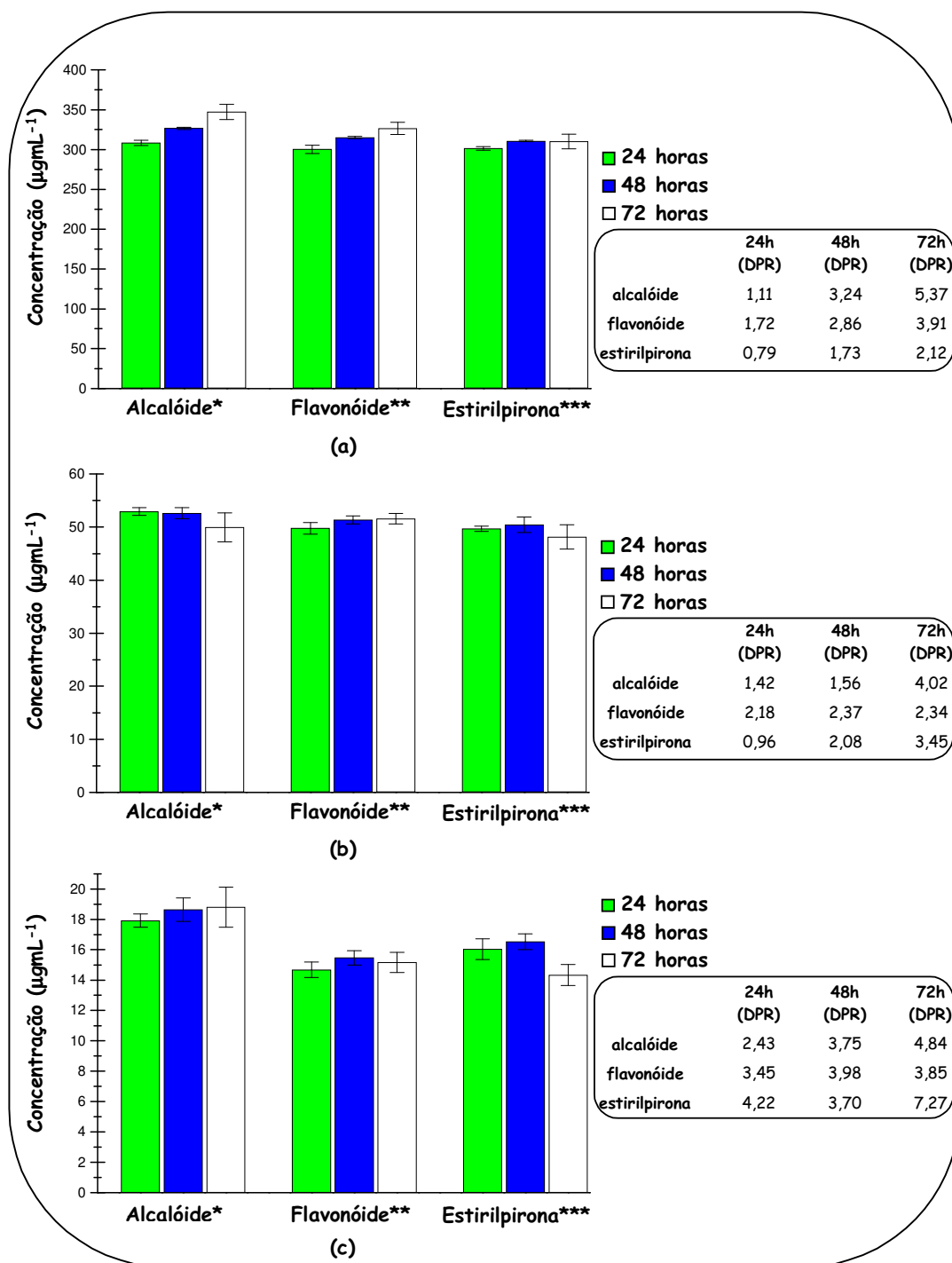


Figura 45: Estabilidade para *menisperina, **quercetina-3-O-ramnopiranosídeo e ***desacetilriptocarinalactona em intervalos regulares de 24 horas durante três dias, para a padronização externa, em três níveis de concentração: (a) – 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (c) – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A determinação cromatográfica quantitativa utilizando padronização externa é simples e mais rápida, considerando a preparação da amostra, porém mais sensível a erros de injeção (DPR maiores) (Figura 46, pág. 124). A utilização de padronização interna é extremamente útil, especialmente porque corrige esses erros (DPR menores) (Figura 46, pág. 124), mas tem como inconveniente o fato de ser demorada, considerando a preparação da amostra, e implica na disponibilidade de padrão interno. Nos dois métodos propostos nesse trabalho, os parâmetros validados estiveram dentro dos critérios de aceitação. A escolha do método a ser utilizado estará em função da quantidade de amostras a serem analisadas e da disponibilidade de padrão interno.

Um método cromatográfico para análise simultânea dos principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandiocana* (alcalóides, flavonóides e estilipironas) foi desenvolvido e validado (Capítulo I) para ser utilizado nos estudos de variabilidade intraespecífica (Capítulo II) e nos estudos de biossíntese (Capítulo III). Considerando a grande quantidade de amostras a serem analisadas e a não disponibilidade de grande quantidade de padrão interno, a determinação cromatográfica quantitativa com padronização externa foi escolhida já que os parâmetros validados estiveram dentro dos critérios de aceitação.

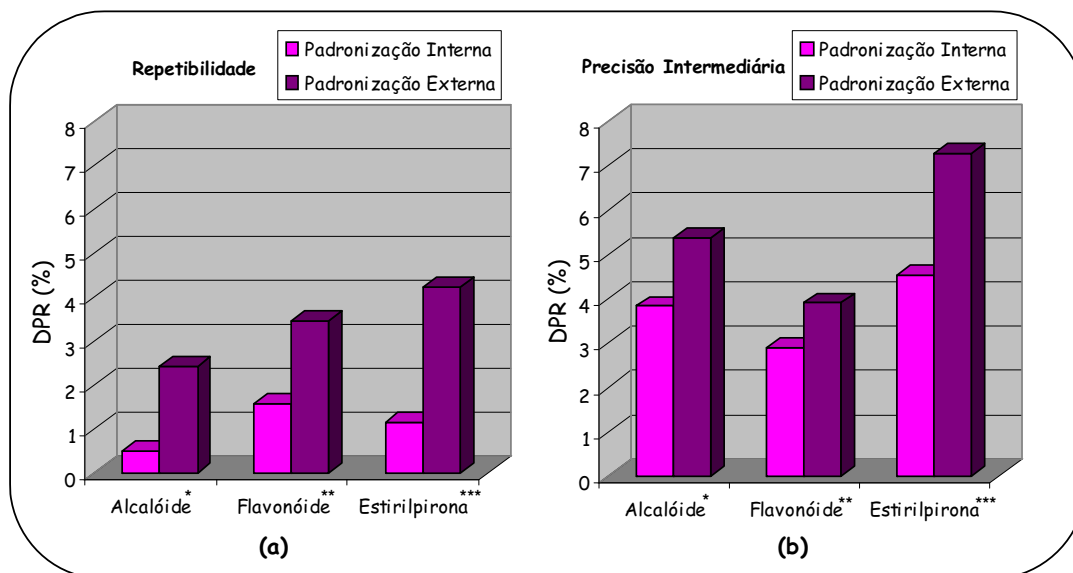


Figura 46: Desvio padrão relativo (DPR) da concentração de *menisperina, **quercetina-3-O-ramnopiranosídeo e ***desacetilcriptocarialactona considerando os três níveis de concentração na padronização interna e externa para: (a) – repetibilidade; (b) – precisão intermediária.

Capítulo II
Variabilidade Intraespecífica
de Metabólitos em C. mandioccana

PARTE EXPERIMENTAL

1 – Materiais e Equipamentos

1.1 – Materiais

- Material vegetal:

Brotos, folhas novas, folhas velhas, galhos, cascas de troncos e raízes dos indivíduos do quimiotipo F (CB 231, 283, 301, 314, 354) e dos indivíduos do quimiotipo FS (CB 230, 300, 302, 316, 353) e folhas de plântulas de *Cryptocarya mandioccana* do quimiotipo FS

- Solventes:

Hexano e MeOH (Synth, grau analítico)
ACN e MeOH (J.T.Backer, grau HPLC)
H₂O (ultrapura preparada em sistema Mili-Q)

- Reagentes:

Ácido Acético e Ácido Fosfórico (Synth)
Trietilamina (Vetec)

- Softwares:

Star Chromatography Workstation 5.52
ChemSketch 4.0
Microcal Origin 5.0
Microsoft Office Excel

1.2 – Equipamentos

- Geo-referenciamento por Satélite:

GPS III Personal Navigator, Garmin

- Balança:

Análítica – Mettler Toledo, modelo AG245

- Ultra-som:
Elma, modelo Transsonic 570, frequência 35 KHz
- Centrífuga:
Celm, modelo Combate, rotação 2800 rpm (1200 g)
- CLAE-DAD:
Módulos: 1-Bomba: ProStar 240 Solvent Delivery Module; 2-Detector: ProStar 330 Photodiode Array Detector; 3-Injetor Automático: ProStar 410 Auto-Sampler; 4-Integrador: Microcomputador (processador Pentium III, 500 MHz), com “software” “Star Chromatography Workstation”
- Colunas Cromatográficas:
Coluna Phenomenex Luna[®] C8, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm

2 – Metodologia

2.1 – Variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos

A proposta de avaliar a variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos envolveu etapas que compreenderam:

2.1.1 – Amostragem dos indivíduos estudados, coleta e preparação do material vegetal

Com o conhecimento prévio dos quimiotipos existentes na população de *C. mandioccana* localizada no Parque Estadual Carlos Botelho em São Miguel Arcanjo - SP (NEHME, 2001, NEHME; MORAES; CAVALHEIRO, 2002), dez indivíduos de *C. mandioccana* foram amostrados, distribuídos em uma área de cerca de 15 km², sendo cinco do quimiotipo F e cinco do quimiotipo FS. Brotos, folhas novas, folhas velhas, galhos, cascas de troncos e raízes foram coletados (Figura 47, pág. 128). *C. mandioccana* é uma espécie arbórea com aproximadamente 25 a 30 m de altura. Portanto, para coletar suas folhas foi necessário escalar as árvores, o que foi

realizado por um coletor usando equipamentos de segurança e tesoura de alta poda, acompanhado pela equipe envolvida nesse estudo. Todo o material vegetal coletado foi seco em estufa a 40°C, com circulação de ar, por 24 horas, moído e estocado a 25°C.

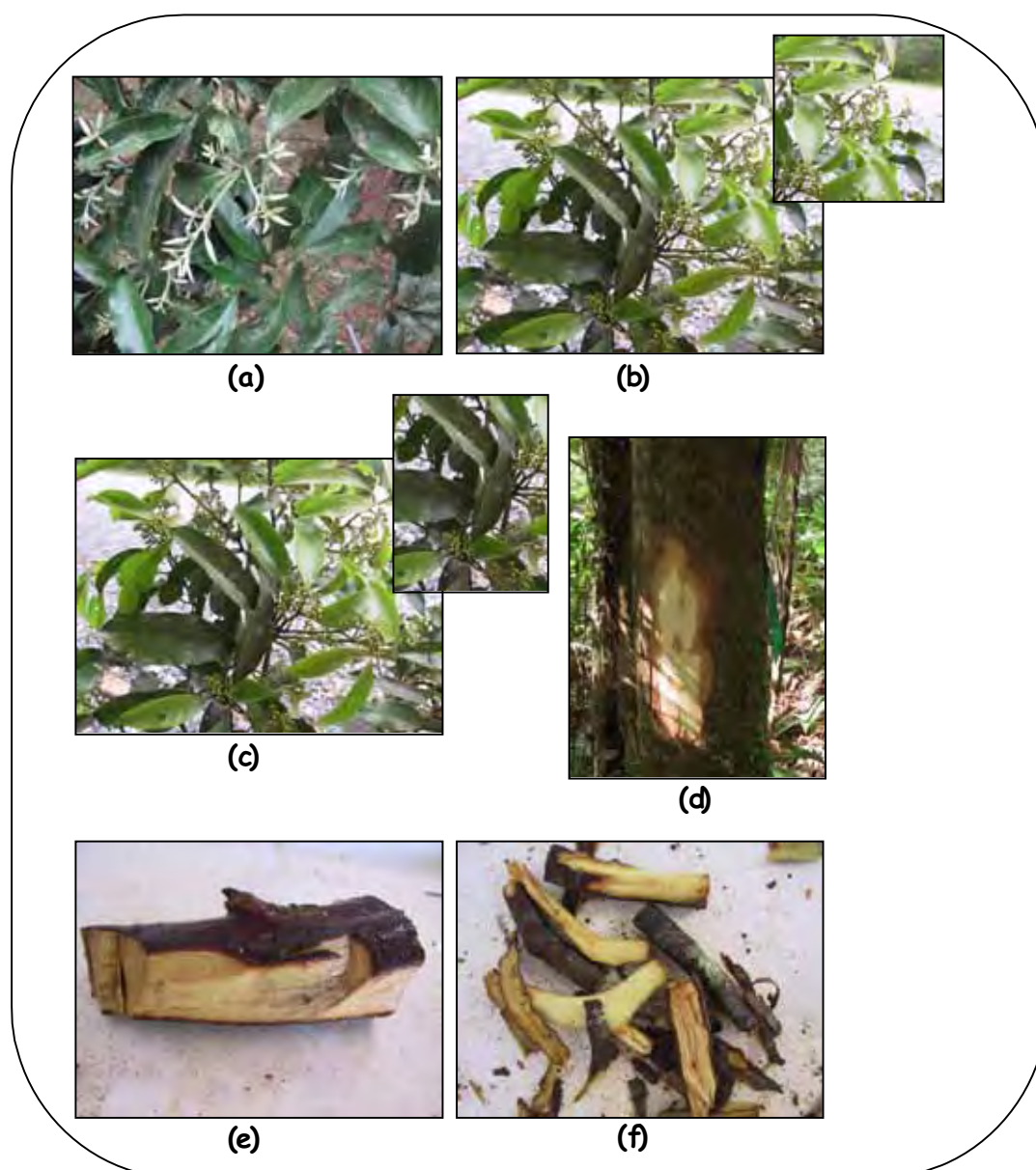


Figura 47: Fotos dos órgãos coletados de *C. mandioccana*: (a) – broto; (b) – folha nova; (c) – folha velha; (d) – casca do tronco; (e) – raiz; (f) – galho.

Os indivíduos amostrados, seus quimiotipos, suas posições e a data da coleta estão descritos na Tabela 21, pág. 129.

Tabela 21: Indivíduos amostrados, seus quimiotipos, suas posições e a data da coleta

Indivíduo	Quimiotipo	Latitude (sul)	Longitude (oeste)	data
Cm230	FS3	24° 03' 42,0"	47° 59' 25,3"	12/11/05
Cm231	F	24° 03' 39,9"	47° 59' 26,5"	12/11/05
Cm283	F	24° 03' 37,2"	47° 57' 18,3"	12/11/05
Cm 300	FS2	24° 03' 49,8"	47° 57' 56,7"	12/11/05
Cm301	F	24° 03' 57,7"	47° 57' 46,7"	12/11/05
Cm302	FS2	24° 03' 46,7"	47° 58' 2,50"	12/11/05
Cm314	F	24° 03' 54,7"	47° 59' 40,0"	12/11/05
Cm316	FS2	24° 03' 58,0"	47° 59' 42,6"	12/11/05
Cm353	FS3	24° 03' 27,0"	47° 59' 32,3"	13/11/05
Cm354	F	24° 03' 27,0"	47° 59' 36,0"	13/11/05

2.1.2 – Extração

Foi realizado um protocolo de extração e pré-tratamento da amostra estabelecido por Nehme et al. (2005) com pequenas modificações.

1. Pesagem com exatidão de 100 mg dos órgãos secos e moídos de *C. mandioccana* em um tubo de vidro (10,0 mL) para centrífuga, com tampa.
2. Adição de 4,0 mL de hexano.
3. Extração em ultra-som por 30 min.
4. Adição de 4,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).
5. Extração em ultra-som por 30 min.
6. Centrifugação por 10 min a 1200 g.
7. Retirada de uma alíquota (1,5 mL) da fase hidroalcoólica.
8. Filtração da amostra em membrana Millipore® (0,45 µm) e acondicionamento em frasco para injeção automática (CLAE).

2.1.3 – Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo estão

descritas na Tabela 22, pág. 130 e foram pré-estabelecidas como descrito no Capítulo I.

Tabela 22: Condições cromatográficas para análise dos metabólitos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos

Parâmetro	Condição			
Fase Estacionária	C8			
Fase Móvel: A (Tampão pH≈2)* B (MeOH) C (ACN)	Tempo	% Tampão*	% MeOH	% ACN
	0	83	06	11
	10	77	08	15
	20	67	19	14
	30	61	22	17
	40	59	14	27
	45	50	50	0
	60	50	50	0
Tempo de Equilíbrio (min)	15			
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0			
λ (nm)	254			
Volume de injeção (μL)	20			

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

2.1.4 – Quantificação de alcalóides, flavonóides e estilpironas em órgãos de *C. mandioccana*

Considerando a grande quantidade de amostras para o estudo da variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos, foi escolhida a determinação cromatográfica quantitativa com padronização externa conforme descrito no Capítulo I.

Alcalóides foram quantificados em função da equação de regressão da curva analítica da menisperina ($y = - 0,27 + 0,06081x$), flavonóides foram quantificados em função da equação de regressão da curva analítica da quercetina-3-O-ramnopiranosídeo ($y = - 0,02356 + 0,1099x$) e estilpironas foram quantificadas em função da equação de regressão da curva analítica da desacetilcriptocarialactona ($y = - 0,03459 + 0,09607x$).

2.2 – Verificação da presença de estilpironas em plântulas

Experimentos foram realizados para avaliar a presença de estilpironas em folhas de plântulas de *C. mandioccana* para que os estudos de biossíntese fossem conduzidos. A verificação de estilpironas em folhas de plântulas de *C. mandioccana* envolveu etapas que compreenderam:

2.2.1 – Coleta e preparação do material vegetal

Foram coletadas folhas de 4 plântulas novas e de 2 plântulas velhas de *C. mandioccana* cultivadas na casa de vegetação do IQ-UNESP-Araraquara. Essas folhas foram trituradas em N₂ líquido.

2.2.2 – Extração

O procedimento de extração foi realizado conforme o item 2.1.2 (pág. 129).

2.2.3 – Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas para CLAE-DAD utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 23, pág. 131.

Tabela 23: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise de plântulas de *C. mandioccana*

Parâmetro	Condição
Fase Estacionária	C8
Fase Móvel: A (tampão pH=2) * B (ACN)	Gradiente Linear: 15-40% de B em 45min 40% de B em 15min 40-15% de B em 3min
Tempo de Equilíbrio (min)	15
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0
λ (nm)	254
Volume de injeção (μL)	20

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

RESULTADOS

1 – Variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos

A proposta de avaliar a variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos envolveu etapas que compreenderam:

1.1 – Variabilidade ontogenética dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana*

A variabilidade ontogenética dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* foi avaliada para verificar a composição e o teor de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de diferentes idades e avaliar se há paralelo com o perfil de estirilpironas observadas em folhas.

Brotos, folhas novas e folhas velhas de dez indivíduos de *C. mandioccana*, sendo cinco do quimiotipo F (CB 231, 283, 301, 314 e 354) e cinco do quimiotipo FS (CB 230, 300, 302, 316 e 353), foram analisados.

A composição quali e quantitativa dos metabólitos em *C. mandioccana* foi diferente quando considerado o estágio de desenvolvimento das folhas e os indivíduos do quimiotipo F ou FS.

Nos indivíduos do quimiotipo F (CB 231, 283, 301, 314 e 354), característicos pela predominância de flavonóides glicosilados em suas folhas, e nos indivíduos do quimiotipo FS (CB 230, 300, 302, 316 e 353), característicos pela presença de pelo menos um pico intenso atribuído a estirilpironas, foi observado o acúmulo de flavonóides no decorrer do desenvolvimento das folhas, desde os brotos até as folhas velhas, com maior concentração desse metabólito nas folhas velhas (Figura 48, pág. 134).

Nos brotos, em maior concentração, e nas folhas novas dos indivíduos dos dois quimiotipos foi encontrado um grupo de substâncias G1 (Figura 48, pág. 134), ainda não identificado, que apresenta polaridade e perfil no UV semelhantes ao do ácido caféico (Figura 49, pág. 135).

Alcalóides estão significativamente presentes nas folhas velhas dos dois quimiotipos (Figura 48, pág. 134).

Em nenhum estágio do desenvolvimento das folhas dos indivíduos do quimiotipo F foi observada a presença de estirilpironas (Figura 48a, pág. 134). Esses metabólitos foram observados no decorrer do desenvolvimento das folhas somente dos indivíduos do quimiotipo FS, com maior concentração desse metabólito nas folhas novas (Figura 48b, pág. 134).

Nos brotos e principalmente nas folhas novas apenas dos indivíduos do quimiotipo F, com ausência de estirilpironas, foi observado o acúmulo significativo de um grupo de substâncias G2 (Figura 48a, pág. 134). Esse grupo de substâncias G2 ainda não identificado apresenta uma absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}}=285$ nm (Figura 50, pág. 135).

Estirilpironas foram encontradas apenas nos indivíduos do quimiotipo FS. Esse quimiotipo é subdividido nos quimiotipos FS2 (característico pela presença de três picos intensos de estirilpironas atribuídos à criptomoscatoana E3, criptomoscatoana F1 e criptomoscatoana E1) e FS3 (característico pela presença de um pico intenso de estirilpirona atribuído à criptomoscatoana D1). Através da Figura 51, pág. 136 podemos observar que o perfil de estirilpironas no quimiotipo FS, considerando os quimiotipos FS2 e FS3, não sofreu alteração no decorrer do desenvolvimento das folhas, no entanto o acúmulo de estirilpironas foi mais significativo em folhas novas.

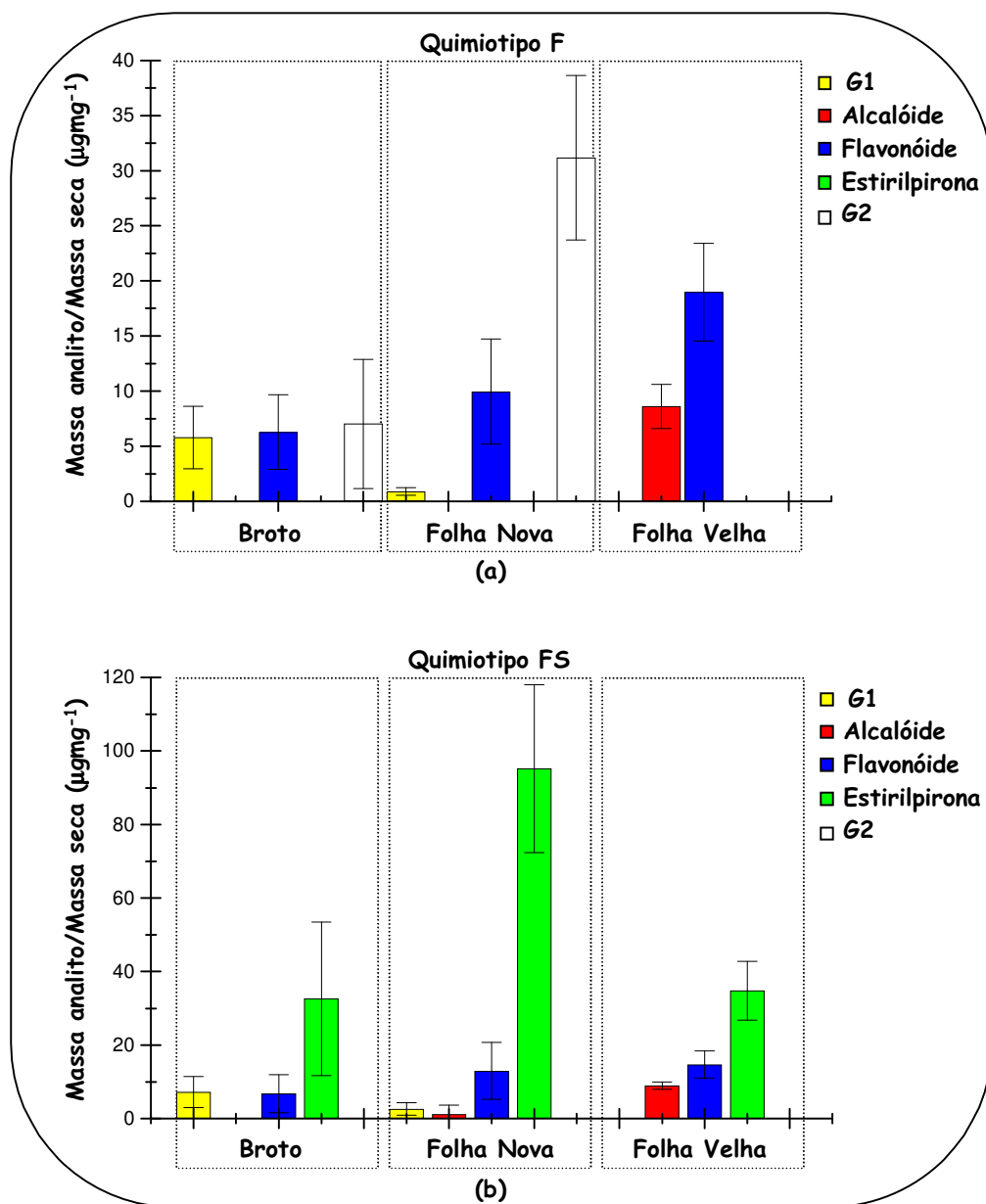


Figura 48: Variabilidade ontogenética dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana*: (a) – quimiotipo F; (b) – quimiotipo FS.

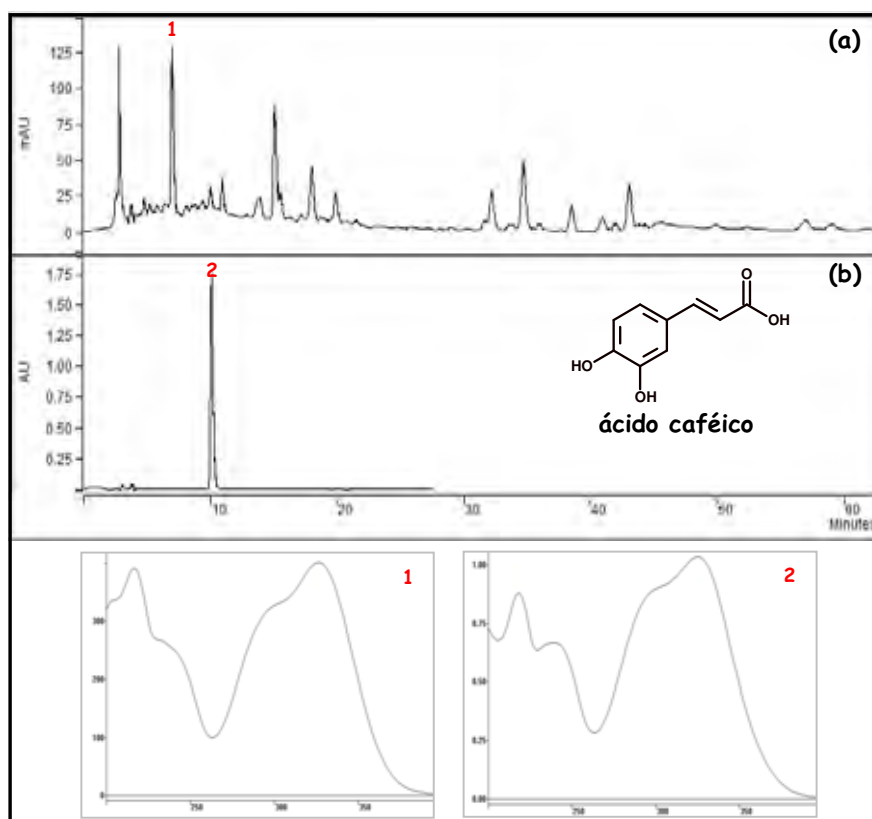


Figura 49: Espectro no UV dos picos da substância do grupo G1 (1) e do ácido caféico (2) em: **(a)** – cromatograma do broto; **(b)** – cromatograma do ácido caféico.

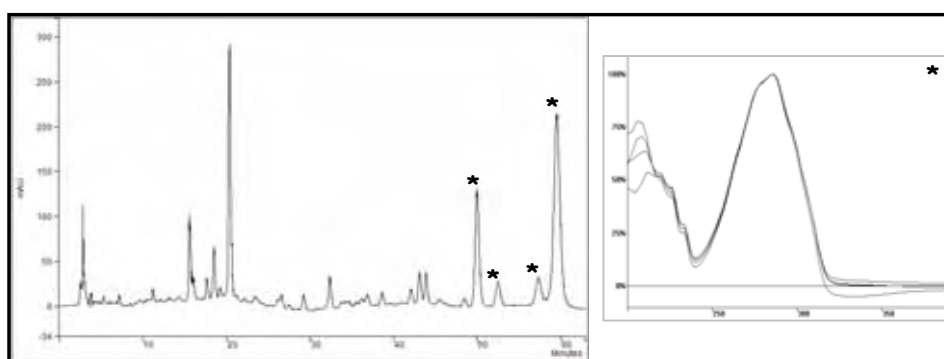


Figura 50: Espectro no UV dos picos da substância do grupo G2 (*) no cromatograma da folha nova.

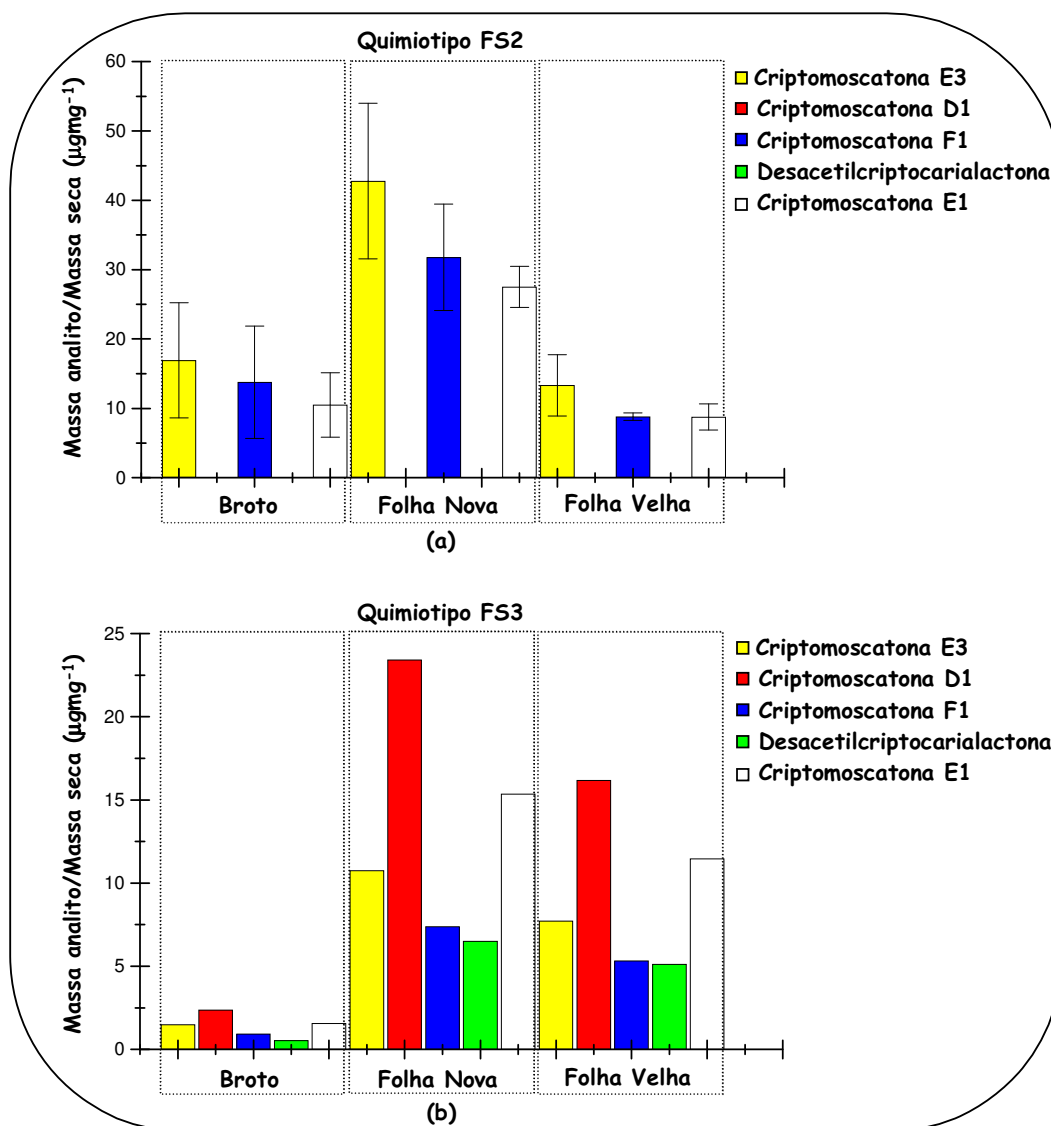


Figura 51: Perfil de estilipironas no quimiotipo FS de *C. mandioccana* no decorrer do desenvolvimento das folhas considerando os subtipos: (a) – FS2; (b) – FS3.

1.2 – Ocorrência de metabólitos secundários em órgãos de quimiotipos de *C. mandioccana*

A ocorrência de metabólitos secundários em órgãos de quimiotipos de *C. mandioccana* foi avaliada para verificar a composição e o teor de alcalóides, flavonóides e estilipironas e avaliar se há paralelo com o perfil de estilipironas observadas em folhas.

Folhas velhas, galhos, cascas do tronco e raízes de dez indivíduos de *C. mandioccana* sendo cinco do quimiotipo F (CB 231, 283, 301, 314 e 354) e cinco do quimiotipo FS (CB 230, 300, 302, 316 e 353), foram analisados.

A composição quali e quantitativa dos metabólitos em *C. mandioccana* foi diferente quando considerado o órgão e os indivíduos do quimiotipo F ou FS.

Nos indivíduos do quimiotipo F e FS foi observado o acúmulo de flavonóides somente nas folhas (Figura 52, pág. 138).

Alcalóides estão presentes em todos os órgãos dos indivíduos do quimiotipo F e FS, principalmente nas cascas do tronco e raízes, onde esse metabólito se encontra em alta concentração (Figura 52, pág. 138).

Em nenhum órgão dos indivíduos do quimiotipo F foi observada a presença de estilipironas (Figura 52a, pág. 138). Esses metabólitos foram observados significativamente nas folhas, e em baixas concentrações em galhos e raízes dos indivíduos do quimiotipo FS, estando ausente nas cascas do tronco (Figura 52b, pág. 138).

Através da Figura 53, pág. 139 podemos observar que o perfil de estilipironas no quimiotipo FS, considerando o quimiotipo FS2, não sofreu alteração nos diferentes órgãos analisados, porém foi observada redução significativa no teor desses metabólitos nos galhos e nas raízes em comparação com o teor observado em folhas. No quimiotipo FS3 o perfil de estilipironas foi observado somente em folhas.

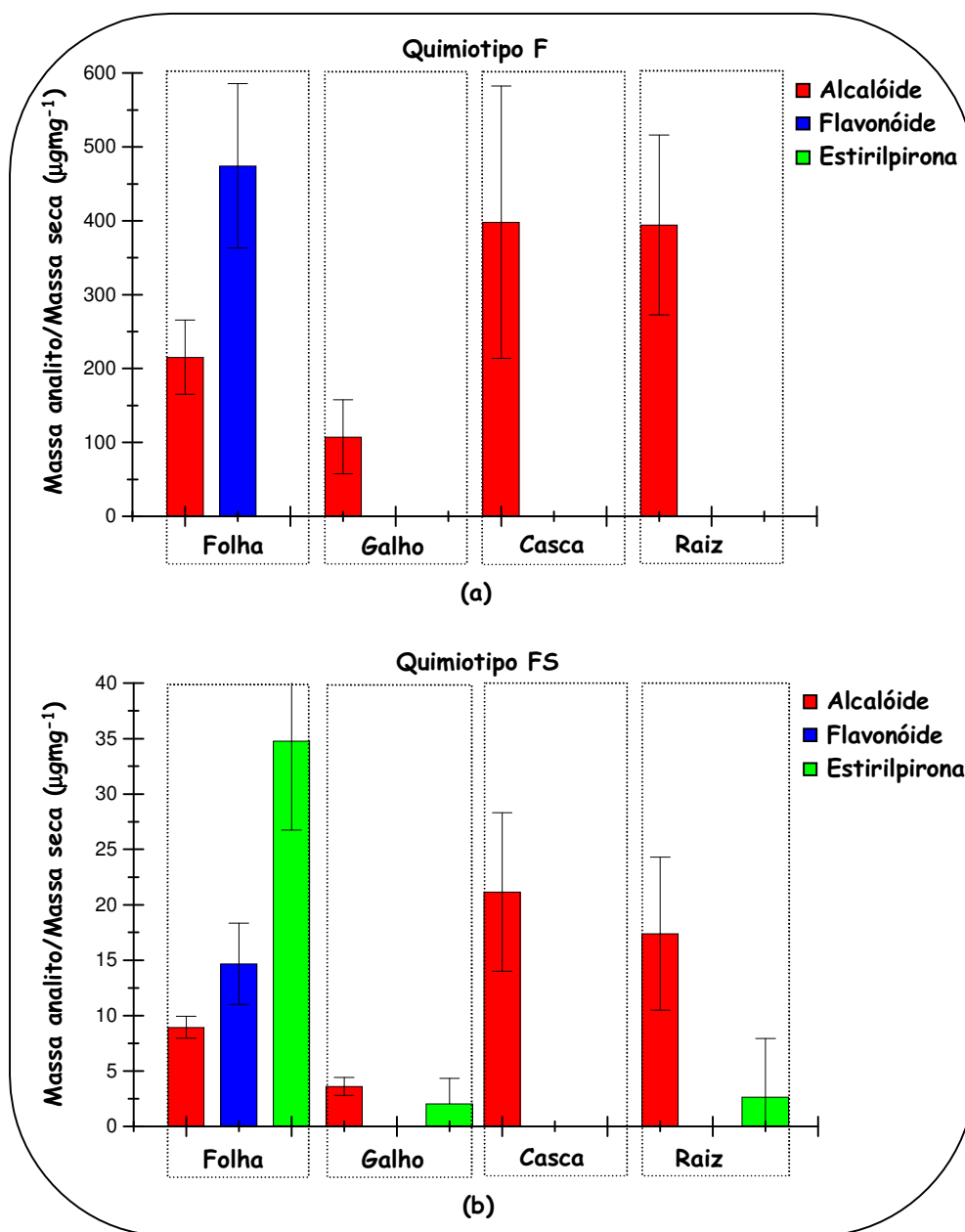


Figura 52: Ocorrência de metabólitos em órgãos e em quimiotipos de *C. mandioccana*: (a) – quimiotipo F; (b) – quimiotipo FS.

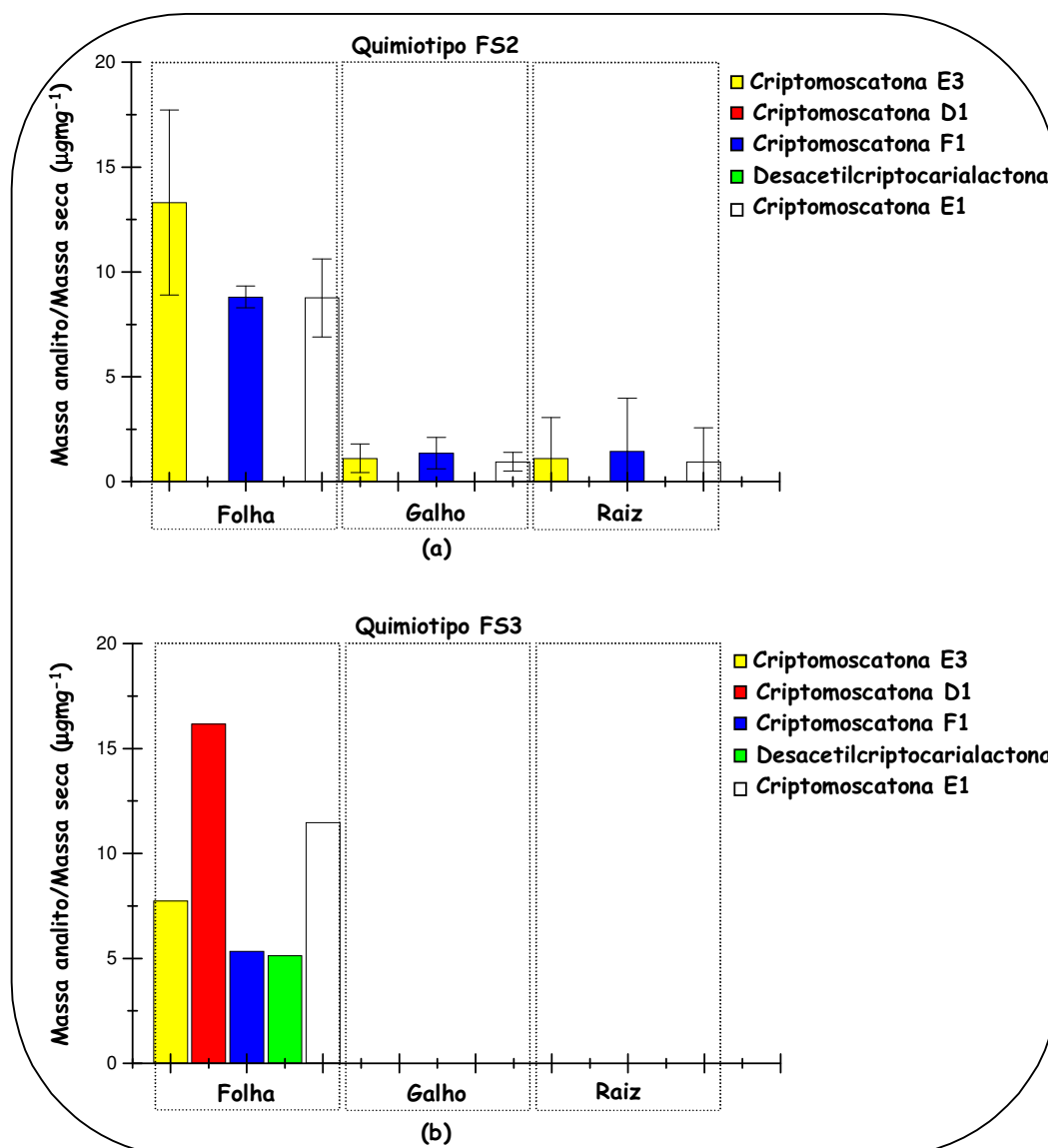


Figura 53: Perfil de estilipironas no quimiotipo FS de *C. mandioccana* nos diferentes órgãos considerando os subtipos: (a) – FS2; (b) – FS3.

1.2.1 – Ocorrência dos alcalóides menisperina e xantoplanina em órgãos de quimiotipos de *C. mandioccana*

Alcalóides aporfínicos constituem um largo grupo de isoquinolínicos com mais de 500 estruturas relatadas na literatura. Muitos aporfínicos naturais possuem atividades farmacológicas, incluindo antioxidante, bactericida, fungicida, antiplaquetária, antitumoral, anticonvulsivante, antiplasmodial, antineoplástica,

antimalárica, citotóxica, antiparkinsoniana e anti HIV (CHIA, et al., 1999, JANTAN, et al., 2006, KASHIWADA, et al., 2005, STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005, ZHANG, et al., 2007, ZHAO; ZHAO; WANG, 2006). No entanto, seus derivados quaternários parecem ser relativamente raros e pouco é conhecido sobre sua farmacologia (ITURRIAGA-VÁSQUEZ, et al., 2007). Alcalóides aporfínicos quaternários possuem estrutura similar a da tubocurarina, o que os torna potentes bloqueadores de receptores acetilcolínicos nicotínicos. Iturriaga-Vásquez e colaboradores (2007) relataram significativa atividade bloqueadora de receptores acetilcolínicos nicotínicos para alguns alcalóides aporfínicos quaternários, entre eles a xantoplanina. Receptores acetilcolínicos nicotínicos são receptores neurotransmissores excitatórios em vertebrados e invertebrados. Em insetos, esses receptores são o sítio alvo para muitos compostos sintéticos e de ocorrência natural que exibem potente atividade inseticida. Esses receptores são alvos de muitas drogas antiparasitárias usadas em saúde humana. Muitos compostos isolados a partir de plantas são potentes agonistas ou antagonistas desses receptores, sugerindo que esses podem estar envolvidos em um mecanismo de defesa contra insetos e outros herbívoros (MILLAR; DENHOLM, 2007).

A ocorrência dos alcalóides aporfínicos quaternários menisperina e xantoplanina em órgãos de quimiotipos de *C. mandioccana* foi avaliada para verificar se o acúmulo desses metabólitos tem paralelo com o perfil de estilipironas verificado em folhas de *C. mandioccana*.

Folhas velhas, galhos, cascas do tronco e raízes de dez indivíduos de *C. mandioccana* sendo cinco do quimiotipo F (CB 231, 283, 301, 314 e 354) e cinco do quimiotipo FS (CB 230, 300, 302, 316 e 353), foram analisados.

Um teste *t* (MORGAN, 1991) foi aplicado para comparar a composição dos alcalóides nos indivíduos dos quimiotipos F e FS e nos diferentes órgãos. Nenhuma diferença significativa na composição quali e quantitativa dos alcalóides aporfínicos quaternários, menisperina e xantoplanina, foi observada quando considerados os indivíduos do quimiotipo F e FS (Figura 54, pág. 141), o que indica que não há paralelo entre o acúmulo dos alcalóides e o perfil de estilipironas observado em folhas. No entanto, significativas diferenças quantitativas desses compostos foram verificadas entre os diferentes órgãos (Figura 54, pág. 141). Ambos alcalóides foram encontrados em maior concentração em raízes e cascas dos troncos, quando comparados com folhas velhas e galhos.

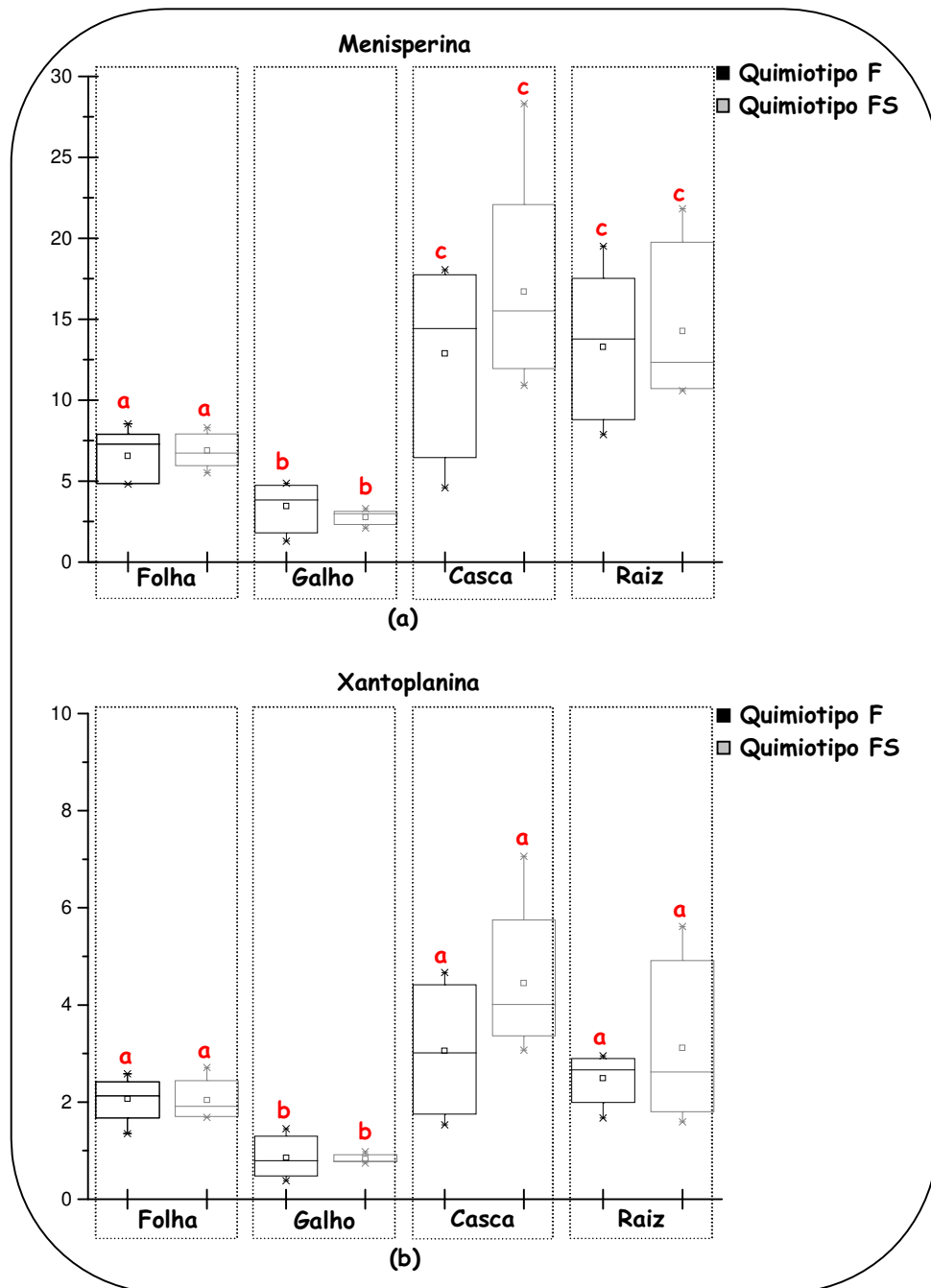


Figura 54: Variabilidade de menisperina (a) e xantoplanina (b) com relação aos quimiotipos de estilipironas em *C. mandioccana* nos diferentes órgãos.

2 – Verificação da presença de estirilpironas em plântulas

Folhas de plântulas novas e velhas de *C. mandioccana* foram analisadas com o intuito de avaliar a presença de estirilpironas para que os estudos de biossíntese fossem conduzidos.

Plântulas novas e velhas apresentaram composição e teor semelhante em termos de alcalóides, flavonóide e estirilpironas (Figura 55, pág. 143). A identificação dos metabólitos foi realizada pelo perfil no UV. O pico 1 foi identificado como alcalóide, o pico 2 como flavonóide e os picos 3 a 7 como estirilpironas.

Através dos estudos de variabilidade intraespecífica dos metabólitos em quimiotipos de *C. mandioccana* em diferentes órgãos (Capítulo II) foi possível observar que estirilpironas estão presentes principalmente nas folhas dos indivíduos do quimiotipo FS. Com essa informação, assim como com a confirmação da presença de estirilpironas em plântulas, os experimentos de biossíntese desse metabólito foram conduzidos com folhas de plântulas e folhas de indivíduos adultos (Capítulo III).

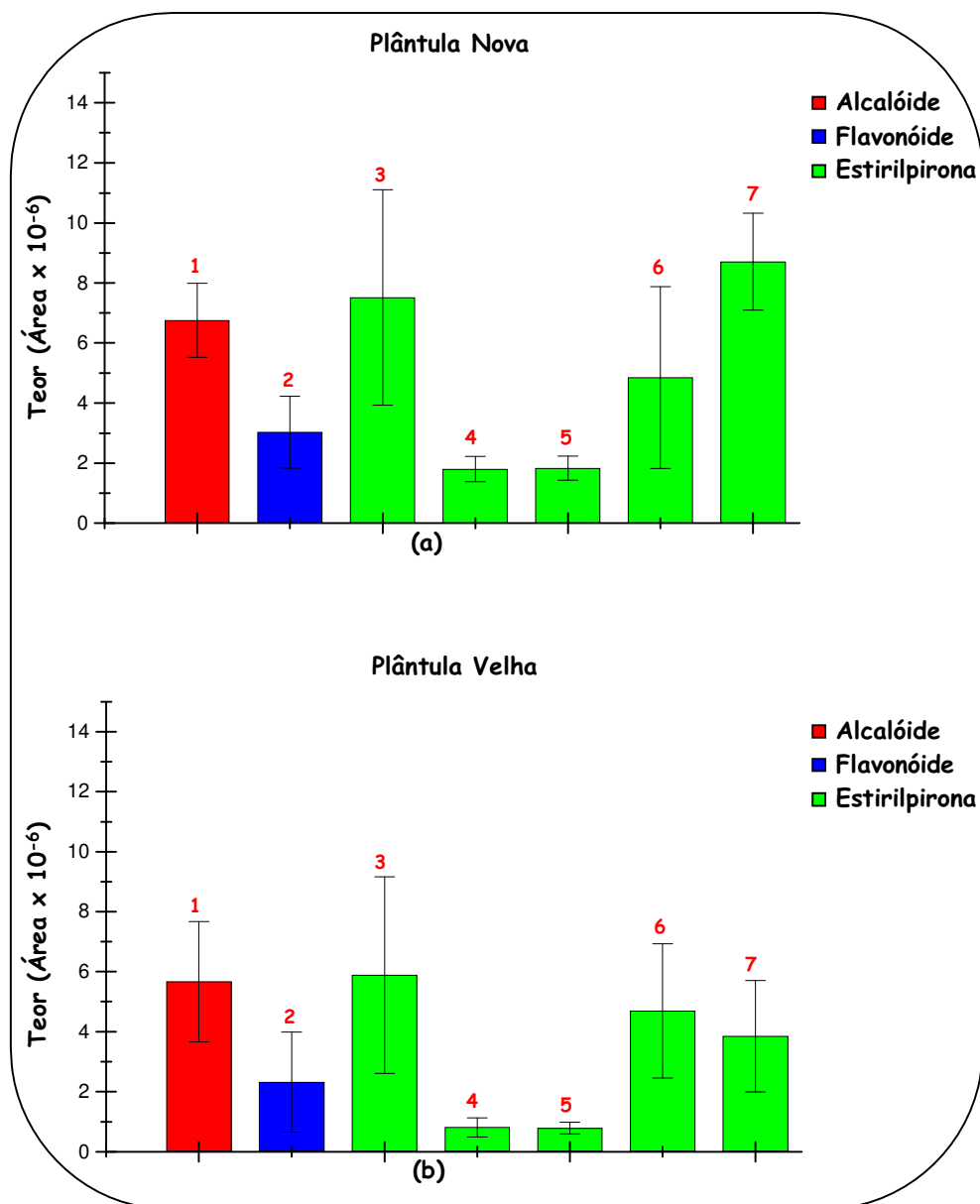


Figura 55: Teor de alcalóides, flavonóides e estirilpironas em folhas de plântulas de *C. mandioccana*: (a) – plântula nova; (b) – plântula velha.

Capítulo III
Biossíntese de Estirilpironas
em C. mandioccana

PARTE EXPERIMENTAL

1 – Materiais e Equipamentos

1.1 – Materiais

- Material vegetal:

Folhas de plântulas de *C. mandioccana*

Folhas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*)

- Padrões:

Desacetilcriptocarialactona isolada a partir das folhas de *C. mandioccana* e goniotalamina isolada a partir das folhas de *C. moschata* (ex *C. aschersoniana*)

- Solventes:

AcOEt, Acetona, Hexano e MeOH (Synth, grau analítico)

ACN e MeOH (J.T.Backer, grau HPLC)

H₂O (ultrapura preparada em sistema Mili-Q)

- Reagentes:

Ácido acético, ácido fosfórico, ácido clorídrico, bicarbonato de sódio e ascorbato de sódio (Synth)

Ácido bórico e borax (Hexis)

Trietilamina (Vetec)

PVPP (Acros)

L-fenilalanina, ácido *trans*-cinâmico, malonil SCoA, *N*-hidroxisuccinimida, Coenzima A e DCC (Sigma)

DTT (Plusone)

Fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico (J.T.Baker)

EDTA (Mallinckrodt)

- Adsorvente:

Amberlite IR-120 (Synth)

- Softwares:
Star Chromatography Workstation 5.52
ChemSketch 4.0
Microcal Origin 5.0
Microsoft Office Excel

1.2 – Equipamentos

- Balança:
Análítica – Mettler Toledo, modelo AG245
- Ultra-som:
Elma, modelo Transsonic 570, frequência 35 KHz
- Centrífuga:
Celm, modelo Combate, rotação 2800 rpm (1200 g)
Centrífuga refrigeradora – Sorvall RC 5C plus
Microcentrífuga – Denver Instrument
- CLAE-DAD:
Módulos: 1-Bomba: ProStar 240 Solvent Delivery Module; 2-Detector: ProStar 330 Photodiode Array Detector; 3-Injetor Automático: ProStar 410 Auto-Sampler; 4-Integrador: Microcomputador (processador Pentium III, 500 MHz), com “software” “Star Chromatography Workstation”
- Colunas Cromatográficas:
Coluna Phenomenex Luna[®] C18, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm
Coluna Phenomenex Luna[®] C8, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm
- RMN:
Espectrômetro Bruker AC-200 F operando a 200 MHz para ¹H

- IV:
Nicolet, modelo Impact 400, software Omnic 120
- Espectrômetro de Massa:
Espectrômetro quadrupolar do tipo *time of flight* UtrOTOF-Q, Bruker Daltonics
- Espectrofotômetro UV-Vis:
Ultrospec 2100 Pro
- pHmetro:
Denver Instrument UB-10, Ultra Basic
- Liofilizador:
Savant Micro Modulyo
- Freezer -86°C:
Forma Scientific
- Cuba da eletroforese:
Hoefler Mighty Small Dual Gel Caster; Mighty Small SE250/SE260 Mini Vertical Unity, Fonte Electrophoresis Power Supply EPS 301.
- Scanner:
Magic Scan 32 V-4,6 da marca Amersham Biosciences

2 – Metodologia

A proposta de avaliar a biossíntese de estilipironas (Figura 22, pág. 57) estabelecida nesse trabalho envolveu o estudo de dois modelos: *C. mandioccana* e *C. moschata*.

2.1 – C. mandioccana

O estudo biossintético de estilipironas em *C. mandioccana* estabelecido neste trabalho envolveu a determinação da atividade da PAL, a síntese de cinamoil SCoA e a determinação da atividade da SPS.

2.1.1 – Determinação da atividade da PAL

Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) em *C. mandioccana* responsável pela produção de ácido *trans*-cinâmico a partir de fenilalanina (Figura 22, pág. 57) Foi utilizado um protocolo de extração enzimática, dessalinização, ensaio enzimático e análise cromatográfica utilizado por Silva (2004) com pequenas modificações.

2.1.1.1 – Extração enzimática

Todas as etapas foram conduzidas mantendo-se a temperatura entre 0 a 4°C.

1. Pesagem de 1,0 g de folhas de plântulas de *C. mandioccana* coletadas no IQ – UNESP – Araraquara.
2. Lavagem e trituração em N₂ líquido, com ajuda de almofariz, juntamente com 0,02 g de PVPP, 0,01 g de sílica gel-60 e 12,5 mL de tampão* borato (0,05 M e pH=8,4) até completa homogeneização.
3. Filtração do extrato enzimático em gaze.
4. Centrifugação do filtrado à 4°C durante 20 minutos a 10000 rpm.

* O tampão foi preparado de acordo com o protocolo descrito por Stoll e Blanchard (1990)

2.1.1.2 – Dessalinização do extrato enzimático

1. Condicionamento da coluna PD-10 (Sephadex G-25) com 25,0 mL de tampão borato (0,05 M e pH=8,4).
2. Aplicação de uma alíquota de 2,5 mL do extrato enzimático na coluna PD-10 (Sephadex G-25) e eluição com aproximadamente 3,5 mL do eluente.
3. Coleta do extrato enzimático em tubo de ensaio, imerso em banho de gelo.

2.1.1.3 – Ensaio enzimático

1. Adição em ependorff de:
 - 1000 μL de tampão borato (0,05 M e $\text{pH}=8,4$)
 - 300 μL de *L*-fenilalanina (10 mM)
 - 200 μL de extrato enzimático
 2. Incubação por 32 horas à 46°C.
 3. Interrupção da reação com adição de 100 μL de ácido clorídrico 6 M.
 4. Centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm.
 5. Retirada de uma alíquota do sobrenadante.
 6. Filtração da amostra em membrana Millipore[®] (0,45 μm) e acondicionamento em frasco para injeção automática (CLAE).
- Controle: adição de 100 μL de ácido clorídrico 6 M antes da incubação.

2.1.1.4 – Análise cromatográfica

O controle da reação, o produto do ensaio enzimático e o padrão de ácido *trans*-cinâmico foram analisados em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas para CLAE-DAD utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 24, pág. 149.

Tabela 24: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise da PAL em folhas de plântulas de *C. mandioccana*

Parâmetro	Condição
Fase Estacionária	C18
Fase Móvel: A (H ₂ O:HAc - 99:01) B (MeOH)	Isocrático A:B 60:40
Tempo de Equilíbrio (min)	15
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0
λ (nm)	275
Volume de injeção (μL)	20

2.1.2 – Síntese de cinamoil SCoA

Para determinar a atividade da enzima estirilpirona sintase (SPS) em *C. mandioccana* responsável pela produção de estirilpironas a partir dos precursores

cinamoil SCoA e unidades de malonil SCoA (Figura 22, pág. 57) foi necessário realizar a síntese de cinamoil SCoA. A proposta de síntese de cinamoil SCoA envolveu duas etapas que compreenderam a síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico e a síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida (Figura 56, pág. 150). O procedimento experimental de cada etapa está descrito abaixo.

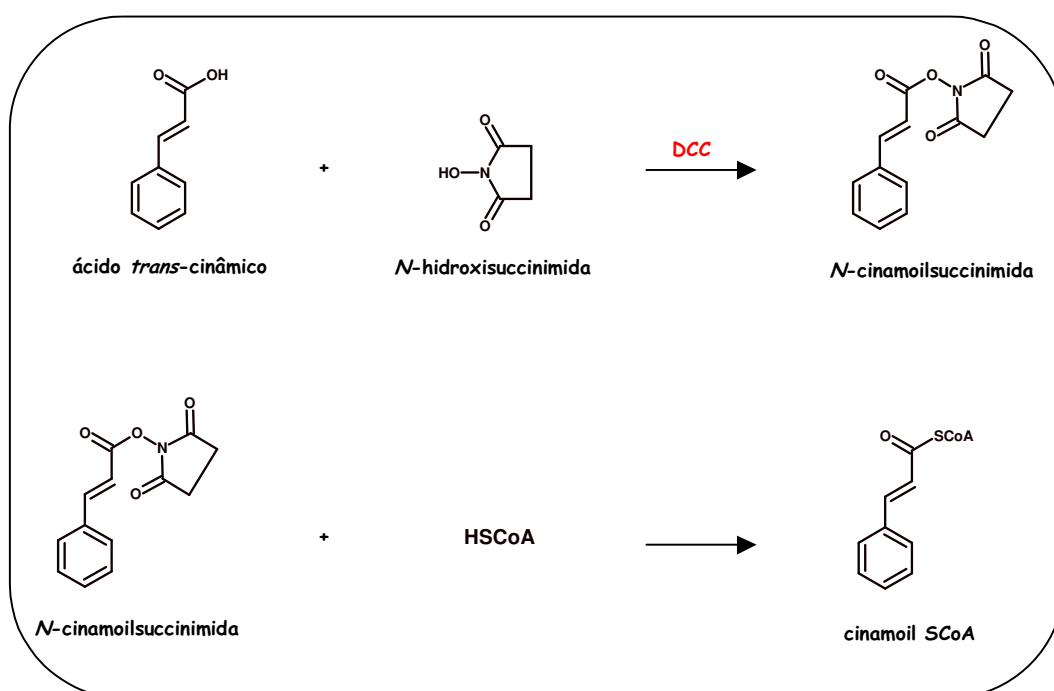


Figura 56: Síntese de cinamoil SCoA e de seus derivados.

2.1.2.1 – Etapa I: Síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico

Foi utilizado um protocolo de síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico estabelecido por Stockigt e Zenk (1975) com pequenas modificações.

1. Dissolução de 1,5 mmol de ácido *trans*-cinâmico sob aquecimento (60°C) em AcOEt absoluto e adição lenta e total de 2,0 mmol de *N*-hidroxissuccinimida.
2. Resfriamento à 30°C e adição de 2,0 mmol de dicioexilcarbodiimida (DCC).

3. Separação da dicicloexiluréia por filtração após 24 horas de reação.
4. Extração do filtrado com bicarbonato de sódio 1M.
5. Evaporação do solvente orgânico.

O rendimento da reação foi calculado e a identificação do produto foi realizada através de:

1. Ponto de Fusão
2. Espectro no Infravermelho
3. Espectro de RMN de ^1H
4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Espectro no Ultra Violeta
5. Espectro de Massas

2.1.2.2 – Etapa II: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida

Foi utilizado um protocolo de síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida estabelecido por Stockigt e Zenk (1975) com pequenas modificações.

1. Adição de 130 μmol de bicarbonato de sódio e 65 μmol de *N*-cinamoilsuccinimida em 2 mL de solução aquosa de 13 μmol de SCoA borbulhada com N_2 .
2. Adição de acetona até formar uma única fase.
3. Evaporação do solvente orgânico com N_2 após 24 horas de reação.
4. Filtração do precipitado.
5. Dessalinização da fase aquosa com Amberlite IR-120.
6. Extração da fase aquosa com AcOEt.
7. Liofilização da fase aquosa.

O rendimento da reação foi calculado e a identificação do produto foi realizada através de:

1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Espectro no Ultra Violeta

2.1.3 – Determinação da atividade da SPS

Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima estirilpirona sintase (SPS) em *C. mandioccana* responsável pela produção de

estirilpironas a partir de cinamoil SCoA e unidades de malonil SCoA (Figura 22, pág. 57). Foi realizado um protocolo de extração enzimática e ensaio enzimático utilizado por Beckert e colaboradores (1997) com pequenas modificações e análise cromatográfica.

2.1.3.1 – Extração enzimática

Todas as etapas foram conduzidas mantendo-se a temperatura entre 0 a 4°C.

1. Pesagem de 4,0 g de folhas de plântulas de *C. mandioccana* coletadas no IQ – UNESP – Araraquara.
2. Lavagem e trituração em N₂ líquido, com ajuda de almofariz, juntamente com 3,0 g de PVPP, 20 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8), 14 mM de DDT, 40 mM de ascorbato de sódio e 3 mM de EDTA até completa homogeneização.
3. Filtração do extrato enzimático em gaze.
4. Centrifugação do filtrado a 4°C durante 40 minutos a 1000 rpm.

* O tampão foi preparado de acordo com o protocolo descrito por Stoll e Blanchard (1990)

2.1.3.2 – Ensaio enzimático

1. Adição em ependorff de:

- 70 µL de tampão fosfato (0,5 M e pH=6,8)
- 5,0, 7,5 ou 10,0 µL de malonil SCoA (30 mM)
- 10 µL de cinamoil SCoA (4 mM)
- 15 µL de extrato enzimático

2. Incubação por 30 minutos à 30°C.

3. Interrupção da reação com adição de 100 µL de MeOH.

4. Centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm.

5. Retirada de uma alíquota do sobrenadante.

6. Filtração da amostra em membrana Millipore® (0,45 µm) e acondicionamento em frasco para injeção automática (CLAE).

Controles: (1) adição de todos os reagentes exceto o extrato enzimático

(2) adição somente de extrato enzimático e tampão

Os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 25, pág. 153.

Tabela 25: Experimentos biossintéticos realizados em folhas de plântulas de *C. mandioccana* para avaliar a atividade da enzima SPS

Experimento	Tampão Fosfato (μL)	Extrato Enzimático (μL)	Cinamoil 4 mM (μL)	Malonil 30 mM (μL)	[Cinamoil]f	[Malonil]f	Cinamoil: Malonil
1 (controle 1)	70	-	10	5	0,47	1,76	1:3
2 (controle 2)	70	15	-	-	-	-	-
3 (ensaio enzimático)	70	15	10	5	0,40	1,50	1:3
4 (controle 1)	70	-	10	10	0,44	3,33	1:7
5 (controle 2)	70	15	-	-	-	-	-
6 (ensaio enzimático)	70	15	10	10	0,38	2,86	1:7
7 (controle 1)	70	-	10	7,5	0,46	2,57	1:5
8 (controle 2)	70	15	-	-	-	-	-
9 (ensaio enzimático)	70	15	10	7,5	0,39	2,20	1:5

2.1.3.3 – Análise cromatográfica

Os dois controles da reação, o produto do ensaio enzimático e os padrões de estirilpironas foram analisados em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 26, pág.153.

Tabela 26: Condições cromatográficas para CLAE-DAD na análise da SPS em folhas de plântulas de *C. mandioccana*

Parâmetro	Condição			
Fase Estacionária	C8			
Fase Móvel: A (Tampão pH≅2)* B (MeOH) C (ACN)	Tempo	% Tampão*	% MeOH	% ACN
	0	83	06	11
	10	77	08	15
	20	67	19	14
	30	61	22	17
	40	59	14	27
	45	50	50	0
	60	50	50	0
Tempo de Equilíbrio (min)	15			
Fluxo (mLmin ⁻¹)	1,0			
λ (nm)	254			
Volume de injeção (μL)	20			

* [TEA]=11,9 mM e [H₃PO₄]=14,3 mM

2.2 – *C. moschata*

Considerando a necessidade de material vegetal em abundância e de fácil acesso para otimizar extração e ensaio enzimático na determinação da atividade da SPS foi escolhida uma espécie modelo já que as plântulas de *C. mandioccana* cultivadas na casa de vegetação do IQ-UNESP-Araraquara foram insuficientes para esse estudo e a coleta desse material tornou-se inviável pela distância.

C. moschata foi selecionada como espécie modelo para os estudos biossintéticos na determinação da atividade da SPS. Essa espécie pertence ao mesmo gênero da espécie objeto desse trabalho e tem como produto majoritário apenas uma estilpirona, a goniotalamina. Além disso, é uma planta abundante e de fácil acesso estando localizada na cidade de Ibaté, próxima à Araraquara. Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima estilpirona sintase (SPS) em *C. moschata* responsável pela produção de goniotalamina a partir de cinamoil SCoA e duas unidades de malonil SCoA (Figura 57, pág. 154). O estudo biossintético de estilpironas em *C. moschata* (Figura 57, pág. 154) envolveu a análise circadiana de estilpironas e a aplicação de protocolos envolvendo extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, determinação de proteínas totais e eletroforese.

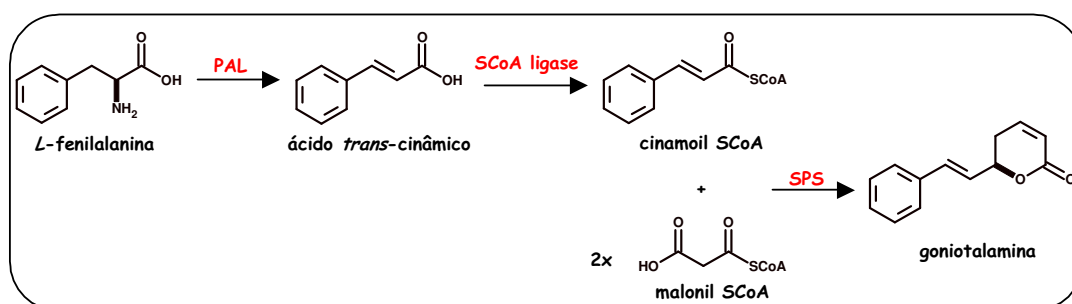


Figura 57: Biogênese de goniotalamina em *C. moschata*.

2.2.1 – Análise circadiana de estilpironas em folhas de *C. moschata*

Para garantir a coleta das folhas de *C. moschata* no período de maior produção de estilpironas foi realizada uma análise circadiana desse metabólito. A

análise circadiana de estirilpironas em folhas de *C. moschata*, estabelecida nesse trabalho, envolveu etapas que compreenderam:

2.2.1.1 – Construção da curva analítica para quantificação de goniotalamina

Preparação dos padrões

Solução estoque de goniotalamina ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo 2,0 mg do analito em 10,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).

Solução estoque de padrão interno, desacetilcriptocarialactona, ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo 3,0 mg do analito em 10,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).

Preparação das amostras

Soluções contendo 25, 50, 75, 100 e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goniotalamina, substância obtida a partir das folhas de *C. moschata* (TELASCREA, 2006) foram preparadas pela diluição apropriada da solução estoque. Em cada solução foi adicionado $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de desacetilcriptocarialactona pela diluição apropriada da solução estoque.

Desacetilcriptocarialactona, substância obtida a partir das folhas de *C. mandioccana* (TELASCREA, 2006) e ausente no extrato de *C. moschata* foi utilizada como padrão interno. A utilização de padrão interno é o método utilizado com maior confiabilidade nas determinações cromatográficas quantitativas.

Curva analítica

A curva analítica com padronização interna, $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de desacetilcriptocarialactona, foi construída com 5 níveis de concentração de goniotalamina (25, 50, 75, 100 e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as análises foram realizadas em triplicata.

Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

2.2.1.2 – Quantificação de goniotalamina em folhas de *C. moschata*

Coleta e preparação do material vegetal

Folhas de *C. moschata* foram coletadas na cidade de Ibaté, de 4 em 4 horas, durante 24 horas. Essas folhas foram secas em estufa à 40°C, com circulação de ar, por 24 horas e moídas.

Extração

Foi realizado um protocolo de extração e pré-tratamento da amostra estabelecido por Nehme e colaboradores (2005) com pequenas modificações.

1. Pesagem com exatidão de 100 mg de folhas secas e moídas de *C. moschata* em um tubo de vidro (10,0 mL) para centrífuga, com tampa.
2. Adição de 4,0 mL de hexano.
3. Extração em ultra-som por 30 min.
4. Adição de 4,0 mL de MeOH:HAc 10% 1:1 (v/v).
5. Extração em ultra-som por 30 min.
6. Centrifugação por 10 min a 1200 g.
9. Retirada de toda fase hidroalcoólica.

Soluções foram preparadas com adição de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de desacetilcriptocarialactona usada como padrão interno.

Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

Para dar continuidade aos estudos biossintéticos, utilizando *C. moschata* como modelo, uma coleta de grande quantidade de material vegetal foi realizada no horário de sua maior produção. Esse material foi armazenado a -80°C.

2.2.2 – Aplicação de protocolos

Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima estirilpirona sintase (SPS) em *C. moschata* responsável pela produção de goniotalamina a partir de cinamoil SCoA e duas unidades de malonil SCoA (Figura 57, pág. 154). *C. moschata* foi utilizada como modelo em diversos protocolos

envolvendo extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, determinação de proteínas totais e eletroforese com a finalidade de encontrar a atividade da enzima estirilpirona sintase.

Abaixo seguem as descrições básicas de cada etapa para o estudo da enzima estirilpirona sintase: extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, determinação de proteínas totais e eletroforese. Na Tabela 27, pág. 157, estão destacadas as alterações realizadas nos diferentes protocolos (I, II e III) que envolveram essas etapas.

Tabela 27: Alterações realizadas nos diferentes protocolos (I, II e III) envolvendo as etapas de extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, análise cromatográfica, dosagem protéica e eletroforese

Etapa		Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III
Extração Enzimática	mfolha/vtampão	30 g/100 mL	30 g/200 mL	30 g /200 mL
	açúcar	-	-	sacarose
Precipitação Salina	volume extrato	40 mL	100 mL	100 mL
	massa sal (g)	4,24; 4,52; 6,12 e 3,88	10,6; 11,3; 15,3 e 9,7	10,6; 11,3; 15,3 e 9,7
Dessalinização	v ressuspensão	2,5 mL*	3,5 mL**	3,5 mL**
	D Snd IV***	-	D	D
	frações dessalinizadas utilizadas	(F2)	(F2)	(F1) (F2) (F3)
Ensaio Enzimático	Malonil SCoA	20 mM	20 mM	20 mM
	Cinamoil SCoA	4 mM	4 mM	4 mM
	extrato	15 µL	15 µL	45 µL
	interrupção	método A	método A	método B
Análise Cromatográfica	Fase Estacionária	C18	C8	C8
Dosagem Protéica				*
Eletroforese				*

*ppt ressuspendido em 2,5 mL de tampão (2,5 mL dessalinizado=D)

** ppt ressuspendido em 3,5 mL de tampão (1,0 mL não dessalinizado=ND e 2,5 mL dessalinizado=D)

*** D Snd IV=dessalinização do sobrenadante IV

2.2.2.1 – Extração enzimática

A extração enzimática foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Beckert e colaboradores (1997) com pequenas modificações.

Todas as etapas foram conduzidas mantendo-se a temperatura entre 0 a 4°C

1. Pesagem de folhas de *C. moschata* coletadas na cidade de Ibaté.
2. Lavagem e trituração em N₂ líquido, com ajuda de almofariz, juntamente com 50% (m/v) de PVPP, tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8), 14 mM de DDT, 40 mM de ascorbato de sódio ou ácido ascórbico, 3 mM de EDTA, com e sem adição de 5% de sacarose (m/v) até completa homogeneização.
3. Agitação por 15 minutos em banho de gelo.
4. Filtração do extrato enzimático em gaze.
5. Centrifugação do filtrado à 4°C durante 40 minutos a 10000 rpm.

O precipitado obtido foi descartado, uma alíquota do sobrenadante foi congelada a -80°C e o restante foi submetido ao procedimento de precipitação salina.

* O tampão foi preparado de acordo com o protocolo descrito por Stoll e Blanchard (1990)

2.2.2.2 – Precipitação salina

A precipitação salina com gradiente de saturação de (NH₄)₂SO₄ foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Englard e Seifter (1990), (Tabela 28, pág. 158 e Figura 58, pág. 159). Os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação e o sobrenadante IV foram congelados a -80°C.

Tabela 28: Precipitação com (NH₄)₂SO₄ – quantidade de sal a ser adicionado a 0°C

Saturação (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (gL ⁻¹)
0-20	106
20-40	113
40-65	153
65-80	97

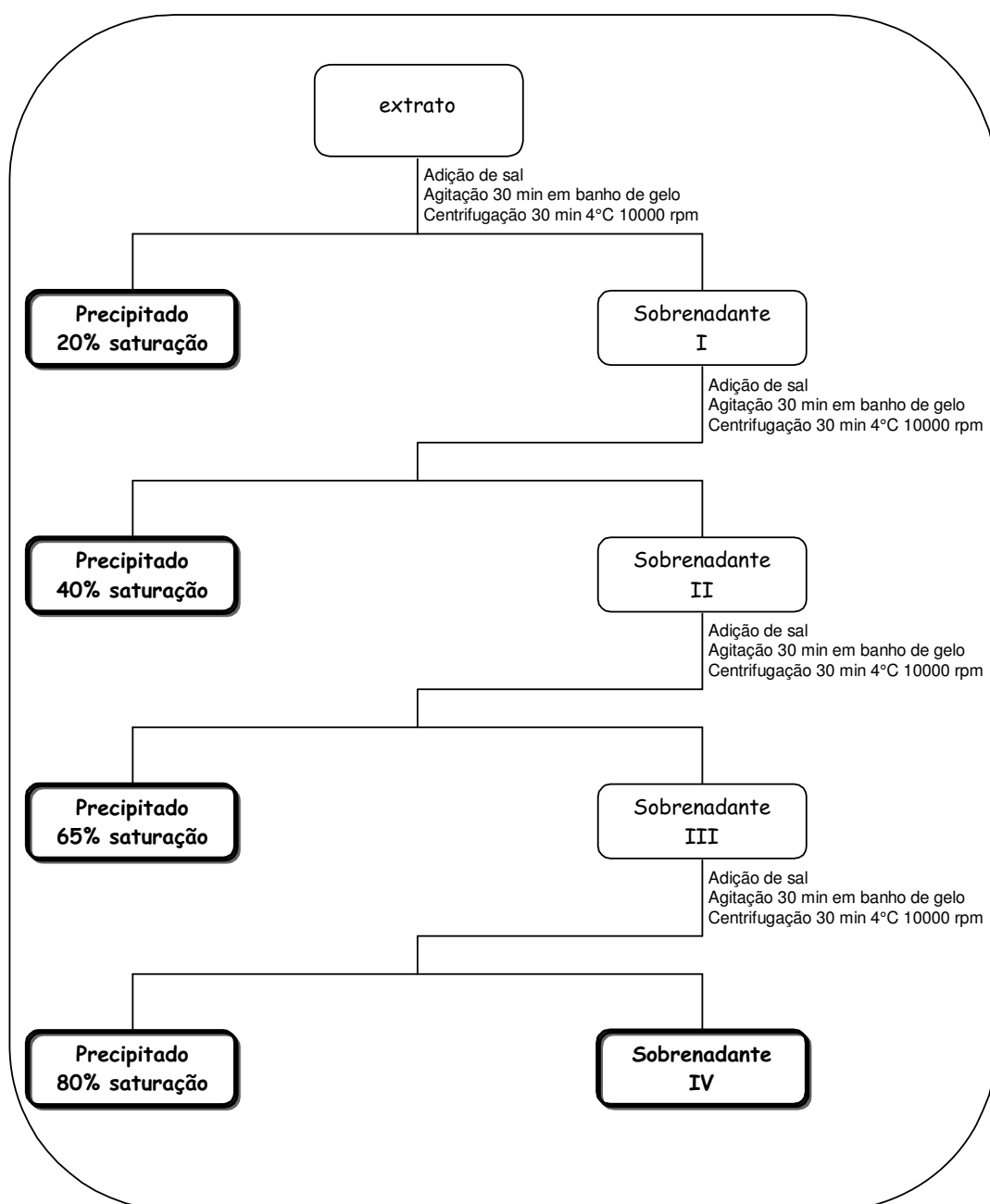


Figura 58: Precipitação salina fracionada do extrato enzimático das folhas de *C. moschata*.

2.2.2.3 – Dessalinização do extrato enzimático

Todos os precipitados foram ressuspensos em 2,5 ou 3,5 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8). Uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante IV também foi

dessalinizada em alguns protocolos. As amostras com intuito de serem dessalinizadas foram eluídas por uma coluna PD-10 (Sephadex G-25).

1. Condicionamento da coluna PD-10 (Sephadex G-25) com 25 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8).
2. Aplicação de uma alíquota de 2,5 mL de amostra na coluna PD-10 (Sephadex G-25).
3. Eluição com 7,0 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8).
4. Coleta do extrato enzimático em três frações: (F1) 2,5 mL, (F2) 3,5 mL e (F3) 3,5 mL.

2.2.2.4 – Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Beckert e colaboradores (1997) com pequenas modificações.

As amostras submetidas aos ensaios enzimáticos para os protocolos I, II e III estão descritas nas Tabelas 29, 30 e 31, pág. 161, 162 e 163, respectivamente.

1. Adição em endorff de:
 - 70 μ L de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8)
 - 5 μ L de malonil SCoA (20 mM)
 - 10 μ L de cinamoil SCoA (4 mM)
 - extrato enzimático
2. Incubação por 30 minutos à 30°C.
3. Interrupção da reação pelos métodos A ou B
 - A) Adição de 100 μ L de MeOH.
Centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm.
Retirada de uma alíquota do sobrenadante.
 - B) Adição de 200 μ L de CHCl_3 .
Agitação.
Centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm.
Retirada de uma alíquota da fase orgânica (150 μ L).
Retirada de uma alíquota da fase aquosa (100 μ L).
Secagem da fase orgânica e dissolução em 100 μ L de MeOH.
4. Acondicionamento em frasco para injeção automática (CLAE).

Controles: (1) adição somente de extrato enzimático

(2) adição de todos os reagentes exceto o extrato enzimático

2.2.2.5 – Análise cromatográfica

Os controles da reação, o produto do ensaio enzimático e o padrão de goniotalamina foram analisados em CLAE-DAD segundo as condições do item 2.1.3.3, pág. 153.

Tabela 29: Experimentos biossintéticos com *C. moschata* no protocolo I

Experimento	Tampão fosfato (µL)	Extrato Enzimático (µL)	Cinamoil 4 mM (µL)	Malonil 20 mM (µL)	[Cinamoil]f	[Malonil]f	Cinamoil: Malonil
Controle	85	-	10	5	0,4	1	1:2
Extrato bruto	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 20% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 40% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 65% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 80% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
Sobrenadante IV (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2

Tabela 30: Experimentos biossintéticos com *C. moschata* no protocolo II

Experimento	Tampão fosfato (μL)	Extrato Enzimático (μL)	Cinamoil 4 mM (μL)	Malonil 20 mM (μL)	[Cinamoil]f	[Malonil]f	Cinamoil: Malonil
Controle	85	-	10	5	0,4	1	1:2
Extrato bruto	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 20% saturação (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 20% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 40% saturação (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 40% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 65% saturação (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 65% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 80% saturação (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
ppt 80% saturação (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
Sobrenadante IV (ND)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2
Sobrenadante IV (D)	85	15	-	-	-	-	-
	70	15	10	5	0,4	1	1:2

Tabela 31: Experimentos biossintéticos com *C. moschata* no protocolo III

Experimento	Tampão fosfato (μL)	Extrato Enzimático (μL)	Cinamoil 4 mM (μL)	Malonil 20 mM (μL)	[Cinamoil]f	[Malonil]f	Cinamoil: Malonil
Controle	115	-	10	5	0,3	0,8	1:2
Extrato bruto	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 20% saturação (ND)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 20% saturação (D)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 40% saturação (ND)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 40% saturação (D)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 65% saturação (ND)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 65% saturação (D)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 80% saturação (ND)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
ppt 80% saturação (D)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
Sobrenadante IV (ND)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2
Sobrenadante IV (D)	85	45	-	-	-	-	-
	70	45	10	5	0,3	0,8	1:2

2.2.2.6 – Dosagem protéica

A determinação da concentração de proteínas totais nas amostras foi realizada utilizando-se o método de Bradford modificado (BERGAMO, 2003).

Amostras de 50 μL contendo 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mgmL⁻¹ de albumina bovina foram preparadas pela diluição apropriada da solução estoque (albumina bovina 1,0 mgmL⁻¹) em cubetas. A essas amostras foi adicionado 1,0 mL de H₂O deionizada e 1,0 mL do reagente de Bradford. A amostra foi homogeneizada e após 5 minutos, a temperatura ambiente, a medida de absorbância foi realizada a λ=595 nm.

O branco foi realizado com adição de 1,0 mL de H₂O deionizada e 1,0 mL do reagente de Bradford em 50 µL de H₂O. A amostra foi homogeneizada e após 5 minutos, a temperatura ambiente, a medida de absorvância foi realizada a $\lambda=595$ nm.

A curva analítica foi construída com absorvância em função da concentração de albumina bovina.

Para determinação da concentração de proteínas totais nas amostras o mesmo protocolo foi aplicado. As concentrações das amostras foram obtidas através da equação da reta da curva analítica.

2.2.2.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A) Preparação das amostras e dos padrões

Preparação das amostras

- Diluição das amostras a uma concentração de aproximadamente 0,1 mgmL⁻¹.
- Adição de 20 µL da amostra.
- Adição de 10 µL de solução *loading buffer**.
- Agitação.
- Aquecimento à 100°C durante 5 minutos.
- Centrifugação por 30 segundos à 10000 rpm.
- Aplicação de 10 µL no gel.

Preparação dos padrões

- Adição de 5 µL de solução de enzimas*.
- Adição de 25 µL de H₂O deionizada.
- Adição de 10 µL de de *loading buffer* *.
- Agitação.
- Aquecimento à 100°C durante 5 minutos.
- Centrifugação por 30 segundos à 10000 rpm.
- Aplicação de 7,5 µL no gel.

*Os reagentes e volumes utilizados na preparação do *loading buffer* estão apresentados na Tabela 32, pág. 165. As enzimas presentes na solução de enzimas estão apresentadas na Tabela 33, pág. 165.

Tabela 32: Reagentes e quantidades utilizados na preparação do *loading buffer**

Reagente	Quantidade
TRIS 1,5 M (pH 6,8)	0,83 mL
Glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
Azul de Bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	completar para 10 mL

*Esta solução foi armazenada a -20°C em alíquotas de 290 µL, sendo que antes do uso foram adicionados 13,5 µL de 0,5 M DTT

Tabela 33: Enzimas presentes na solução padrão utilizada na eletroforese e suas respectivas massas moleculares

Enzima	Massa Molecular (KDa)
fosforilase β	97,4
albumina sérica	66,2
ovalbumina	45,0
anidrase carbônica	31,0
inibidora de tripsina	21,5
α-lactalbumina	14,4

B) Preparação, desenvolvimento e revelação do gel

Preparação do gel

São necessários dois tipos de géis, o gel de separação e o gel de concentração.

Os reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de separação 12% estão apresentados na Tabela 34, pág. 166.

Tabela 34: Reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de separação 12%

Reagente	Volume
Tampão de separação pH 8,8 TRIS 1,5 M SDS 0,4% (m/v)	1,25 mL
Solução acril-bisacrilamida acrilamida 30% (m/v) bisacrilamida 0,8% (m/v)	2,0 mL
H ₂ O	1,72 mL
PSA (10% m/v)	50 µL
TEMED	7 µL

* Deve ser preparado na hora

Os reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de concentração estão apresentados na Tabela 35, pág. 166.

Tabela 35: Reagentes e volumes utilizados na preparação do gel de concentração

Reagente	Volume
Tampão de concentração pH 8,8 TRIS 0,5M SDS 0,4% (m/v)	375 µL
Solução acril-bisacrilamida acrilamida 30% (m/v) bisacrilamida 0,8% (m/v)	150 µL
H ₂ O	770 µL
Bisacrilamida 2% (m/v)	100 µL
PSA (10% m/v)	15 µL
TEMED	2,5 µL

* Deve ser preparado na hora

Após a preparação dos géis, estes foram aplicados no suporte.

Desenvolvimento do gel

Para o desenvolvimento da eletroforese foi adicionado o tampão de corrida*, aplicado uma intensidade de corrente de 20 mA e aplicado padrões e amostras.

*Os reagentes e volumes utilizados na preparação do tampão de corrida pH 8,3 estão apresentados na Tabela 36, pág. 167.

Tabela 36: Reagentes e volumes utilizados na preparação do tampão de corrida pH 8,3

Reagente	Concentração
TRIS	3,025 gL ⁻¹ (0,025 M)
Glicina	14,4 gL ⁻¹ (0,192 M)
SDS	1 gL ⁻¹

Revelação do gel

Ao final da eletroforese o gel foi desmontado e foi iniciado o processo de revelação (Figura 59, pág. 167).

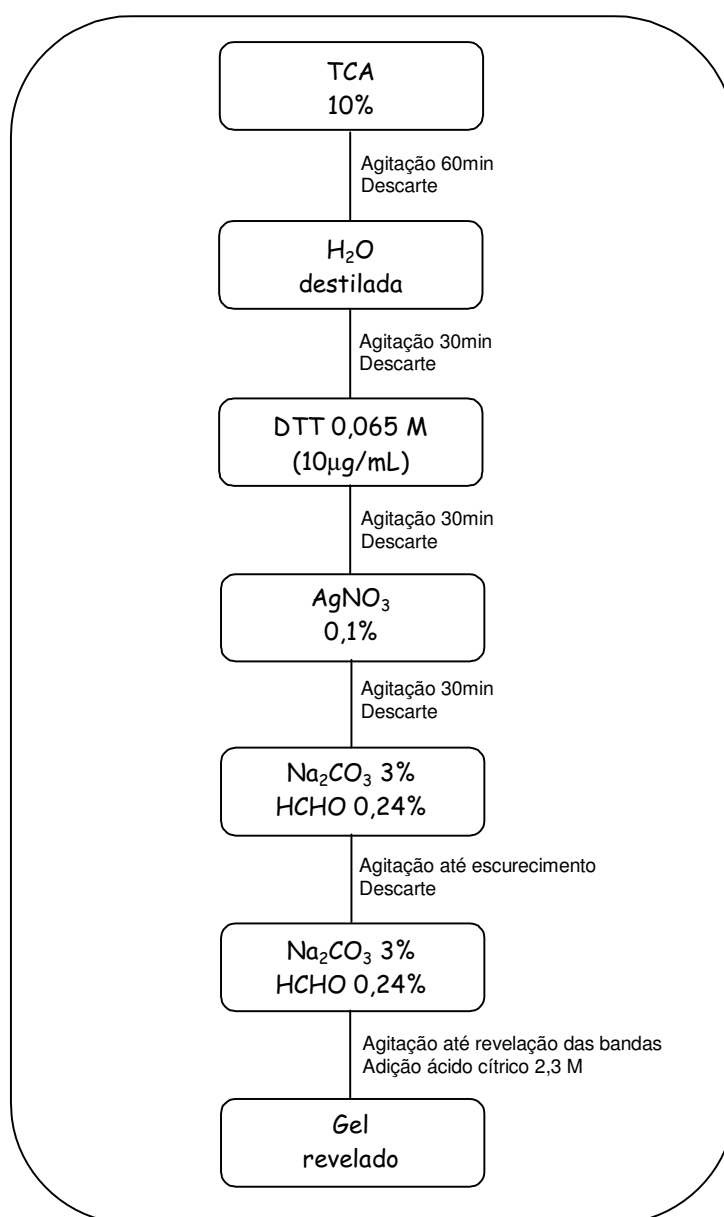


Figura 59: Etapas envolvidas na revelação do gel SDS-PAGE utilizando AgNO₃ como agente revelador.

RESULTADOS

1 – Biossíntese de estilipironas

A proposta de avaliar a biossíntese de estilipironas em quimiotipos de *C. mandioccana* envolveu dois modelos: *C. mandioccana* e *C. moschata*.

1.1 – *C. mandioccana*

A proposta do estudo biossintético de estilipironas em *C. mandioccana* estabelecida neste trabalho envolveu a determinação da atividade da PAL (fenilalanina amônia liase), a síntese de cinamoil SCoA e a determinação da atividade da SPS (estirilpirona sintase). Os resultados estão apresentados abaixo.

1.1.1 – Determinação da atividade da PAL

A enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) tem a habilidade de desaminar a *L*-fenilalanina transformando-a em ácido *trans*-cinâmico (Figura 22, pág. 57). Experimentos foram realizados para confirmar a presença da enzima fenilalanina-amônia-liase em folhas de plântulas de *C. mandioccana*. Protocolos de extração enzimática, dessalinização e ensaio enzimático foram aplicados. O controle da reação, o produto do ensaio enzimático e o padrão de ácido *trans*-cinâmico foram analisados conforme o item 2.1.1.4, pág. 149, e seus cromatogramas assim como os teores de cada pico verificados estão apresentados na Figura 60, pág. 169.

Através da Figura 60b, pág. 169, foi possível observar a formação do ácido *trans*-cinâmico produzido pela reação do extrato enzimático de folhas de plântulas de *C. mandioccana* com o precursor *L*-fenilalanina, cuja ausência dessa substância foi notada no controle da reação Figura 60a, pág. 169.

O experimento realizado, portanto, confirmou que a enzima PAL estava ativa em folhas de plântulas de *C. mandioccana* e converteu *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico.

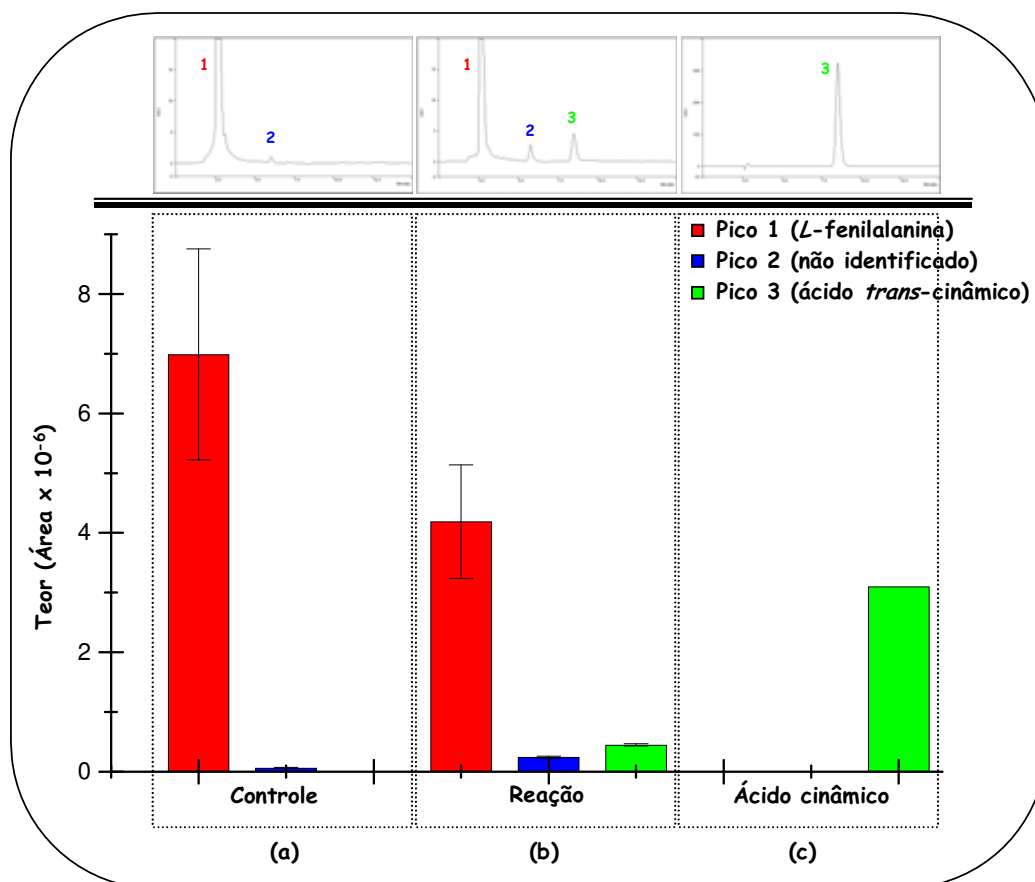


Figura 60: Cromatogramas e teores dos picos: (a) – controle; (b) – reação; (c) – ácido *trans*-cinâmico.

1.1.2 – Síntese de cinamoil SCoA

A enzima estirilpirona sintase (SPS) pode estar envolvida na biossíntese de estirilpironas (Figura 22, pág. 57). Experimentos foram realizados para confirmar a presença da enzima estirilpirona sintase em *C. mandioccana*. Para realizar a biossíntese de estirilpironas a partir dos precursores cinamoil SCoA e unidades de malonil SCoA (Figura 22, pág. 57) foi necessário realizar a síntese de cinamoil SCoA.

A proposta de síntese de cinamoil SCoA, a partir de ácido *trans*-cinâmico estabelecida neste trabalho envolveu duas etapas que compreenderam (I) a síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico e (II) a síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação de *N*-cinamoilsuccinimida. Os resultados estão apresentados abaixo.

1.1.2.1 – Etapa I: Síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico

Foi realizado um protocolo de síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico estabelecido por Stockigt e Zenk (1975) com pequenas modificações. Foram adicionados 222,24 mg de ácido *trans*-cinâmico e 230,20 mg de *N*-hidroxisuccinimida em AcOEt. Com a adição de 412,66 mg de DCC (dicicloexilcarbodiimida) houve a formação dos produtos *N*-cinamoilsuccinimida e dicicloexiluréia (ppt branco). Após 24 horas de reação, a dicicloexiluréia foi filtrada e o filtrado foi extraído com bicarbonato de sódio. A massa esperada para a *N*-hidroxisuccinimida (produto I) foi de 367,50 mg de acordo com a estequiometria da reação (Figura 61, pág. 170).

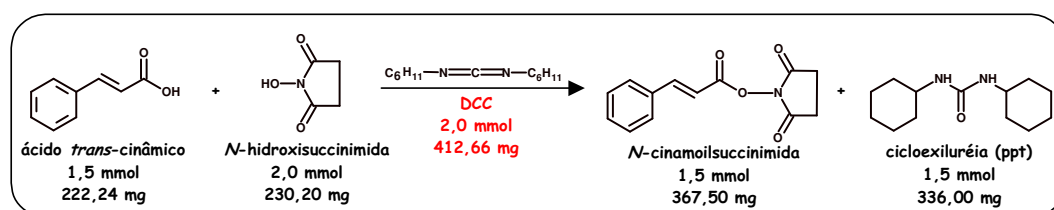


Figura 61: Síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir do ácido *trans*-cinâmico.

O mecanismo da reação está apresentado na Figura 62, pág. 171. A dicicloexilcarbodiimida (DCC) reage com o grupo carboxila do ácido *trans*-cinâmico formando um intermediário reativo. Esse intermediário, que apresenta um bom grupo abandonador, reage com a *N*-hidroxisuccinimida (nucleófilo) numa reação de substituição nucleofílica produzindo a *N*-cinamoilsuccinimida e a dicicloexiluréia.

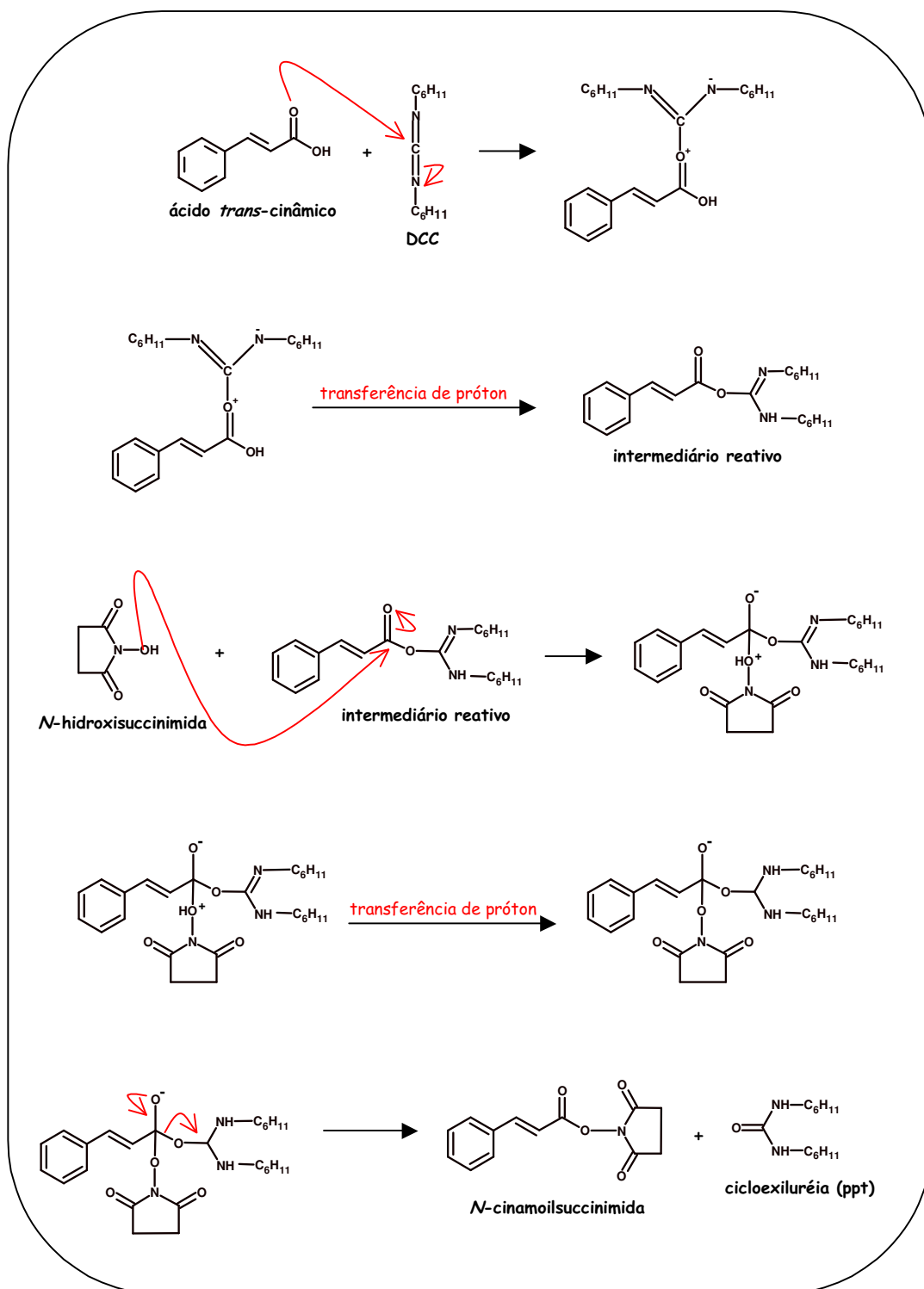


Figura 62: Mecanismo da reação de síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir do ácido *trans*-cinâmico (SOLOMONS; FRYHLE, 2004).

O rendimento da reação foi de 73,9%. Esse rendimento foi considerado bom devido ao rendimento conseguido por Stockigt e Zenk (1975) de 81%.

Experimentos foram realizados para identificação da *N*-cinamoilsuccinimida (produto I) formado e os resultados estão apresentados abaixo.

1. Ponto de fusão

Foi realizada a medida do ponto de fusão do produto formado (produto I) e o resultado foi comparado com o ponto de fusão obtido por Stockigt e Zenk (1975). O produto (I) apresentou ponto de fusão entre 178-180°C. Essa faixa de temperatura foi muito próxima da faixa apresentada por Stockigt e Zenk (1975) para a *N*-cinamoilsuccinimida entre 180-182°C.

2. Espectro na região do Infravermelho

Foi obtido o espectro no infravermelho do produto formado (produto I) para identificar os grupos funcionais presentes em sua estrutura. O espectro de infravermelho do produto formado (produto I) e a estrutura da *N*-cinamoilsuccinimida estão apresentados na Figura 63, pág. 172.

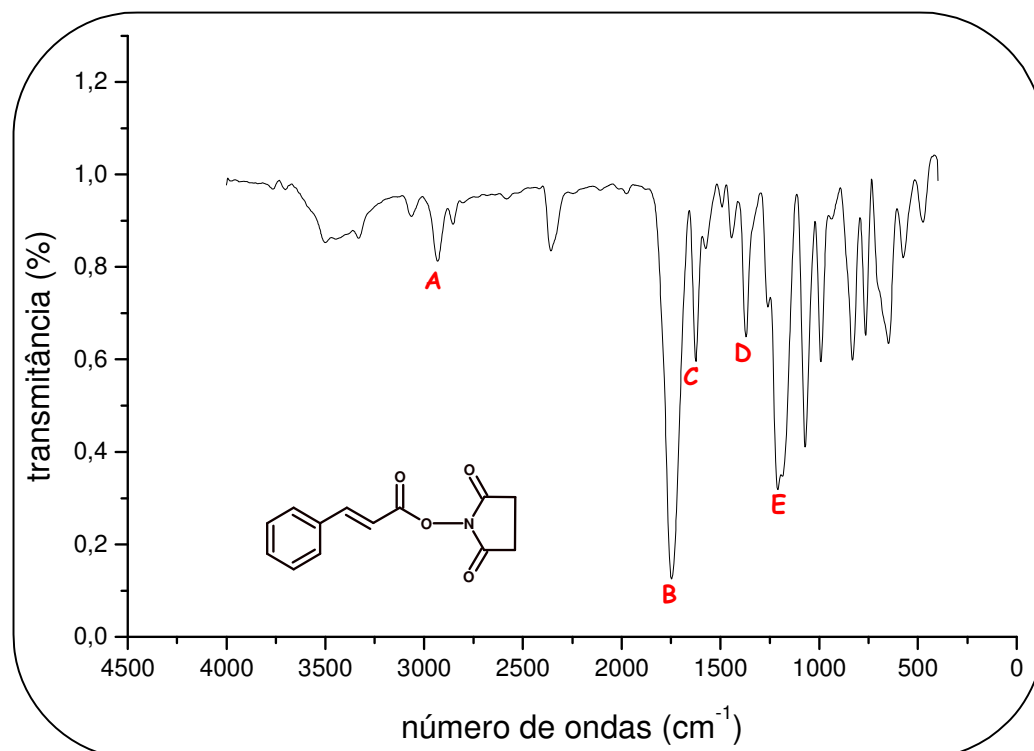


Figura 63: Espectro na região do infravermelho do produto formado (produto I) a partir do ácido *trans*-cinâmico. Ao lado inferior esquerdo apresenta-se a estrutura da *N*-cinamoilsuccinimida.

Através da Figura 63, pág. 172, podemos observar absorções características de alguns grupos funcionais presentes na *N*-cinamoilsuccinimida: a banda A representa deformação axial de C-H aromático em aproximadamente 3000 cm^{-1} , a banda B representa deformação axial de C=O em aproximadamente 1750 cm^{-1} , a banda C representa deformação axial da ligação C-C do anel aromático em aproximadamente 1600 cm^{-1} , a banda D representa deformação axial da ligação C-C do anel aromático em aproximadamente 1400 cm^{-1} , a banda E representa deformação axial de C(=O)-O de em aproximadamente 1250 cm^{-1} .

Através desse experimento foi possível identificar grupos funcionais presentes na estrutura da *N*-cinamoilsuccinimida.

3. Espectro de RMN de ^1H

Foi obtido o espectro de RMN de ^1H do produto formado (produto I) em um espectrômetro operando a 200 MHz para identificação da sua estrutura. O espectro de RMN de ^1H desse produto está apresentado na Figura 64, pág. 173.

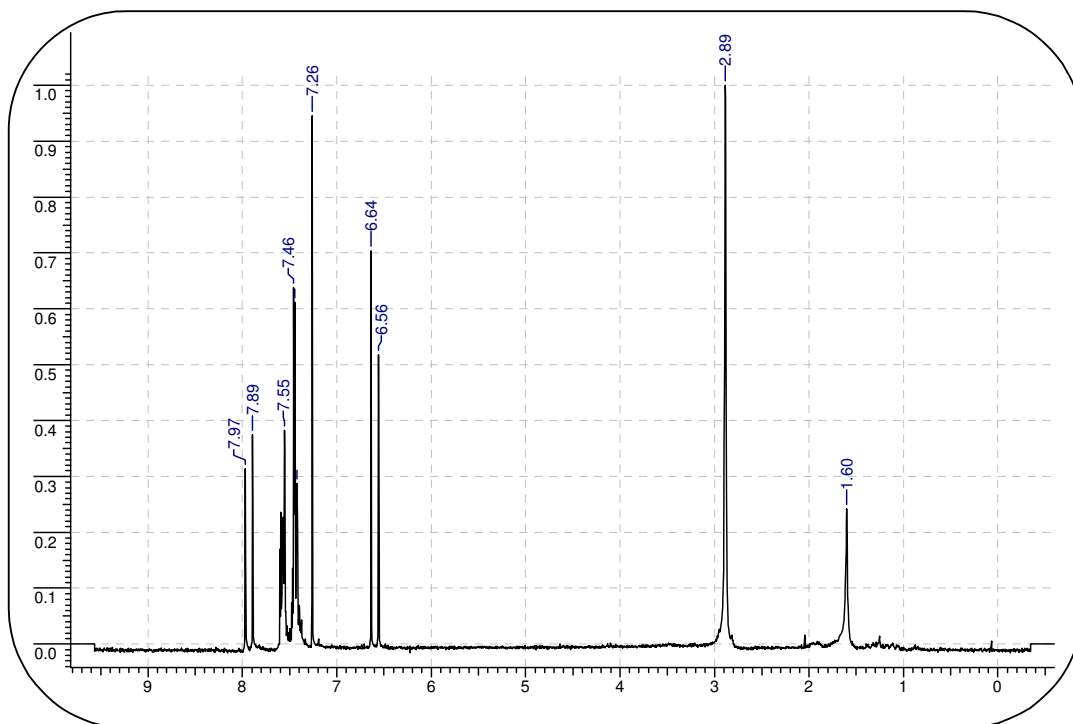


Figura 64: Espectro de RMN de ^1H do produto formado (produto I) a partir do ácido *trans*-cinâmico.

O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Figura 64, pág. 173) do produto formado (produto I) apresentou sinais em δ 6,60 (1H, *d*, $J=16\text{Hz}$) e δ 7,93 (1H, *d*, $J=16\text{Hz}$) que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2 e H-3. Os sinais entre δ 7,46 e δ 7,55 foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático. A presença do sinal em δ 2,89 (4H, *s*) foi atribuído aos hidrogênios H-3'' e H-4''.

Esses dados são indicativos de que o produto formado (produto I) é a *N*-cinamoilsuccinimida (Figura 65, pág.174).

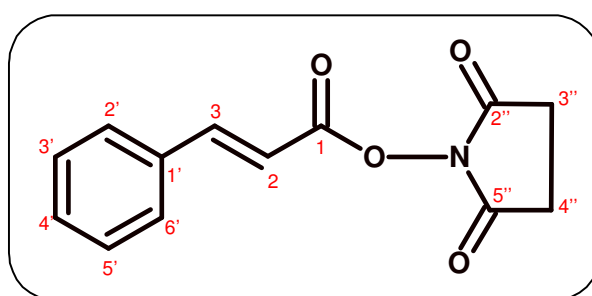


Figura 65: Estrutura da *N*-cinamoilsuccinimida.

4.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Espectro no Ultra Violeta

O produto formado (produto I) foi analisado em CLAE-DAD (item 2.1.3.3, pág. 153) para obtenção do perfil cromatográfico e do espectro no UV. O cromatograma com o espectro no UV estão apresentados na Figura 66, pág. 174.

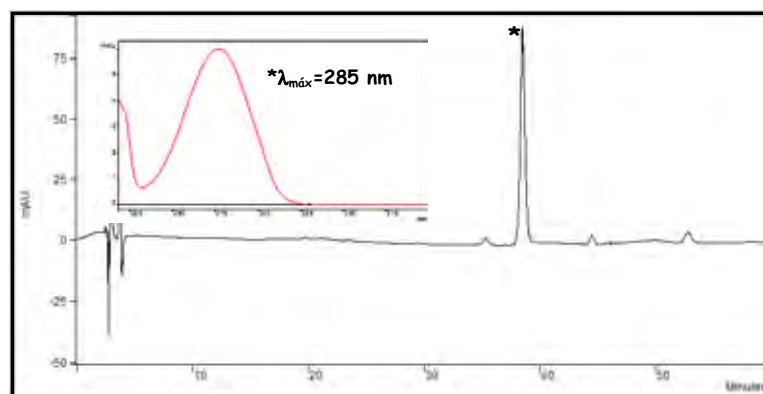


Figura 66: Cromatograma e UV da *N*-cinamoilsuccinimida.

Através da Figura 66, pág. 174, pode-se observar o cromatograma do produto (I) formado. O cromatograma apresenta um pico majoritário* que possui absorção máxima no ultravioleta em $\lambda=285\text{nm}$. Esse comprimento de onda está muito próximo do comprimento de onda encontrado na literatura $\lambda=286\text{ nm}$ (STOCKIGT; ZENK, 1975) para a *N*-cinamoilsuccinimida.

5. Espectro de Massas

Foi realizada análise do espectro de massas de alta resolução no modo positivo do produto formado (produto I) para obtenção do peso molecular do produto. O espectro de massas do produto formado (produto I) (Figura 67, pág. 176) também possibilitou a confirmação da obtenção de *N*-cinamoilsuccinimida, pois apresentou o pico do íon pseudo-molecular $m/z\ 268,0624\ [M+Na]^+$, correspondente à fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_4$.

Através desses experimentos de identificação foi possível confirmar que o produto formado (produto I) na reação síntese de *N*-cinamoilsuccinimida a partir de ácido *trans*-cinâmico trata-se da *N*-cinamoilsuccinimida.

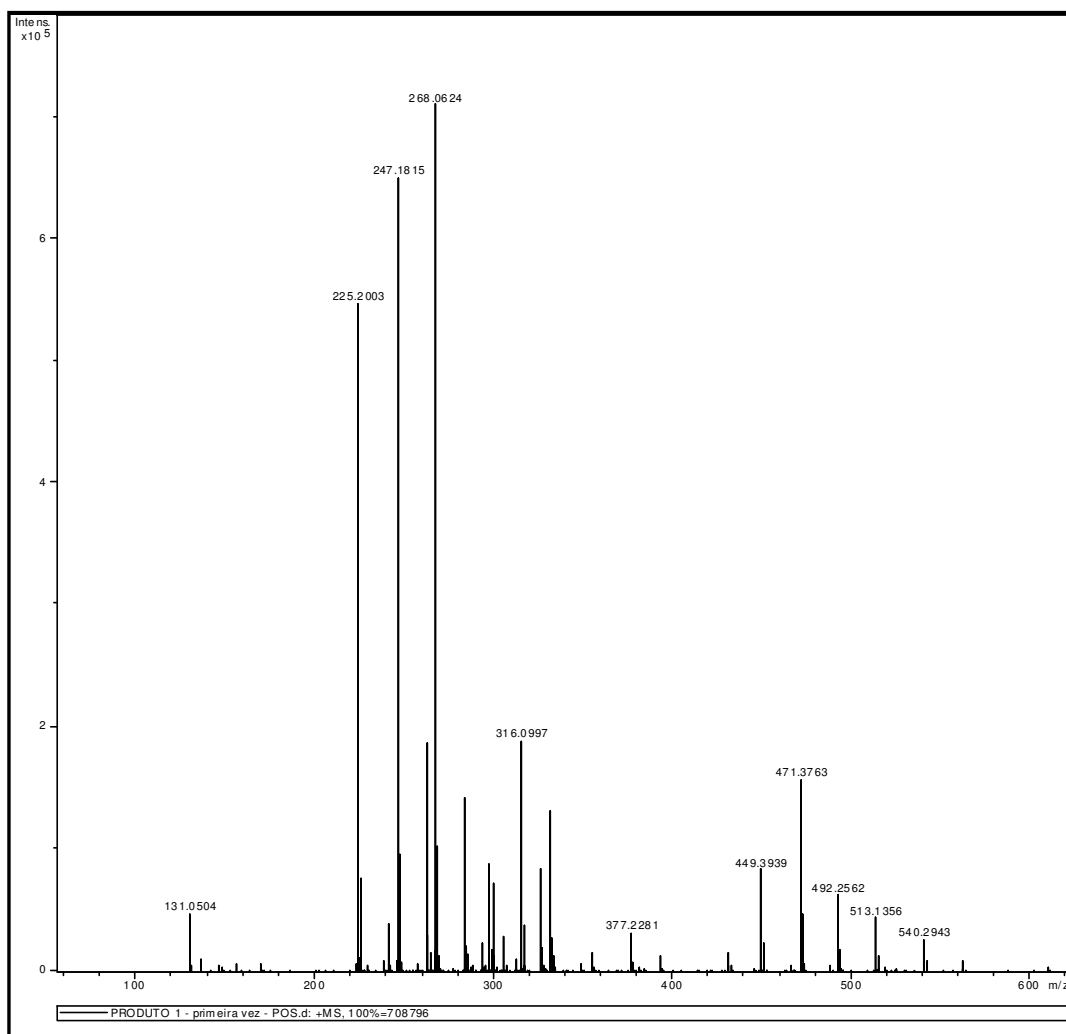


Figura 67: Espectro de massas do produto formado (produto I).

1.1.2.2 – Etapa II: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida

Foi utilizado um protocolo de síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida estabelecido por Stockigt e Zenk (1975) com pequenas modificações. Foram adicionados 15,90 mg de *N*-cinamoilsuccinimida, 10,00 mg de CoA e 10,90 mg de bicarbonato de sódio em meio aquoso. Acetona foi adicionada até formar uma única fase. Houve a formação dos produtos cinamoil SCoA e *N*-hidroxisuccinimida. Após 24 horas de reação, a fase orgânica foi evaporada formando um precipitado que foi separado por filtração. A fase aquosa foi dessalinizada com Amberlite IR120, extraída com AcOEt e liofilizada.

A massa esperada para o cinamoil SCoA (produto II) era de 11,67 mg de acordo com a estequiometria da reação (Figura 68, pág. 177).

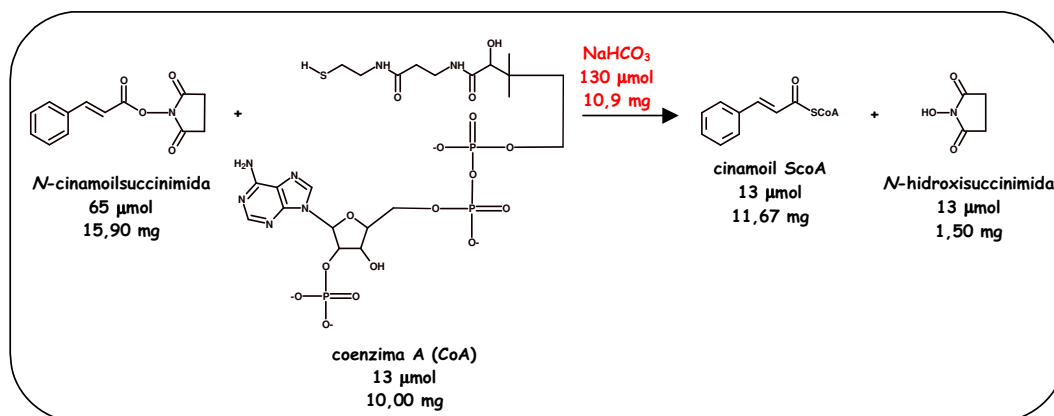


Figura 68: Síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida.

O mecanismo da reação está apresentado na Figura 69, pág. 178. O bicarbonato de sódio é a base que retira o hidrogênio ácido da coenzima A tornando-a um nucleófilo forte para atacar a carbonila da *N*-cinamoilsuccinimida numa reação de substituição nucleofílica formando o cinamoil SCoA e a *N*-hidroxissuccinimida.

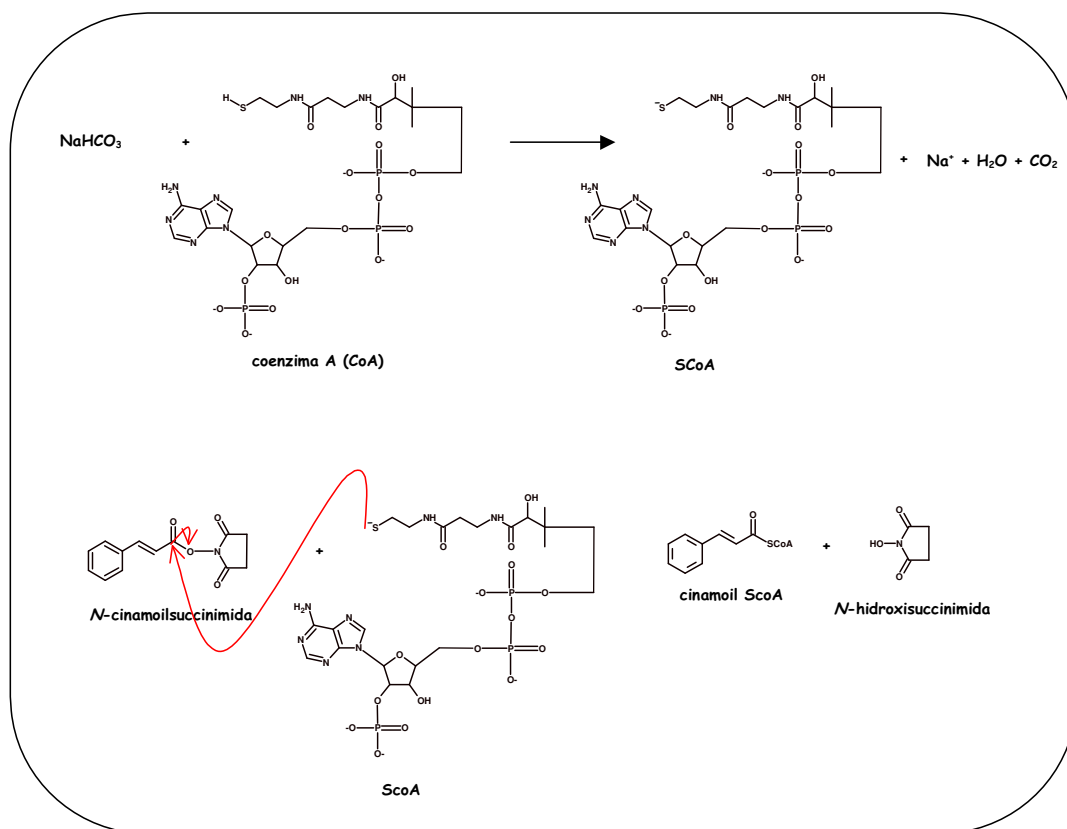


Figura 69: Mecanismo da reação de síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida.

O rendimento da reação foi de 23,0%. Embora baixo, o rendimento foi considerado bom devido ao rendimento conseguido por Stockigt e Zenk (1975) de 30 a 50%.

Experimentos foram realizados para identificação do cinamoil SCoA e os resultados estão apresentados abaixo.

1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Espectro no Ultra Violeta

O produto formado (produto II) foi analisado em CLAE-DAD (item 2.1.3.3, pág. 153) para obtenção do perfil cromatográfico e do espectro no UV. O cromatograma com o espectro no UV estão apresentados na Figura 70, pág. 179.

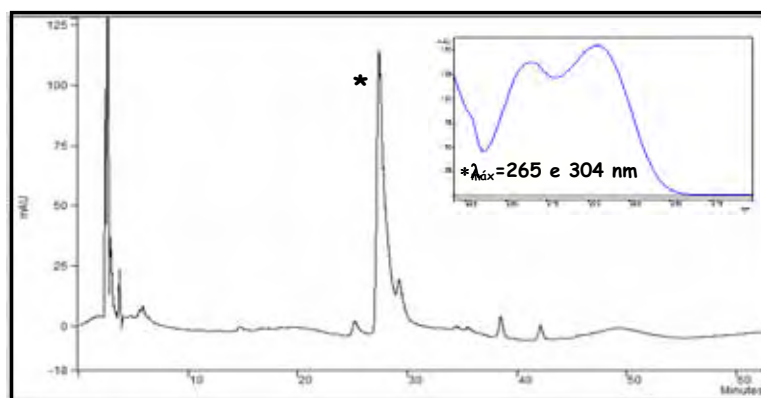


Figura 70: Cromatograma e UV do cinamoil SCoA.

Através da Figura 70, pág. 179, pode-se observar o cromatograma do produto (II) formado. O cromatograma apresenta um pico majoritário* que possui duas bandas de absorção no ultravioleta em $\lambda=265$ e 304 nm. Esses comprimentos de onda estão muito próximos dos comprimentos de onda encontrados na literatura (STOCKIGT; ZENK, 1975) para os derivados de cinamoil SCoA.

Através desse experimento de identificação foi possível confirmar que o produto formado (produto II) na reação síntese de cinamoil SCoA a partir da transesterificação da *N*-cinamoilsuccinimida trata-se do cinamoil SCoA.

1.1.3 – Determinação da Atividade da SPS

A enzima estirilpirona sintase (SPS) pode estar envolvida na biossíntese de estirilpironas (Figura 22, pág. 57). Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima estirilpirona sintase em *C. mandioccana* responsável pela produção de estirilpironas a partir de cinamoil SCoA e unidades de malonil SCoA (Figura 22, pág. 57). Um protocolo de extração enzimática e ensaio enzimático foi realizado.

Partindo da hipótese de que as estirilpironas de *C. mandioccana* apresentam diferença no número de unidades de acetato que se condensam com o cinamoil SCoA, experimentos foram realizados utilizando três concentrações do malonil SCoA. Os dois controles da reação, o produto do ensaio enzimático e os padrões de estirilpironas foram analisados conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

Nos ensaios realizados não foram observadas formações de estirilpironas. Alguns fatores desde a coleta do material vegetal até a análise do produto formado podem justificar esses resultados. A coleta das folhas de plântulas de *C. mandioccana* podem ter sido realizadas no período de menor produção de estirilpironas. A extração enzimática pode não ter sido eficiente na proporção (massa de folha e volume de tampão) selecionada. O grau de pureza e a concentração da enzima podem ter influenciado na atividade enzimática. Além disso, a diluição da amostra para análise em CLAE-DAD pode ter sido excessiva.

Para contornar essa situação, novos experimentos foram realizados com um novo modelo: *C. moschata*.

1.2 – C. moschata

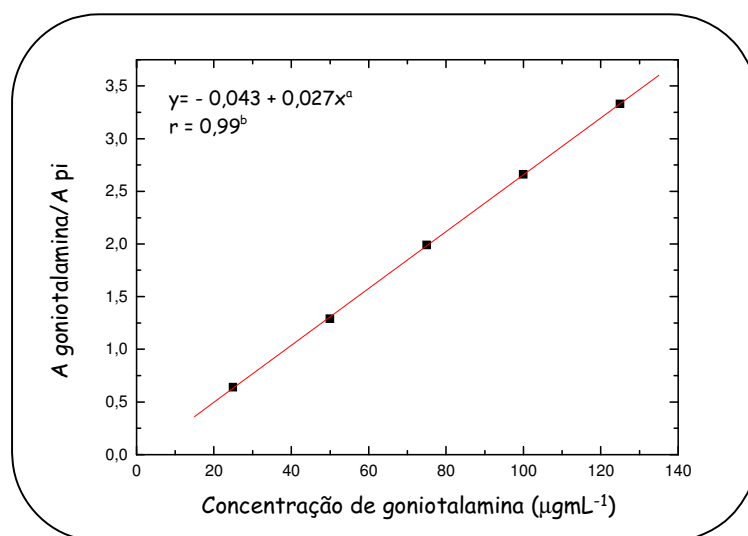
Considerando a necessidade de material vegetal em abundância e de fácil acesso para otimizar extração e ensaio enzimático na determinação da atividade da SPS, foi escolhida uma espécie modelo, já que as plântulas de *C. mandioccana* cultivadas na casa de vegetação do IQ-UNESP-Araraquara foram insuficientes para esse estudo e a coleta de material adicional tornou-se inviável pela distância. A espécie escolhida como modelo, *C. moschata*, é uma planta abundante e de fácil acesso estando localizada na cidade de Ibaté, próxima à Araraquara e tem como produto majoritário uma estirilpirona, a goniotalamina. O estudo biossintético de estirilpironas em *C. moschata* (Figura 57, pág.154) envolveu a análise circadiana de estirilpironas e a aplicação de protocolos envolvendo extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, determinação de proteínas totais e eletroforese.

1.2.1 – Análise circadiana de estirilpironas em folhas de *C. moschata*

Para garantir a coleta das folhas de *C. moschata* no período de maior produção de estirilpironas foi realizada uma análise circadiana desse metabólito e os resultados estão apresentados abaixo.

1.2.1.1 – Construção da curva analítica para quantificação de goniotalamina

A curva analítica com padronização interna, 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de desacetilcriptocarialactona, foi construída com 5 níveis de concentração na faixa de 25 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ goniotalamina (Figura 71, pág. 181) A equação de regressão encontrada foi $y = - 0,043 + 0,027x^a$ com coeficiente de correlação de $r = 0,999$ e $\text{DPR} < 5\%$.



a = equação da reta

b = coeficiente de correlação linear

Figura 71: Curva analítica para a goniotalamina na faixa de 25 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

1.2.1.2 – Quantificação de goniotalamina em folhas de *C. moschata*

Folhas de *C. moschata* coletadas para análise circadiana foram analisadas. A goniotalamina foi quantificada utilizando a equação da reta da curva analítica apresentada na Figura 71, pág. 181. Na Figura 72, pág. 182 está apresentado um gráfico de barras relacionando concentração de goniotalamina e horário da coleta.

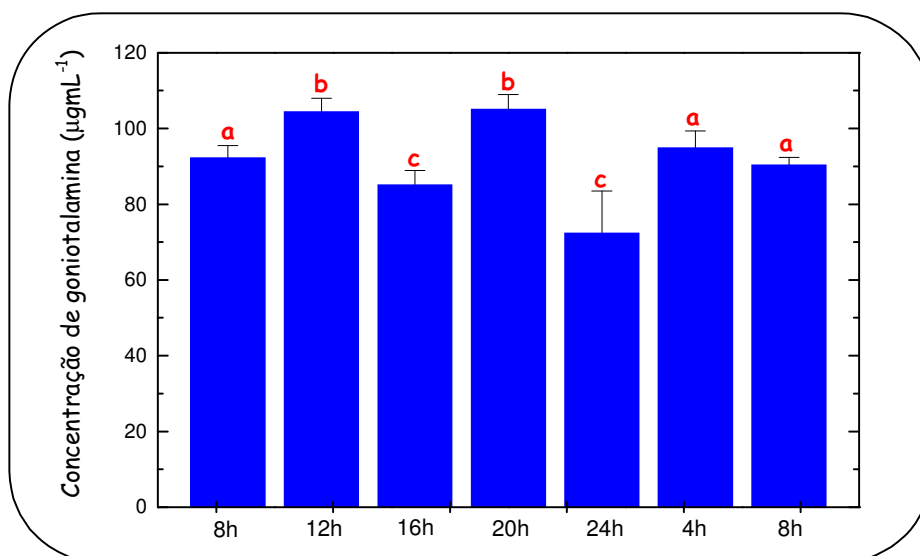


Figura 72: Gráfico de barras para concentração de goniotalamina nos horários de coleta.

A partir do teste *t* (MORGAN, 1991) aplicado para comparar os horários de coleta em relação à concentração de goniotalamina (Figura 72, pág. 182) pode-se observar que a produção de goniotalamina é estatisticamente semelhante nos horários de 4 e 8 horas (a), 12 e 20 horas (b) e 16 e 24 horas (c). No entanto, nesses horários há diferenças estatisticamente significativas na concentração desse metabólito. A maior produção de goniotalamina é encontrada às 12 e 20 horas.

Para dar continuidade aos estudos biossintéticos, utilizando *C. moschata* como modelo, uma coleta de grande quantidade de material vegetal foi realizada às 11:30, horário de sua maior produção. Esse material foi armazenado a -80°C.

1.2.2 – Aplicação de Protocolos

Experimentos foram realizados para determinar a atividade da enzima estirilpirona sintase (SPS) em *C. moschata* responsável pela produção de goniotalamina a partir de cinamoil SCoA e duas unidades de malonil SCoA (Figura 57, pág. 154). *C. moschata* foi utilizada como modelo em diversos protocolos envolvendo extração enzimática, precipitação salina, dessalinização, ensaio enzimático, determinação de proteínas totais e eletroforese com a finalidade de encontrar a atividade da enzima estirilpirona sintase. Abaixo seguem os resultados obtidos em cada protocolo.

1.2.2.1 – Protocolo I

No primeiro protocolo avaliado foram realizadas extração enzimática, precipitação salina e dessalinização. O extrato bruto, os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação depois de dessalinizados e o sobrenadante IV sem dessalinização foram submetidos ao ensaio enzimático. Os controles da reação, o produto do ensaio enzimático e o padrão de goniotalamina foram analisados conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

Apenas no ensaio enzimático realizado com o sobrenadante IV não dessalinizado houve a formação de um produto. Os cromatogramas assim como os teores de cada pico verificados com os experimentos realizados com o sobrenadante IV não dessalinizado estão apresentados na Figura 73, pág. 184. Através da Figura 73c, pág. 184, foi possível observar a formação do pico 1 produzido pela reação do extrato enzimático de folhas de *C. moschata* com os precursores cinamoil SCoA e malonil SCoA, cuja ausência dessa substância foi notada nos controles 1 e 2 da reação Figura 73a e 73b, pág. 184, respectivamente.

No entanto, o produto formado não foi o esperado, a goniotalamina, Figura 73d, pág. 184. A única informação obtida sobre o produto formado é o seu espectro no UV com absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}}=275$ nm.

Através dos experimentos realizados no protocolo I foi possível observar que houve reação apenas no ensaio realizado com o sobrenadante IV que não foi submetido à dessalinização. Esses resultados podem estar relacionados com a retenção de enzimas ou algum cofator na coluna PD-10 (Sephadex G-25), o que justifica a não formação de produto nos ensaios com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação que foram submetidos à dessalinização.

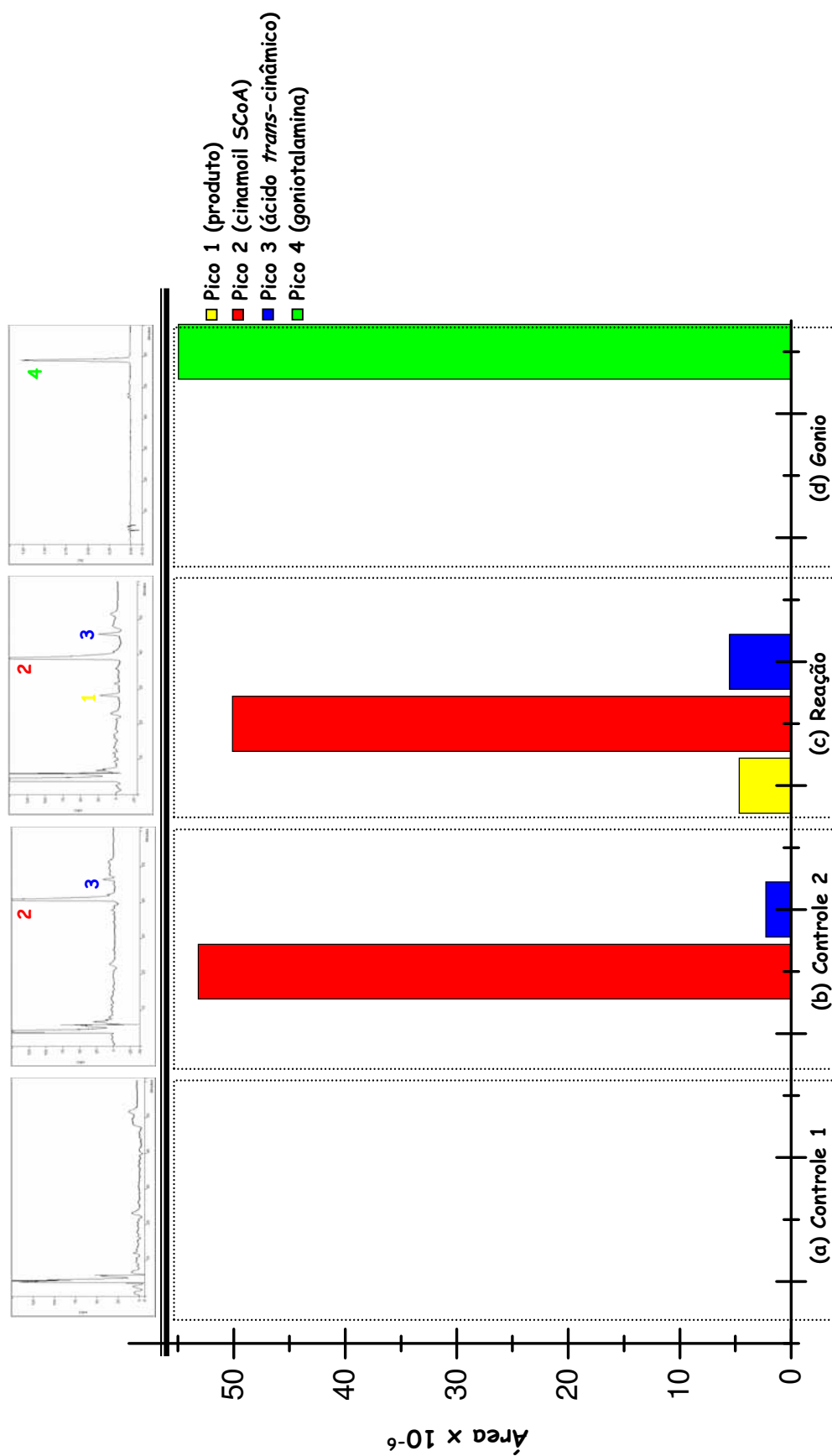


Figura 73: Cromatogramas e teores dos picos para o Snd IV no protocolo I: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

1.2.2.2 – Protocolo II

Devido aos resultados obtidos com o protocolo I, algumas alterações nos procedimentos de extração enzimática e precipitação salina foram realizadas. Um volume maior de tampão extrator foi utilizado na extração enzimática e a precipitação salina foi realizada com um volume maior de extrato enzimático. Diferentemente do protocolo I, todos os precipitados foram ressuspensos em 3,5 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8). Uma alíquota de 1,0 mL foi guardada a – 80°C e uma alíquota de 2,5 mL foi dessalinizada. Neste protocolo uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante IV também foi dessalinizada. Através desse procedimento foi possível obter amostras com 20, 40, 65 e 80% de saturação dessalinizadas (D) e não dessalinizadas (ND), amostras do sobrenadante IV dessalinizadas (D) e não dessalinizadas (ND) e avaliar a influência da coluna PD-10 (Sephadex G-25) utilizada no procedimento de dessalinização.

O extrato bruto, os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação não dessalinizados (ND) e dessalinizados (D), o sobrenadante IV não dessalinizado (ND) e dessalinizado (D) foram submetidos aos ensaios enzimáticos. Os controles da reação, o produto do ensaio enzimático e o padrão de goniotalamina foram analisados conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

Os mesmos picos 1, 2, 3 e 4 da Figura 73, pág. 184, foram monitorados nos produtos dos ensaios enzimáticos. Apenas nos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados houve a formação de um produto. Os cromatogramas assim como os teores de cada pico verificados com os experimentos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados estão apresentados nas Figuras 74 a 78, pág. 187 a 191. Através das Figuras 74b a 78b, pág. 187 a 191, foi possível observar a formação do pico 1 produzido pela reação do extrato enzimático de folhas de *C. moschata* com os precursores cinamoil SCoA e malonil SCoA, cuja ausência dessa substância foi notada nos controles 1 e 2 da reação Figura 74a a 78a e 74b a 78b, pág. 187 a 191, respectivamente.

No entanto, o produto formado não foi o esperado, a goniotalamina, Figura 74d a 78d, pág. 187 a 191. Assim como nos experimentos do protocolo I, a única

informação obtida sobre o produto formado é o seu espectro no UV com absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}}=275$ nm.

Através dos experimentos realizados no protocolo II foi possível observar que houve reação apenas nos ensaios realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram submetidos à dessalinização. Esses resultados novamente podem estar relacionados com a retenção de enzimas ou algum cofator na coluna PD-10 (Sephadex G-25), o que justifica a não formação de produto nos ensaios com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação que foram submetidos à dessalinização.

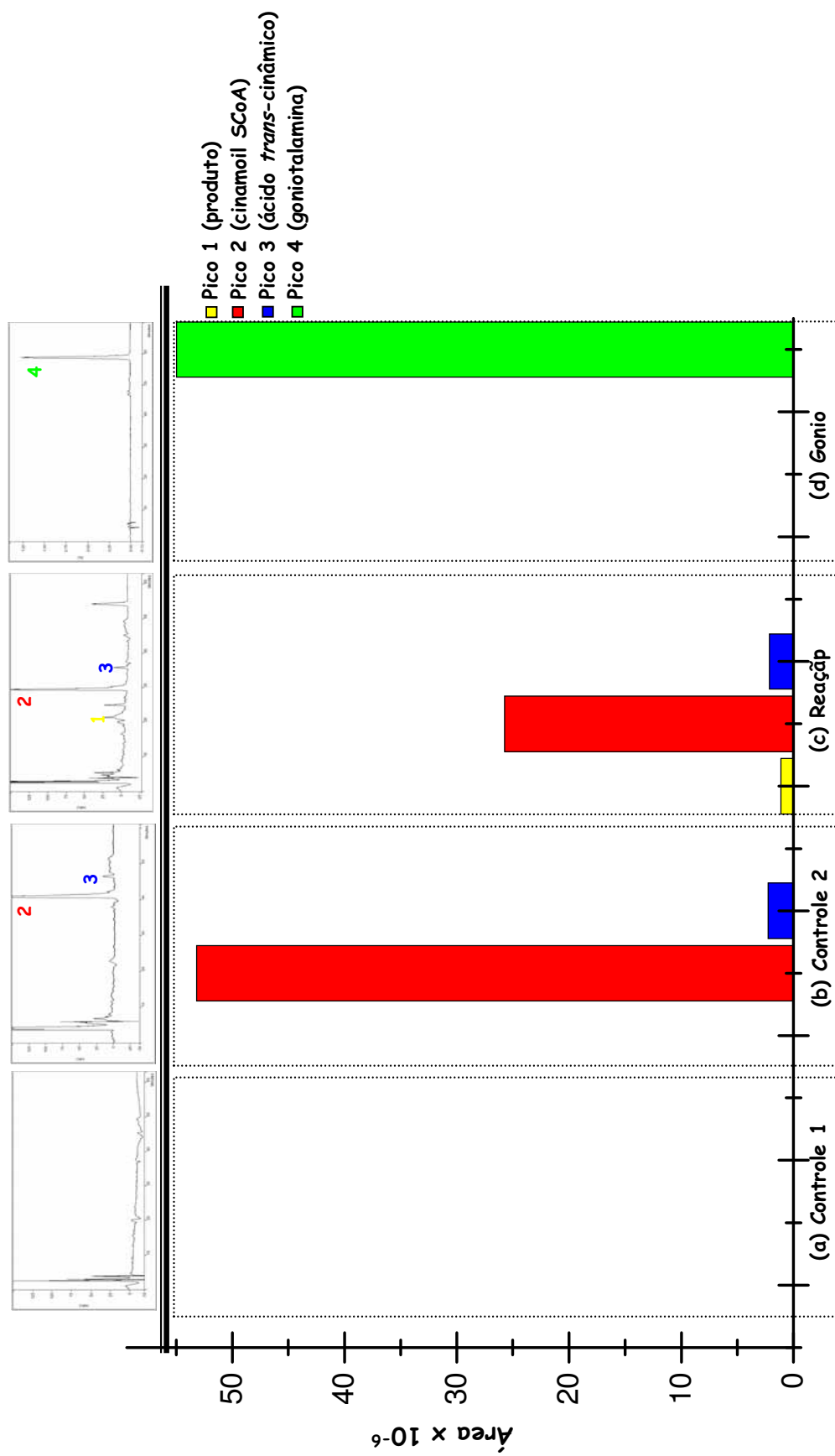


Figura 74: Cromatogramas e teores dos picos para o ppt 20% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

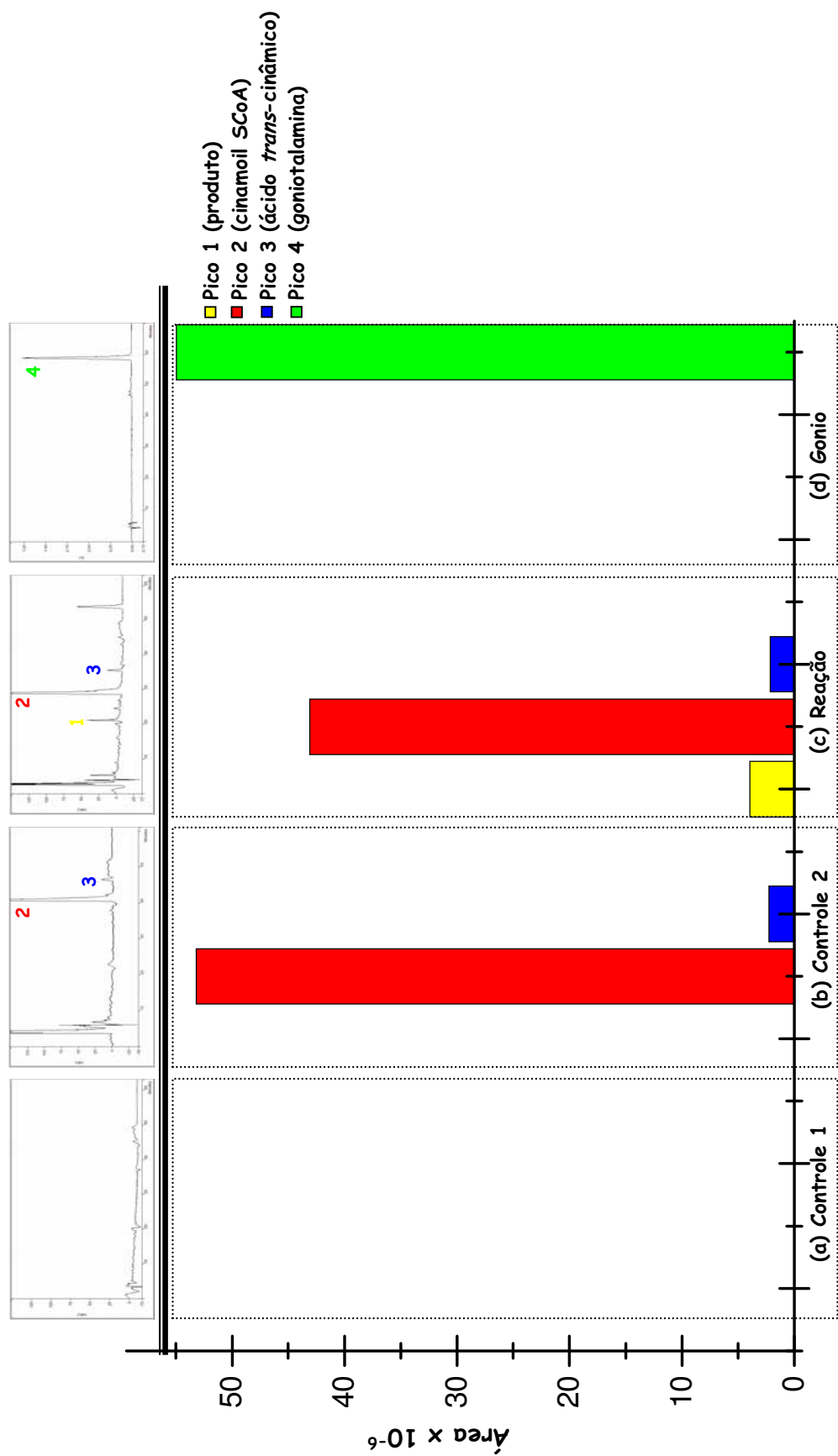


Figura 75: Cromatogramas e teores dos picos para o ppt 40% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

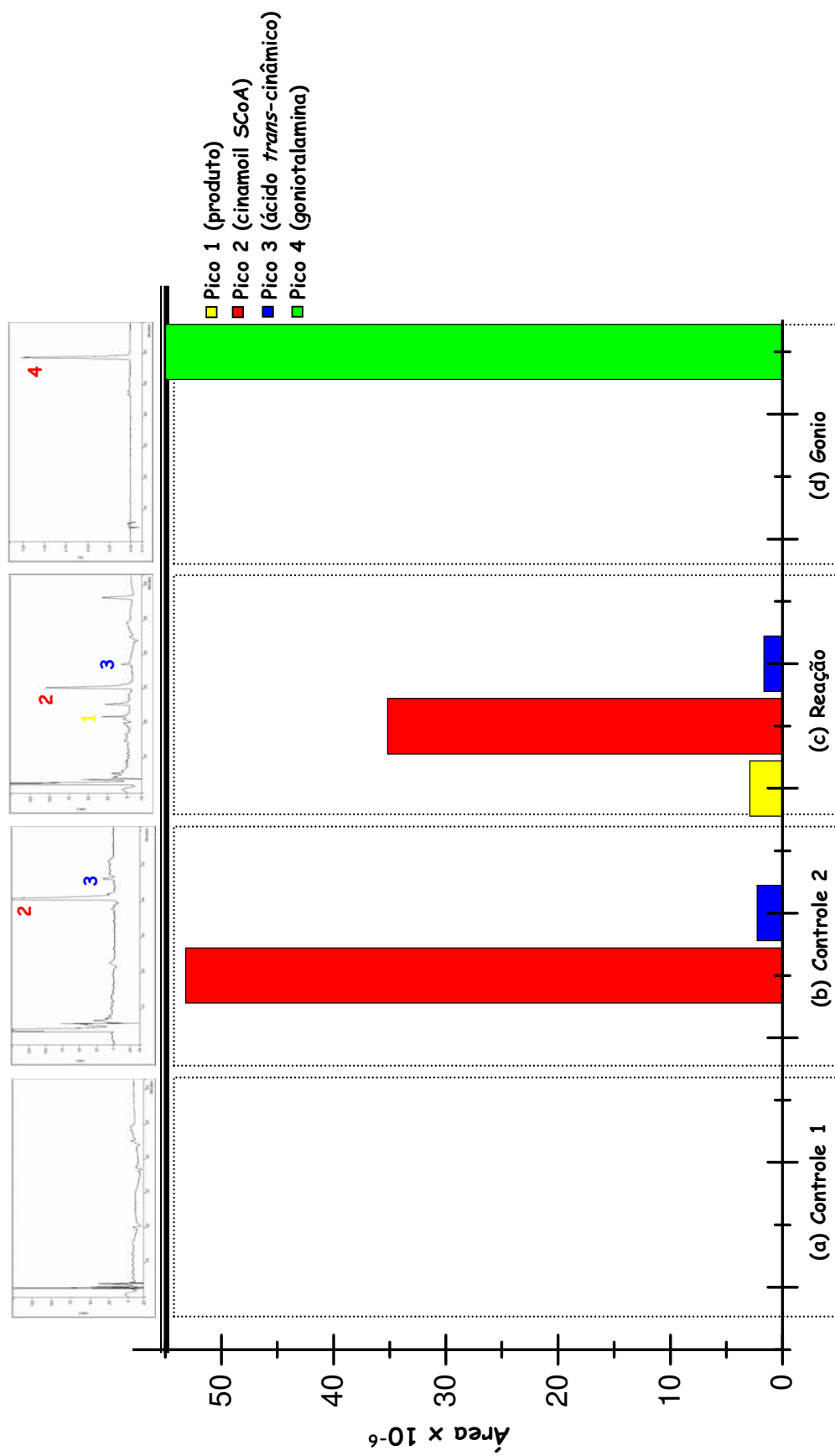


Figura 76: Cromatogramas e teores dos picos para o ppt 65% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

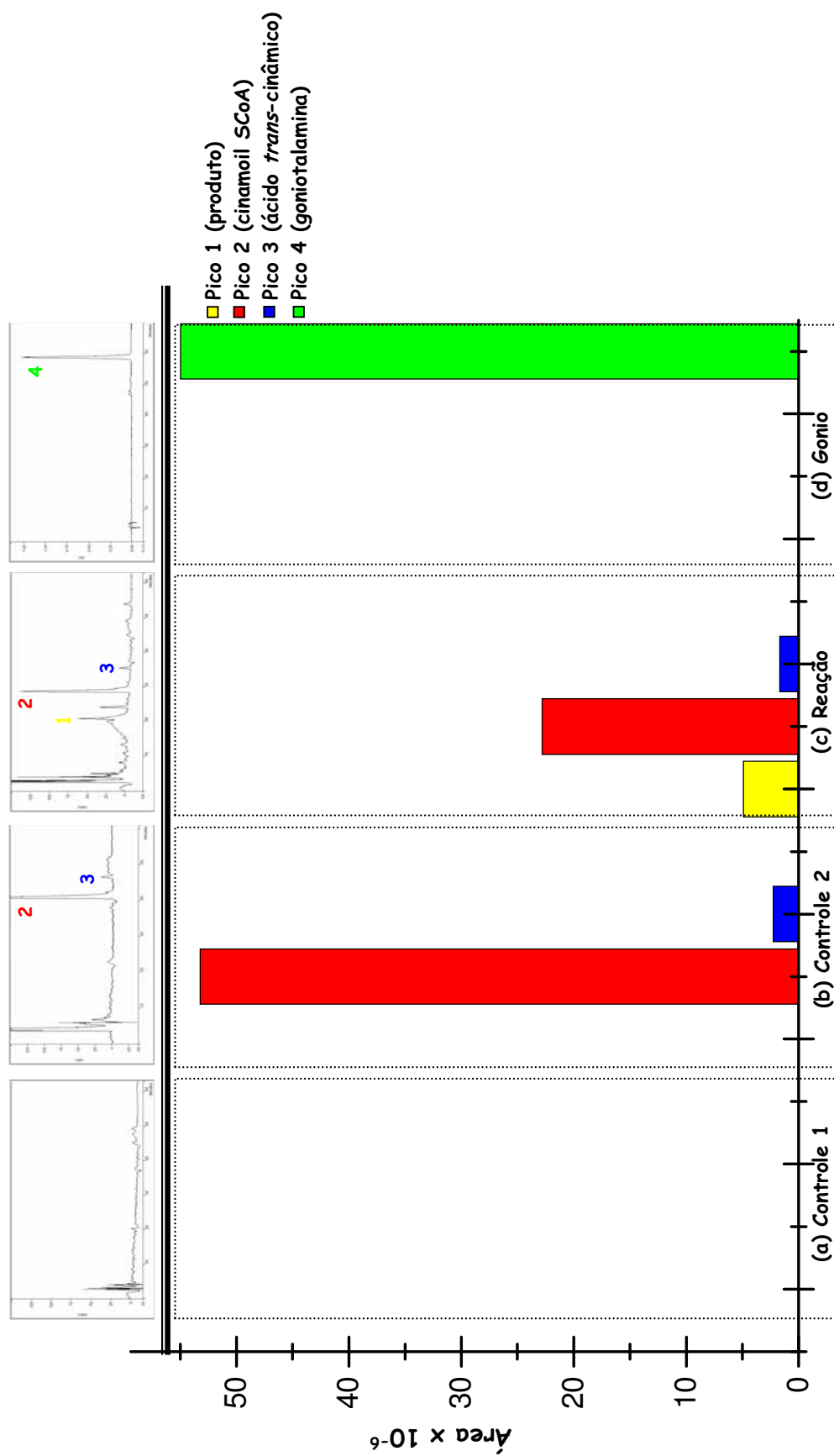


Figura 77: Cromatogramas e teores dos picos para o ppt 80% no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

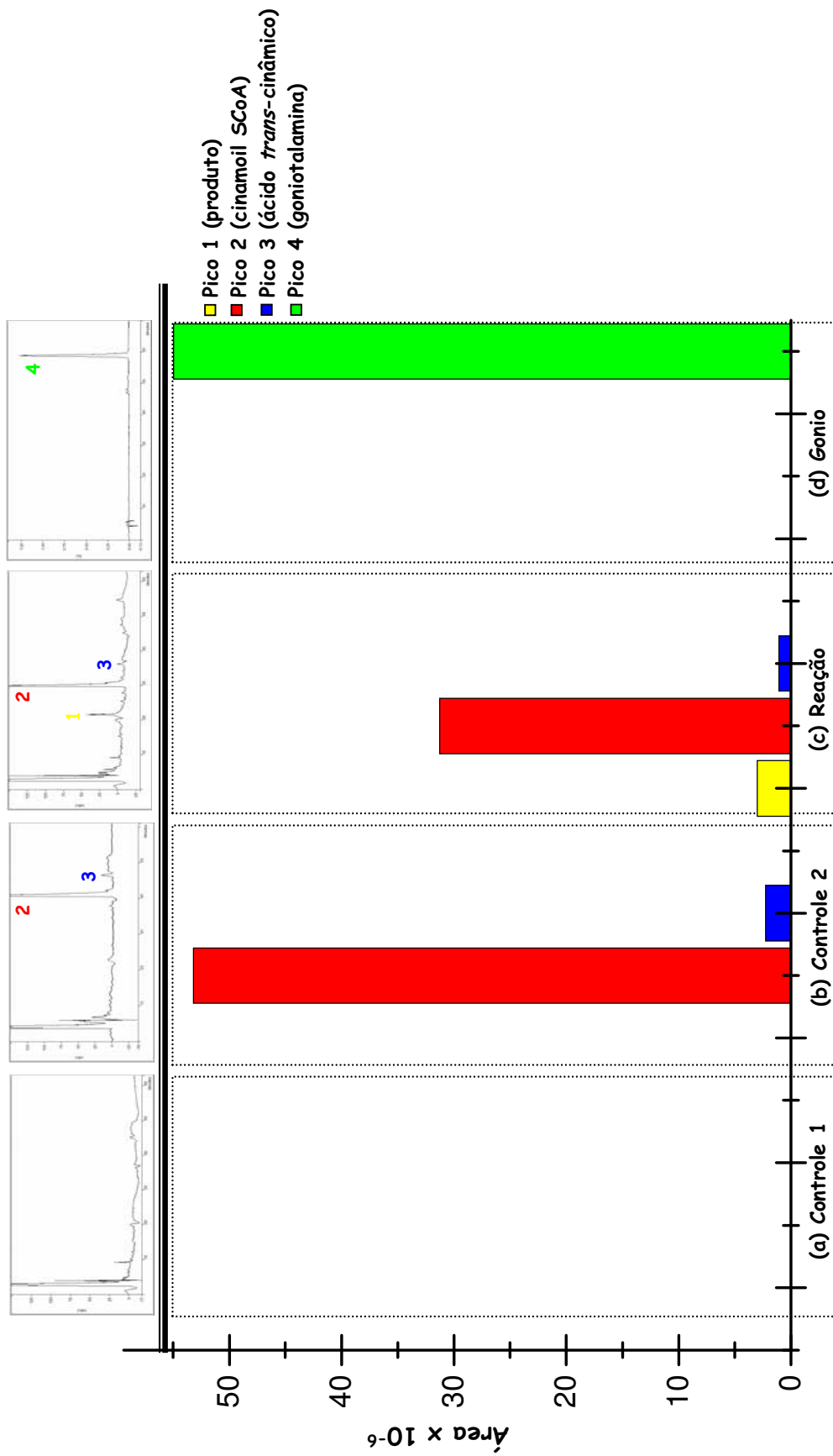


Figura 78: Cromatogramas e teores dos picos para snd IV no protocolo II: (a) – controle 1; (b) – controle 2; (c) – reação; (d) – gonio.

Através da análise das áreas do pico 1 formado nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados (Figuras 74c a 78c, pág. 187 a 191) foi possível observar que a maior formação do pico 1 foi verificada com 80% de saturação (Figura 79, pág. 192).

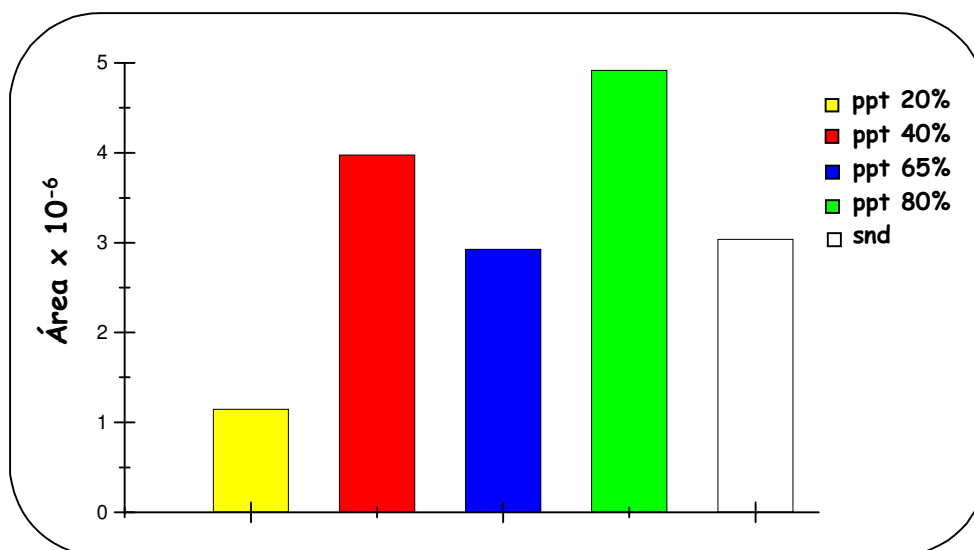


Figura 79: Teor do pico 1 nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados no protocolo II.

1.2.2.3 – Protocolo III

Devido aos resultados obtidos com o protocolo II, algumas alterações no procedimento de dessalinização foram realizadas. Assim como no protocolo I, todos os precipitados foram ressuspensos em 3,5 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=6,8). Uma alíquota de 1,0 mL foi guardada a -80°C e uma alíquota de 2,5 mL foi dessalinizada. Neste protocolo uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante IV também foi dessalinizada. Mas diferentemente do protocolo II, as amostras submetidas à dessalinização foram eluídas e coletadas em três frações F1, F2, e F3. O extrato bruto, os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação não dessalinizados (ND), suas frações F2 e F3 dessalinizadas (D), o sobrenadante IV não dessalinizado (ND) e suas frações dessalinizadas (D) foram submetidos à dosagem protéica para avaliar a retenção de enzimas na coluna PD-10 (Sephadex G-25).

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada através das equações de regressão das curvas de calibração (Figura 80, pág. 193) para albumina bovina: $y_1 = -0,021 + 0,765x$ com coeficiente de correlação de $r = 0,996$ e $y_2 = 0,146 + 0,486x$, com coeficiente de correlação de $r = 0,990$. Os resultados estão apresentados na Figura 81, pág. 193.

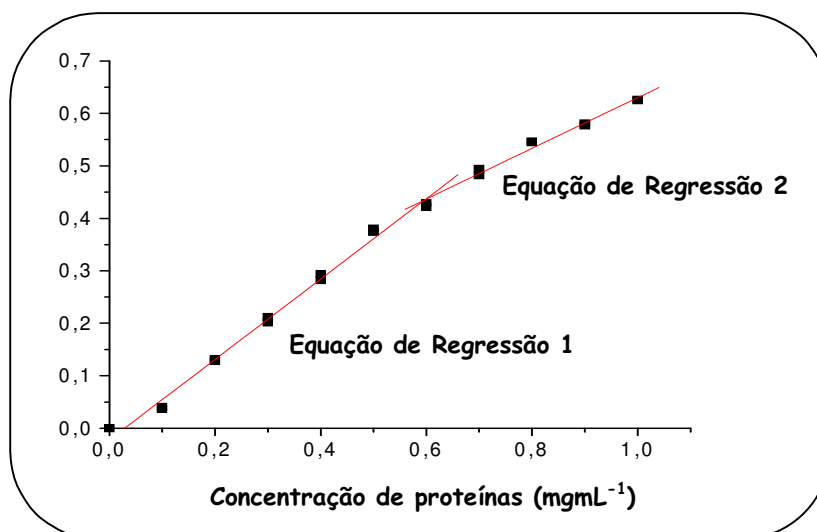


Figura 80: Curva de calibração construída para determinação de proteínas totais.

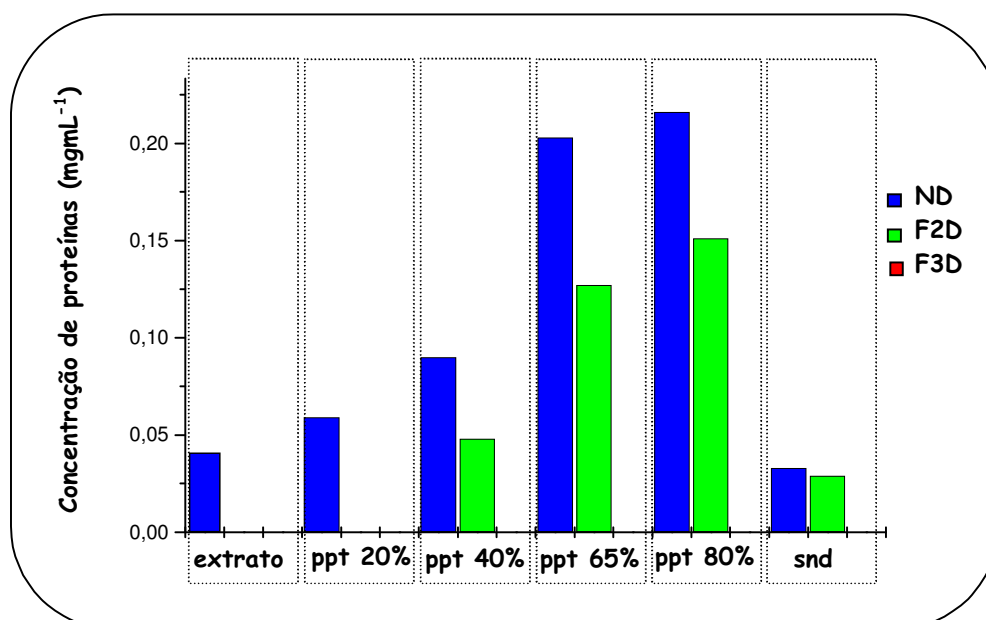


Figura 81: Concentração de proteínas totais do extrato bruto, dos precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação não dessalinizados (ND), de suas frações F2 e F3 dessalinizadas (D) do sobrenadante IV não dessalinizado (ND) e de suas frações dessalinizados (D).

Com os resultados apresentados na Figura 81, pág. 193, foi possível observar que na fração F3D coletada na dessalinização não foi observada nenhuma proteína em nenhuma amostra. Toda proteína foi eluída na fração F2D coletada na dessalinização. No entanto, a concentração de proteínas totais é muito baixa em todas as amostras, inferiores à $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$.

Com base nos resultados de dosagem protéica algumas alterações no procedimento do ensaio enzimático foram realizadas. O extrato bruto, os precipitados com 20, 40, 65 e 80% de saturação não dessalinizados (ND) e dessalinizados (D), o sobrenadante IV não dessalinizado (ND) e dessalinizado (D) foram submetidos aos ensaios enzimáticos com um volume maior de enzima ($45 \mu\text{L}$). Com o intuito de identificar o peso molecular do produto formado (pico 1) por espectrometria de massas, a interrupção da reação foi realizada com MeOH e uma partição com CHCl_3 foi conduzida na tentativa de obter o produto na fase orgânica. Esse procedimento facilitaria a análise do produto formado, já que a fase aquosa, tamponada com fosfato de potássio, danificaria o espectrômetro de massa. Na seqüência, os controles da reação, o produto do ensaio enzimático das fases aquosa e orgânica e o padrão de goniotalamina foram analisados conforme o item 2.1.3.3, pág. 153.

Assim como no protocolo I, os mesmos picos 1, 2, 3 e 4 da Figura 73, pág. 184, foram monitorados nos produtos dos ensaios enzimáticos. Novamente, apenas nos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados houve a formação de um produto na fase aquosa. Foi possível observar a formação do pico 1 produzido pela reação do extrato enzimático de folhas de *C. moschata* com os precursores cinamoil SCoA e malonil SCoA, cuja ausência dessa substância foi notada nos controles 1 e 2 da reação. No entanto, o produto formado não foi o esperado, a goniotalamina. Assim como nos experimentos dos protocolos I e II, a única informação obtida sobre o produto formado é o seu espectro no UV com absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}}=275 \text{ nm}$. Através dos experimentos realizados no protocolo III foi possível observar que nenhuma enzima fica retida na coluna PD-10 (Sephadex G-25) e que a concentração de proteínas totais é muito baixa. A não formação do produto com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV submetidos à dessalinização pode estar relacionada com a retenção de algum cofator na coluna PD-10 (Sephadex G-25). O produto formado no ensaio enzimático

não foi detectado na fase orgânica, não havendo necessidade de realizar uma partição com clorofórmio.

Através da análise das áreas do pico 1 formado nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados foi possível observar que a maior formação do pico 1 foi verificada com 65% de saturação (Figura 82, pág. 195).

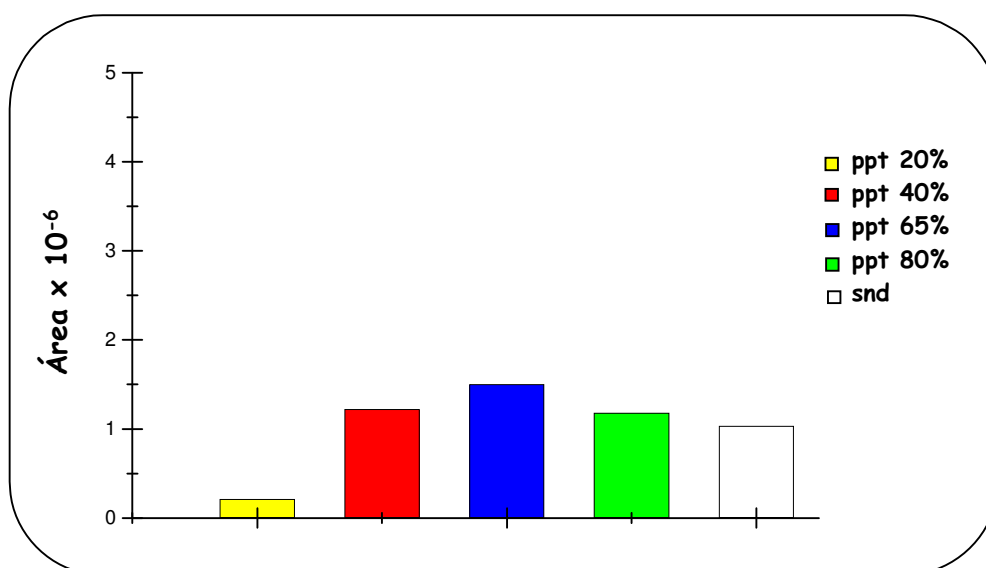


Figura 82: Teor do pico 1 nos produtos dos ensaios enzimáticos realizados com os precipitados com 20, 40, 65 e 80% saturação e o sobrenadante IV que não foram dessalinizados no protocolo II.

Para verificar o peso molecular da enzima responsável pela formação do produto (pico 1) obtido nos ensaios enzimáticos foi realizado eletroforese.

Cada precipitado (20, 40, 65 e 80% saturação) dessalinizado e o sobrenadante IV dessalinizado foram submetidos à eletroforese, (Figura 83, pág. 196).

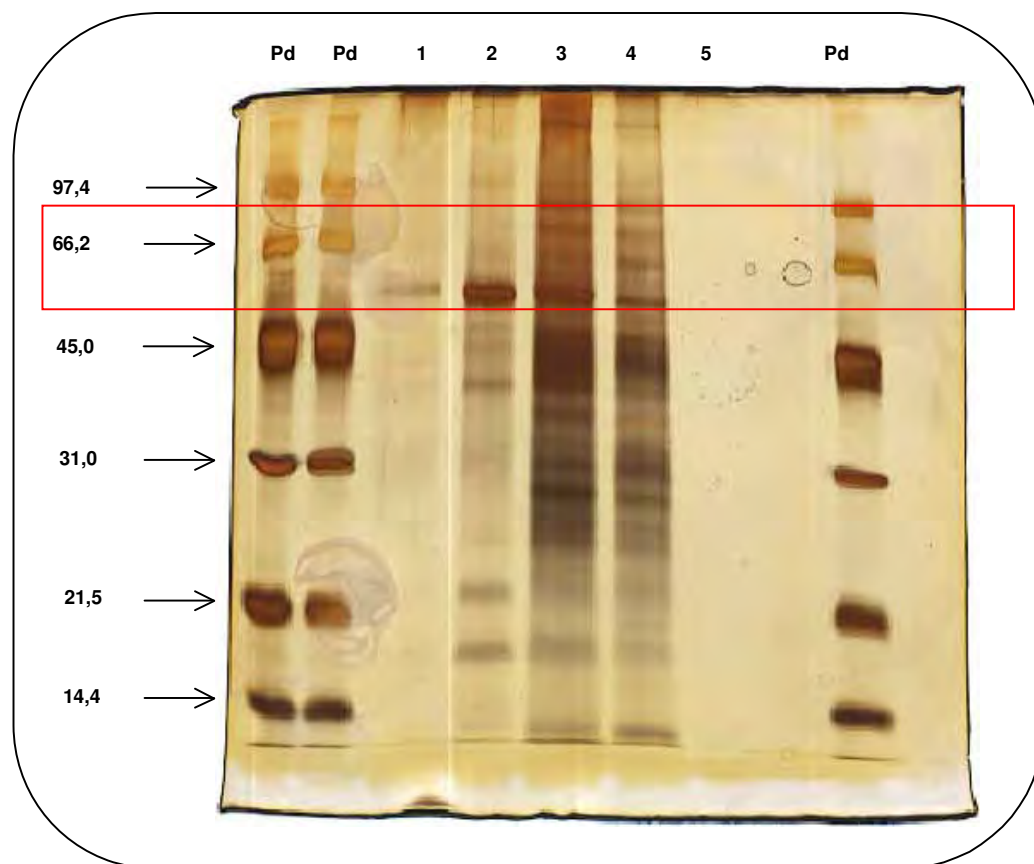


Figura 83: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Pd: padrão de proteínas, 1: precipitado com 20% de saturação (D), 2: precipitado com 40% de saturação (D), 3: precipitados com 65% de saturação (D), 4: precipitado com 80% de saturação (D), 5: sobrenadante IV (D).

Através da Figura 83, pág. 196 foram observadas bandas no intervalo de 56-77 KDa, referentes ao peso molecular da estirilpirona sintase (Beckert, et al., 1997).

Para determinar o peso molecular do produto formado no ensaio enzimático com 40% saturação a amostra foi analisada por CLAE-EM.

O cromatograma da amostra (Figura 84, pág. 197) contém um pico (*) que apresenta absorção máxima em $\lambda=275$ nm. Essa absorção é semelhante à absorção do pico formado na reação do ensaio enzimático.

Através da análise do espectro de massas de alta resolução em modo negativo da substância correspondente ao pico (*) foi possível propor a estrutura da substância formada na reação enzimática. Esse espectro de massas (Figura 85, pág. 197) apresentou o pico do íon pseudo-molecular em m/z 315,0587 $[M-H]^-$ correspondente à fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_6$ que foi tentativamente atribuída a um policetídeo formado pela condensação de uma unidade de cinamoil SCoA e quatro

unidades de malonil SCoA catalisada pela enzima SPS. Por motivos ainda desconhecidos, não ocorrem as etapas subseqüentes de redução das carbonilas e lactonização, que levariam à formação de uma estirilpirona. No entanto, as condições de análise utilizadas para CLAE-EM foram diferentes das condições de análise empregadas em CLAE-DAD dificultando análise mais conclusiva. Mas sem dúvida, há indícios muito fortes de que pelo menos as reações de condensação tenham ocorrido.

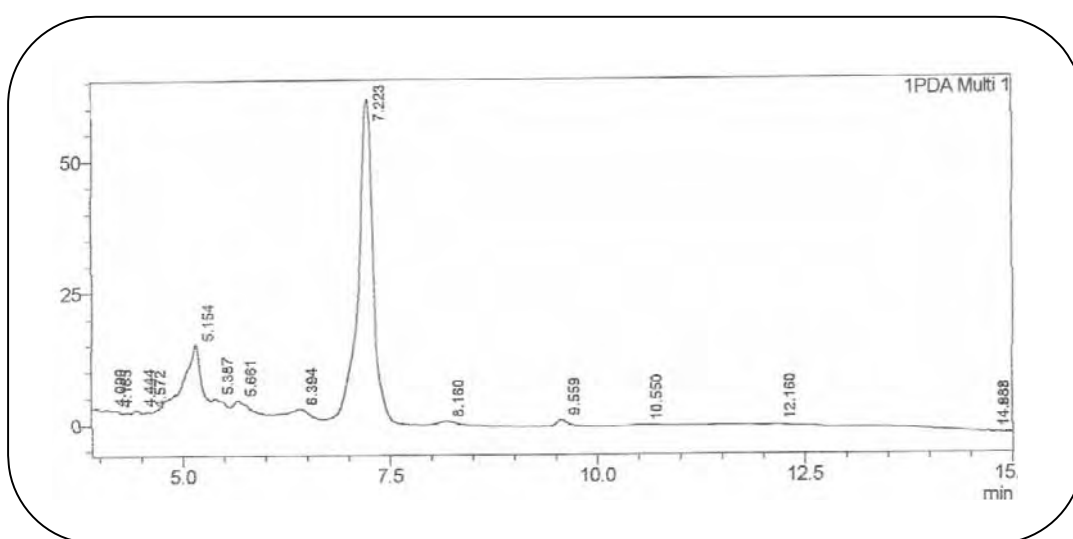


Figura 84: Cromatograma da amostra com 40% saturação.

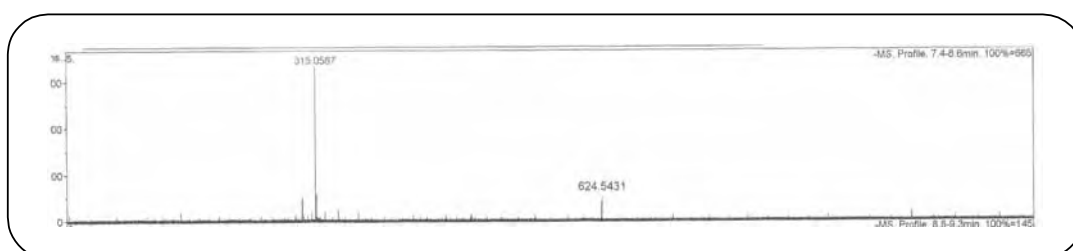


Figura 85: Espectro de massas do pico da amostra com 40% saturação.

Conclusão

CONCLUSÃO

Um método cromatográfico para análise simultânea dos principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandioccana* foi desenvolvido. As condições estabelecidas incluem fase estacionária C₈ (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e eluição no modo gradiente, utilizando fase móvel ternária composta de A (Tampão: 11,9 mM de TEA e 14,3 mM de H₃PO₄, pH = 2,0), B (MeOH) e C (ACN). Utilizando estas condições cromatográficas foi possível obter excelente resolução para alcalóides, flavonóides e estirilpironas.

Os principais metabólitos encontrados nas folhas de *C. mandioccana* foram alcalóides (menisperina e xantoplanina), flavonóides (quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*-alopiranosídeo e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo) e estirilpironas (criptomoscatona E3, criptomoscatoana D1, criptomoscatoana F1, desacetilcriptocarialactona e criptomoscatoana E1).

O método desenvolvido foi validado com base nas normas da ANVISA e os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e estabilidade estiveram dentro dos critérios de aceitação.

Esse método foi utilizado para comparar o perfil metabólico dos órgãos de indivíduos dos quimiotipos F e FS.

Na comparação do perfil de brotos, folhas novas e folhas velhas dos dois quimiotipos foi observado o acúmulo de alcalóides e flavonóides nas folhas velhas, e de substâncias, ainda não identificadas, nos brotos. Estirilpironas foram observadas nas folhas novas do quimiotipo FS e no mesmo órgão do quimiotipo F foi detectada a presença de substâncias ainda não identificadas. Na comparação do perfil de folhas, galhos, cascas do tronco e raízes dos dois quimiotipos foi observado o acúmulo de alcalóides nas cascas do tronco e raízes, e de flavonóides nas folhas. Estirilpironas foram observadas nas folhas e em baixas concentrações nos galhos e raízes do quimiotipo FS.

Experimentos biossintéticos realizados com folhas de plântulas de *C. mandioccana* confirmaram a atividade da enzima PAL, que converteu *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. No entanto, nas condições experimentais utilizadas para

avaliar a atividade da enzima SPS em folhas das mesmas plântulas não foi detectada a formação de estilipironas. Por outro lado, em experimentos de incorporação de precursores utilizando extratos enzimáticos de folhas de *C. moschata* foi detectado a formação de uma substância que apresentou absorção máxima no UV em $\lambda = 275$ nm e um íon pseudo-molecular em m/z 315,0587 [M-H]⁻, atribuído a um policetídeo, de fórmula molecular C₁₇H₁₆O₆, possivelmente formado pela condensação de uma unidade de cinamoil SCoA e quatro unidades de malonil SCoA.

Através desse estudo pode-se concluir que estilipironas estão significativamente presentes em folhas de *C. mandioccana*, sendo portanto, o órgão mais indicado para realizar os estudos biossintéticos desse metabólito. Para a determinação da atividade da SPS é necessário otimizar condições de extração e reação enzimática inclusive avaliar a presença de SPS na fração microsomal.

Referências
Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 ago. 2006.

AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. The chalcona synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 79-110, 2003.

AUSTIN, M. B.; BOWMAN, M. E.; FERRE, J.; SCHRODER, J.; NOEL, P. P. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 1179-1194, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Quando as coisas funcionam normalmente. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001a. Cap. 2, p. 9-82.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como construir modelos empíricos. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001b. Cap. 5, p. 201-250.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Andando na superfície de resposta. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001c. Cap. 6, p. 251-300.

BASTOS, W. L. **Variabilidade intraespecífica de flavonóides glicosilados e estilpironas em folhas de *Cryptocarya aschersoniana* (Mez)**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BECKERT, C.; HORN, C.; SCHNITZLER, J.; LEHNING, A.; HELLER, W.; VEIT, M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 275-283, 1997.

BERGAMO, D. C. B. **Avaliação química dos componentes não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcatecol em *Potomorphe umbeleata* (Piperaceae)**. 2003. 146 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BORTHAKUR, N.; MAHANTA, P. K.; RASTOGI, R. C. Alkaloids and olefinic acids from *Cryptocarya amygdalina*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 501-504, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M. 6-[ω -arylalkenyl]-5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 53, p. 811-819, 2000.

CHIA, Y.; CHEN, K.; CHANG, Y.; TENG, C.; WU, Y. Antiplatelet actions of aporphinoids from Formosan plants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 3295-3300, 1999.

DEUTSCHER, M. P. Maintaining protein stability. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**: guide to protein purification. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 8, p. 83-89.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. Chichester: John Wiley & Sons, 1997a. Cap. 4, p. 109-149.

DEWICK, P. M. Alkaloids. In: _____. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. Chichester: John Wiley & Sons, 1997b. Cap. 6, p. 295-320.

DREWES, S. E.; SEHLAPELO, B. M.; HORN, M. M.; SCOTT-SHAW, R.; SANDOR, P. 5,6-dihydro- α -pyrones and two bicyclic tetrahydro- α -pyrone derivatives from *Cryptocarya latifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1427-1430, 1995.

DREWES, S. E.; HORN, M. M.; WIJEWARDENE, C. S. α -pyrone from *Cryptocarya latifolia* – a structural isomer of umuravumbolide. **Phytochemistry**, v. 41, p. 333-334, 1996.

DUMONTET, V.; GASPARD, C.; HUNG, N. V.; FAHY, J.; TCHERTANOV, L.; SÉVENET, T.; GUÉRITTE, F. New cytotoxic flavonóides from *Cryptocarya infectoria*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 6189-6196, 2001.

DUMONTET, V.; HUNG, N. V.; ADELIN, M.; RICHE, C.; CHIARONI, A.; SÉVENET, T.; GUÉRITTE, F. Cytotoxic flavonoids and α -pyrones from *Cryptocarya obovata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 858-862, 2004.

DWUMA-BADU, D.; AYIM, J. S. K.; WITHERS, S. F.; AGYEMANG, N. O.; ATEYA, A. M.; EL-AZIZI, M. M.; KNAPP, J. E.; SLATKIN, D. J.; SCHIFF, P. L. Jr. Constituents of west African medicinal plants. XXVII: Alkaloids of *Rhigiocarya racemifera* and *Stephania dinklagei*. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 123-129, 1980.

ECOBIOLOGICS LIMITED (Australia). P. W. Reddell.; V. A. Gordon. **Derivative preparation and biological activity screening of spiroketals isolated from *Litsea*, *Cinnamomum* and *Cryptocarya***. AU 2005-907277, 22 Dec. 2006, 28 June 2007.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**: guide to protein purification. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 22, p. 285-300.

FERRER, J.; JEZ, J. M.; BOWMAN, M. E.; DIXON, R. A.; NOEL, J. P. Structure of chalcona synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. **Nature Structural Biology**, v. 6, p. 775-784, 1999.

FU, X.; SÉVENET, T.; REMY, F.; PAIS, M.; HAMID, A.; HADI, A.; ZENG, L. M. Flavanone and chalcone derivatives from *Cryptocarya kurzii*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1153-1163, 1993a.

FU, X.; SÉVENET, T.; HAMID, A.; HADI, A.; REMY, F.; PAIS, M. Kurzilactone from *Cryptocarya kurzii*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1272-1274, 1993b.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas e planejamento de análise de experimentos na melhoria da qualidade de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GEGENHEIMER, P. Preparation of extracts and subcellular fractionation. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**: guide to protein purification. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 14, p. 174-193.

HERDERICH, M.; BECKERT, C.; VEIT, M. Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L. by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 194-197, 1997.

ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; PÉREZ, E. G.; SLATER, E. Y.; BERMÚDEZ, I.; CASSELS, B. K. Aporphine metho salts as neuronal nicotinic acetylcholine receptor blockers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3368-3372, 2007.

JANTAN, I.; RAWEH, S. M.; YASIN, Y. H. M.; MURAD, S. Antiplatelet activity of aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans* Blume. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 493-496, 2006.

JEZ, J. M.; AUSTIN, M. B.; FERRER, J.; BOWMAN, M. E.; SCHRODER, J.; NOEL, J. P. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 919-930, 2000a.

JEZ, J. M.; FERRER, J.; BOWMAN, M. E.; DIXON, R. A.; NOEL, J. P. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. **Biochemistry**, v. 39, p. 890-902, 2000b.

JEZ, J. M.; BOWMAN, M. E.; NOEL, J. P. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering started molecule specificity. **Biochemistry**, v. 99, p. 5319-5324, 2002.

JULIAWATY, L. D.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; ACHMAD, S. A.; AIMI, N. A 6-substituted-5,6-dihydro-2-pyrone from *Cryptocarya strictifolia*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 989-993, 2000.

KASHIWADA, Y.; AOSHIMA, A.; IKESHIRO, Y.; CHEN, Y.; FURUKAWA, H.; ITOIGAWA, M.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; COSENTINO, L. M.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 443-448, 2005.

LEE, A. T. C.; AZIMAHTOL, H. L. P.; TAN, A. N. Styrypyrone derivative (SPD) induces apoptosis in a caspase-7-dependent manner in the human breast cancer cell line MCF-7. **Cancer Cell International**, v. 3, p. 1-8, 2003.

LEE, S.; LIU, Y.; CHEN, C. Neocaryachine, a new pavine alkaloid from *Cryptocarya chinensis*, and NMR spectral properties of related alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1267-1271, 1990.

LEE, S.; LIN, Y.; CHEN, C.; LIU, K. C. S.; CHEN, C. Quaternary alkaloids from *Litsea cubeba* and *Cryptocarya konishii*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1971-1976, 1993a.

LEE, S.; CHEN, C.; LIU, Y. Additional alkaloids from *Cryptocarya chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 227-232, 1993b.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Uma introdução às proteínas. In: _____. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. Cap. 6, p. 99-117.

LIN, F.; WU, P.; WU, T. Alkaloids from the leaves of *Cryptocarya chinensis* Hemsl. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 1292-1294, 2001.

LIN, F.; WANG, J.; WU, T. New pavine *N*-oxide alkaloids from the stem bark of *Cryptocarya chinensis* Hemsl. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 157-159, 2002.

LOTTE CONFECTIONERY CO., LTD. (S. Korea). I. B. Kwon.; J. H. Kim. ***Cryptocarya aromatica* extract having antibacterial activity**. KR 2000066367, 15 Apr. 1999, 15 Nov. 2000.

MANTOVANI, S. M. **Perfil fitoquímico de frutos e de plântulas de *Cryptocarya moschata* germinadas em condições de luz e substratos controlados**. 2004. 74 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MARSAIOLI, A. J.; REIS, F. A. M.; MAGALHÃES, A. F.; RÚVEDA, E. A.; KUCK, A. ¹³C NMR analysis of aporphine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 18, p. 165-169, 1979.

MILLAR, N. S.; DENHOLM, I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, p. 53-66, 2007.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORAES, P. L. R. Lectotypification of names of Brazilian species of *Cryptocarya* (Lauraceae). **Taxon**, v. 54, p. 789-795, 2005.

MORAES, P. L. R.; NEHME, C. J.; ALVES, M. C.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; CAVALHEIRO, A. J. Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 233-244, 2007.

MORGAN, E. **Chemometrics**: experimental design. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 4-9.

NEHME, C. J. **Estudo da dinâmica circadiana e sazonal e da variabilidade populacional dos metabólitos secundários polares das folhas de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae)**. 2001. 113 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

NEHME, C. J.; MORAES, P. L. R.; CAVALHEIRO, A. J. Intrapopulational variability of styrylpyrones in leaves of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from Carlos Botelho State Park. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 613-616, 2002.

NEHME, C. J.; BASTOS, W. L.; ARAÚJO, A. J.; CAVALHEIRO, A. J. An HPLC-PAD method to analyse flavonoid glycosides and styrylpyrones from *Cryptocarya* species (Lauraceae). **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 93-97, 2005.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P. B. C.; JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopiya parviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 939-944, 2004.

OREAL S. A. (França). P. Darmenton. ***Cryptocarya extract and its use as antimicrobial agent in dermatological or cosmetic compositions***. FR 2789897, 18 Feb. 1999, 25 Aug. 2000.

PASCOLI, I. C. **Estudo fitoquímico dos frutos de *C. moschata* (Nees et Mart.) Mez. (Lauraceae)**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

POHL, T. Concentration of proteins and removal of solutes. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**: guide to protein purification. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 7, p. 68-83.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.;

PROCÓPIO, L. C. **Flora da reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. p. 150-179.

RICARDO, M. A. G.; ANDREO, M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya ashersoniana* seedlings. **Arkivoc**, v. 6, p. 127-136, 2004.

SAAD, J. M.; SOEPADAMO, E.; FANG, X. P.; McLAUGHLIN, J. L.; FANWICK, P. E. (-)-Grandisin from *Cryptocarya crassinervia*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1681-1683, 1991.

SAIDI, N.; MUKHTAR, M. R.; AWANG, K.; HAMID, A.; HADI, A.; NG, S. W. 6,7,8-Trimethoxycoumarin from *Cryptocarya bracteolata*. **Acta Crystallographica Section E**, v. 63, p. 3692-3693, 2007.

SCHRODER, J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 373-378, 1997.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 285-295, 2003.

SILVA, R. V. **Estudo químico e biossintético em *Piper arboreum* Aublet (Piperaceae)**. 2004. 275 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKILAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 714-720.

SNYDER, L. R.; KIRKILAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Ionic samples: reversed-phase, ion-pair, and ion-exchange HPLC. In: _____. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. Cap. 7, p. 292-349.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic chemistry**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. p. 841.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millenium review. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 380-416, 2001.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, p. 173-182, 2005.

STOCKIGT, J.; ZENK, M. H. Chemical syntheses and properties of hidroxicinnamoyl-coenzyme A derivatives. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 30c, p. 352-358, 1975.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. Buffers: principles and practice. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology: guide to protein purification**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 4, p. 24-38.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology: guide to protein purification**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 6, p. 50-68.

TAQUEDA, M. E. S.; COSTA, C. M. L.; FARIA, L. J. G. Planejamento e análise estatística de experimentos aplicados ao beneficiamento de produtos naturais. In: COSTA, C. M. L.; FARIA, L. J. G. (Coor.). **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA, 1998. p. 205-219.

TELASCREA, M. **Busca de substâncias antitumorais e antifúngicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *Cryptocarya mandioccana* e *Cryptocarya moschata* (Lauraceae)**. 2006. 236 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TORIBIO, A.; BONFILS, A.; DELANNAY, E.; PROST, E.; HARAKAT, D.; HENON, E.; RICHARD, B.; LITAUDON, M.; NUZILLARD, J.; RENAULT, J. Novel *seco*-dibenzopyrrocoline alkaloid from *Cryptocarya oubatchensis*. **Organic Letters**, v. 8, p. 3825-3828, 2006.

VEIT, M.; BECKERT, C.; HOHNE, C.; BAUER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 881-891, 1995.

WU, T.; LIN, F. Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1404-1407, 2001.

ZHANG, A.; ZHANG, Y.; BRANFMAN, A. R.; BALDESSARINI, R. J.; NEUMEYER, J. L. Advances in development of dopaminergic aporphinoids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 171-181, 2007.

ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; WANG, K. Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 408-413, 2006.

Anexos

Lista de Anexos

Anexo 1: Valores de F no nível de 95% de confiança.....	214
Anexo 2: Valores de t com v graus de liberdade.....	215
Anexo 3: Espectro de RMN de ^1H da substância 1.....	216
Anexo 4: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1.....	217
Anexo 5: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em δ 2,88.....	218
Anexo 6: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em δ 3,36.....	219
Anexo 7: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em δ 4,44.....	220
Anexo 8: Ampliação 1 do espectro de HMQC da substância 1.....	221
Anexo 9: Ampliação 2 do espectro de HMQC da substância 1.....	222
Anexo 10: Espectro de COSY da substância 1.....	223
Anexo 11: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.....	224
Anexo 12: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.....	225
Anexo 13: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.....	226
Anexo 14: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,97.....	227
Anexo 15: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,90.....	228
Anexo 16: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,95.....	229
Anexo 17: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,06.....	230
Anexo 18: Espectro de RMN de ^1H da substância 2.....	231
Anexo 19: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H da substância 2.....	232
Anexo 20: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H da substância 2.....	233
Anexo 21: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 2,96.....	234
Anexo 22: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 3,25.....	235
Anexo 23: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 4,58.....	236
Anexo 24: Espectro de HMQC da substância 2.....	237
Anexo 25: Espectro de COSY da substância 2.....	238
Anexo 26: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.....	239
Anexo 27: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.....	240

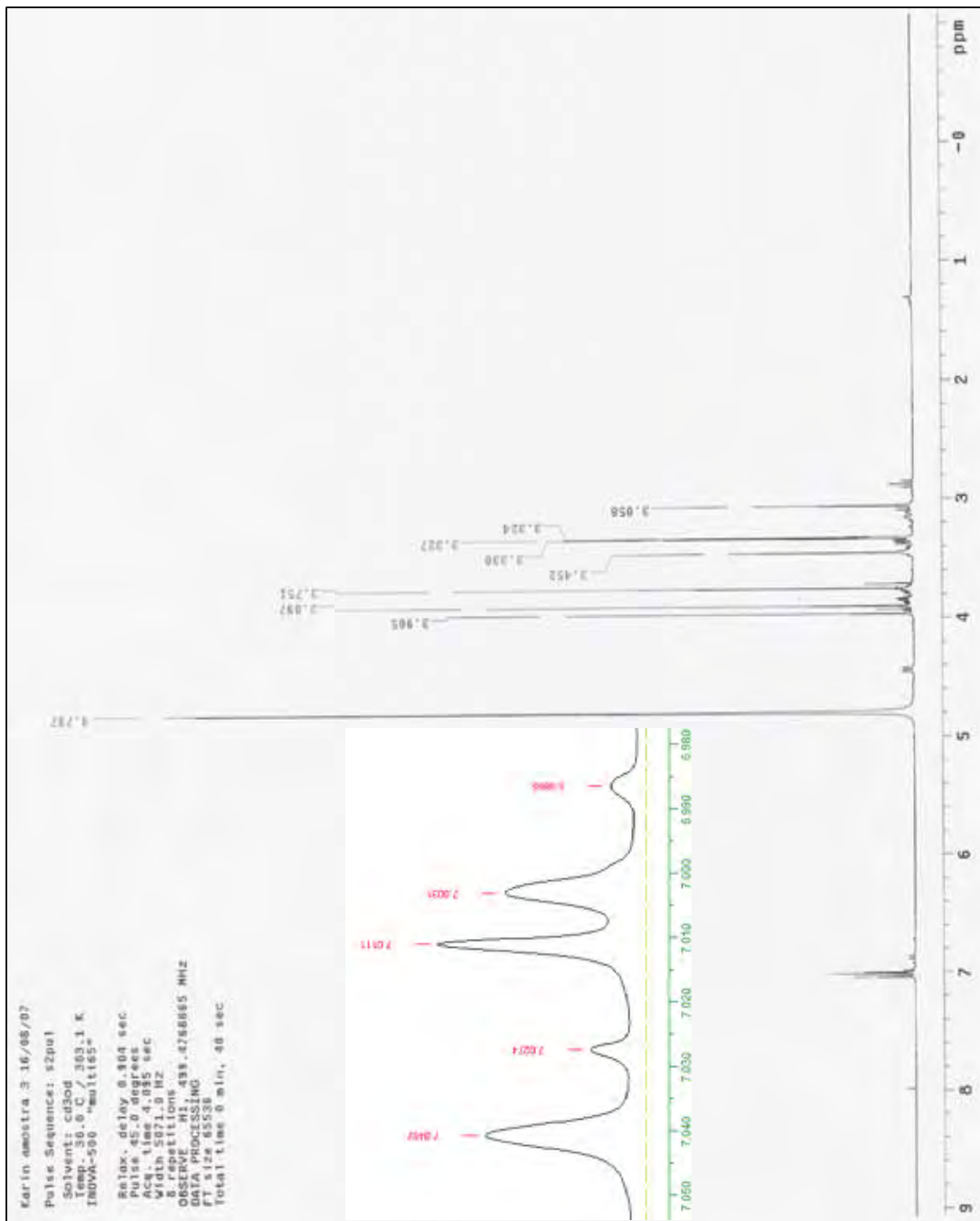
Anexo 28: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.....	241
Anexo 29: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,93.....	242
Anexo 30: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,90.....	243
Anexo 31: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,71.....	244
Anexo 32: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 6,86.....	245

Anexo 1: Valores de F no nível de 95% de confiança

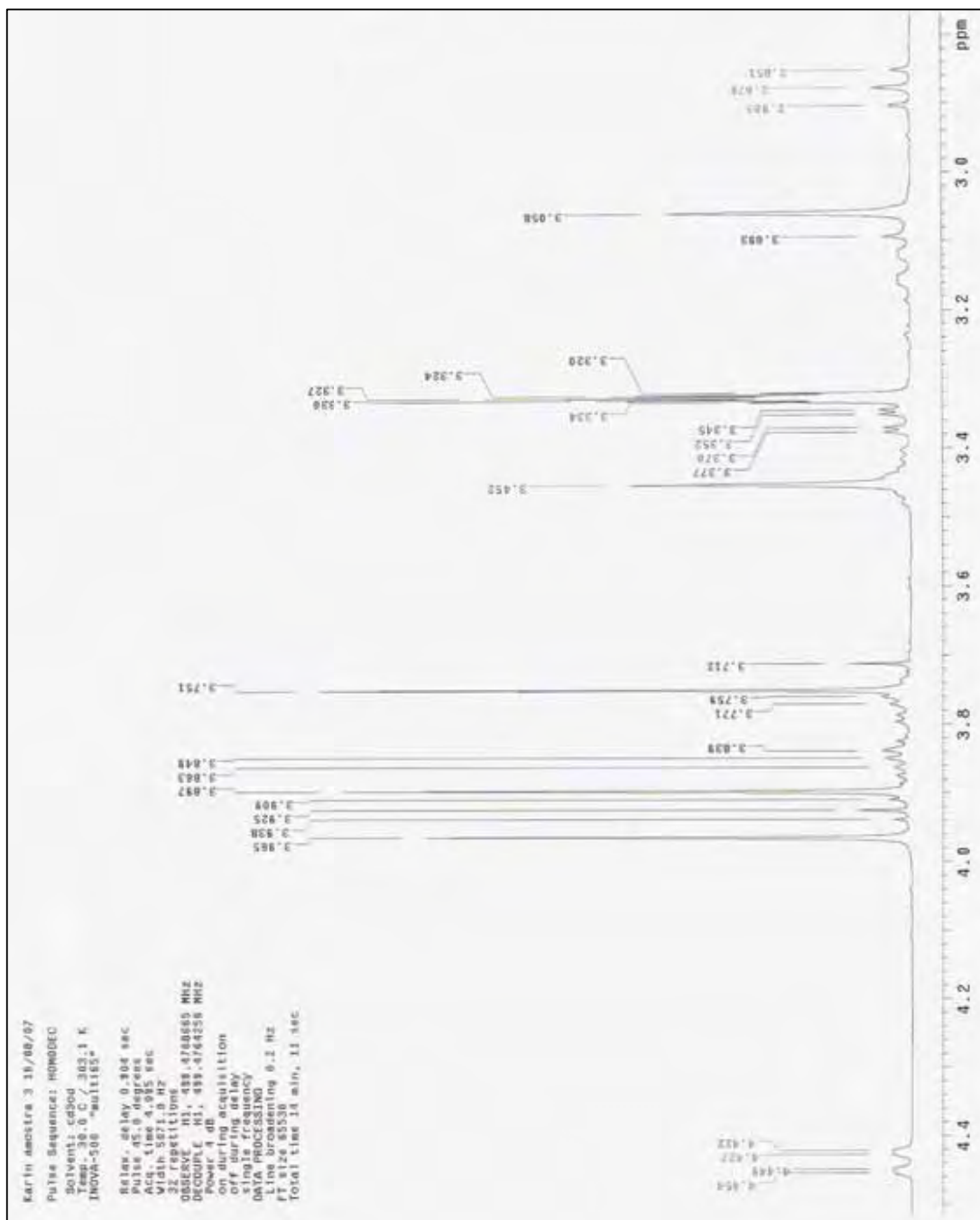
		V ₁									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V ₂	1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9
	2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40
	3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79
	4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96
	5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74
	6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06
	7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64
	8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35
	9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14
	10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98
	11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85
	12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75
	13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67
	14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60
	15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54

Anexo 2: Valores de t com v graus de liberdade

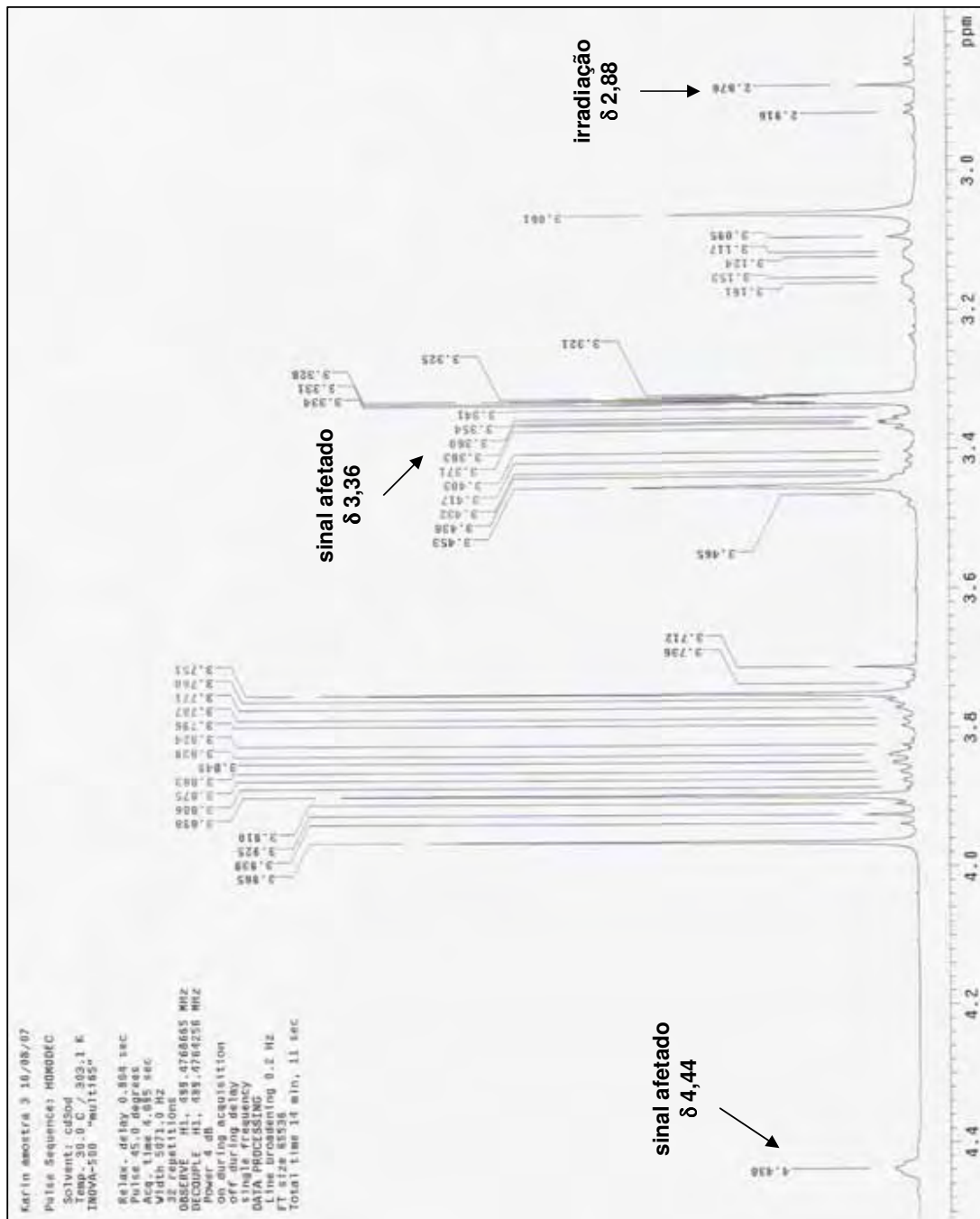
V	Área de Probabilidade			
	0,05	0,025	0,01	0,005
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,97	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,37	4,03
6	1,94	2,75	3,14	3,71
7	1,90	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
11	1,80	2,20	2,72	3,11
12	1,78	2,18	2,68	3,05

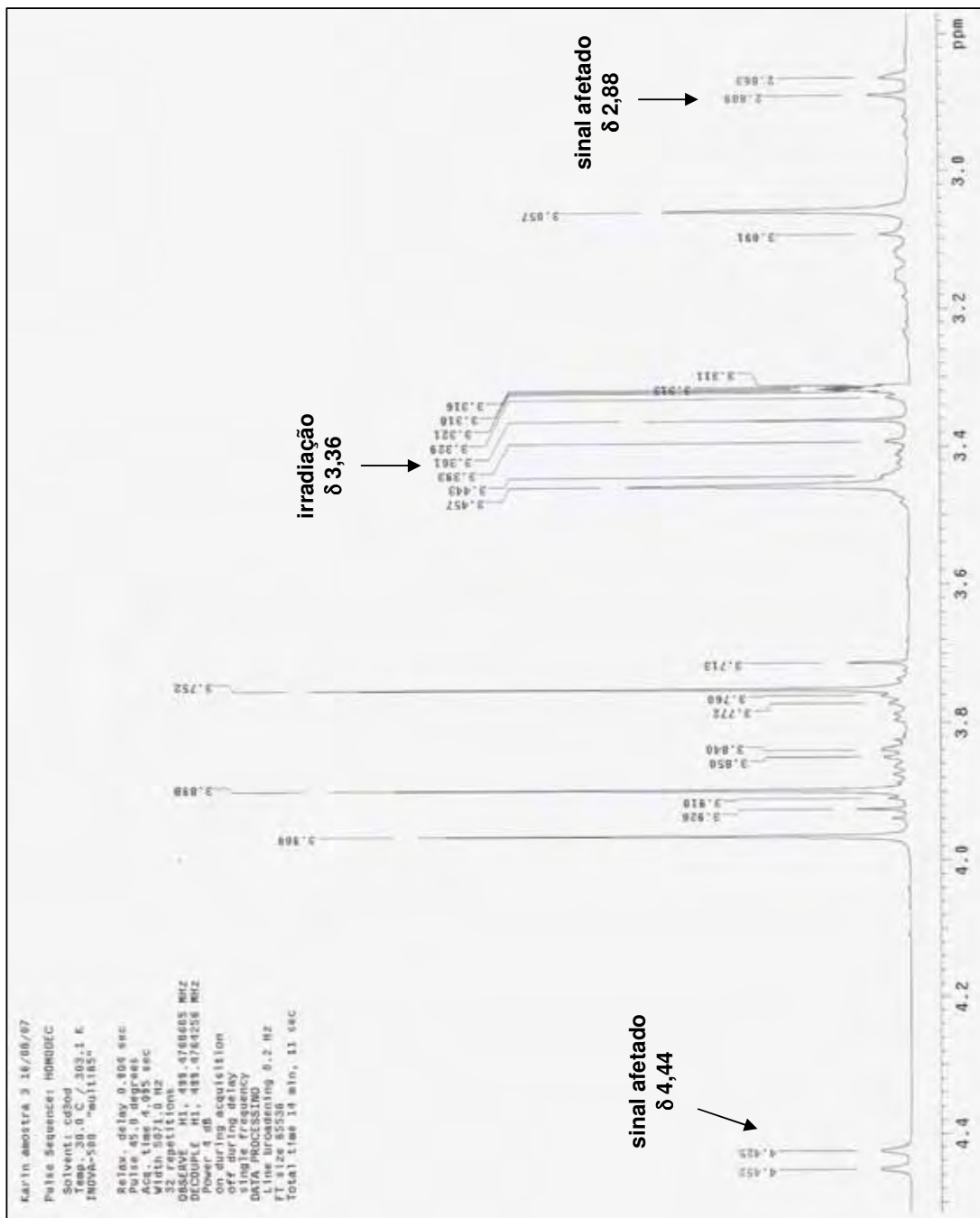
Anexo 3: Espectro de RMN de ^1H da substância 1.

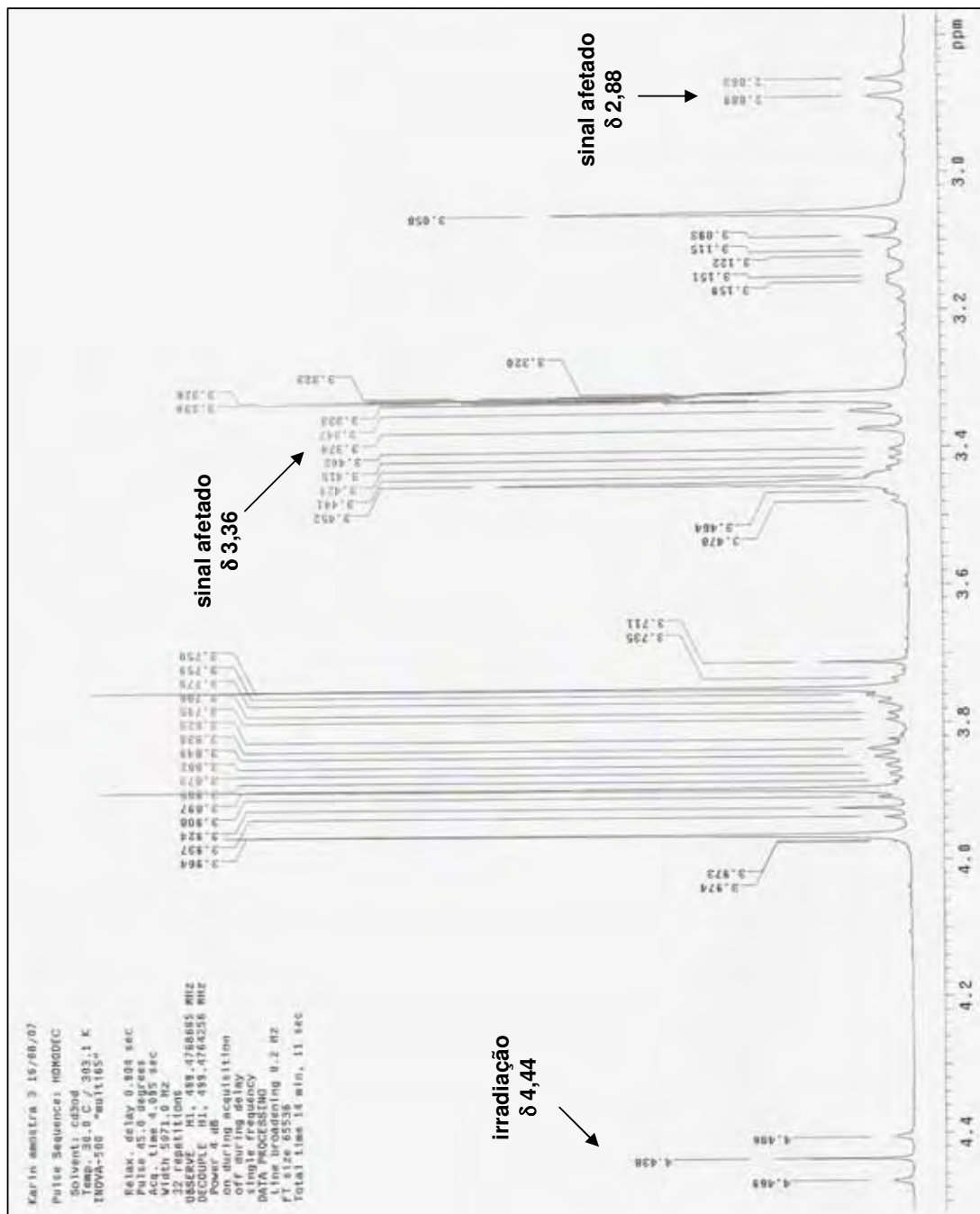
Anexo 4: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1.



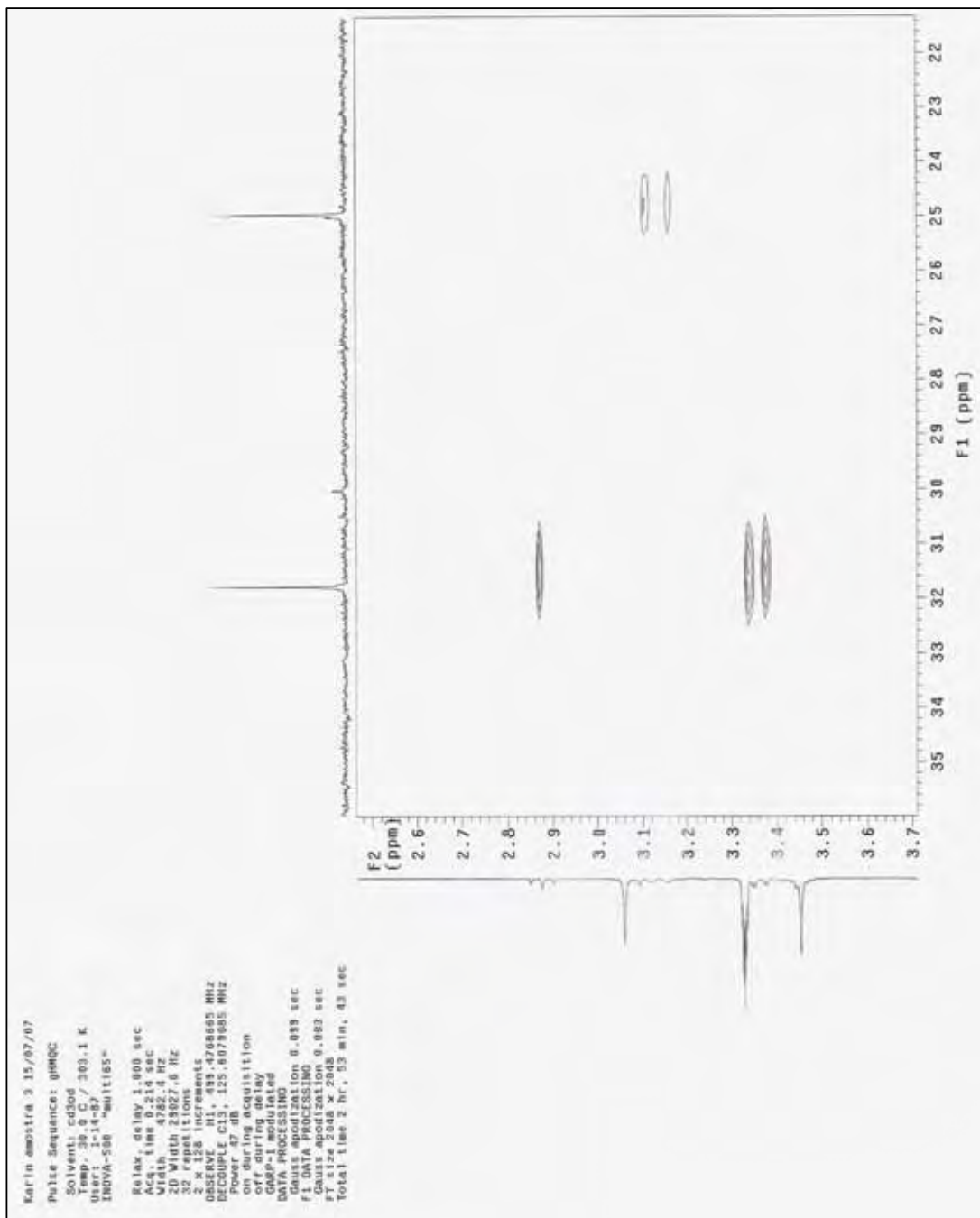
Anexo 5: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em $\delta 2,88$.



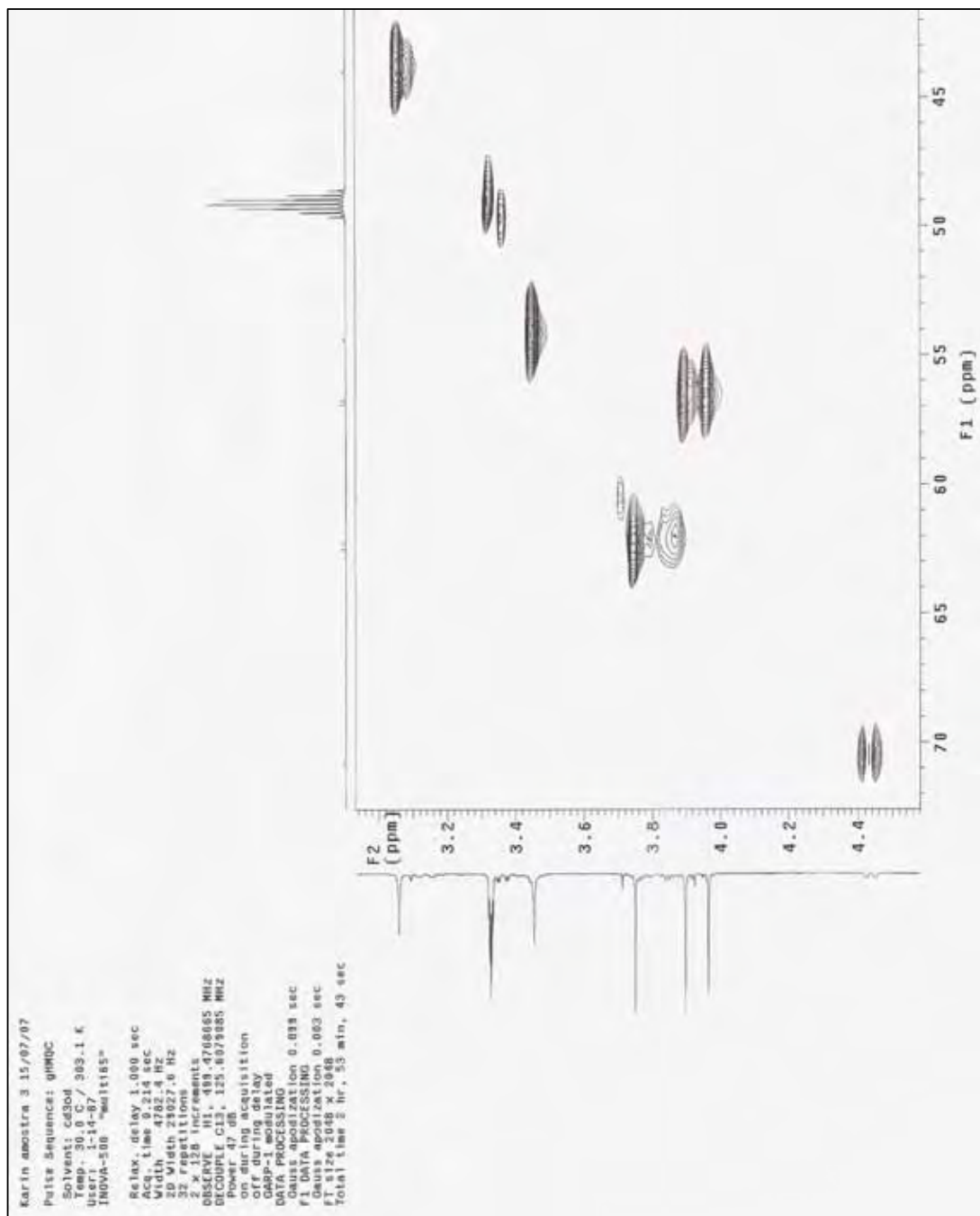
Anexo 6: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em δ 3,36.

Anexo 7: Espectro de HOMODEC da substância 1 com irradiação em δ 4,44.

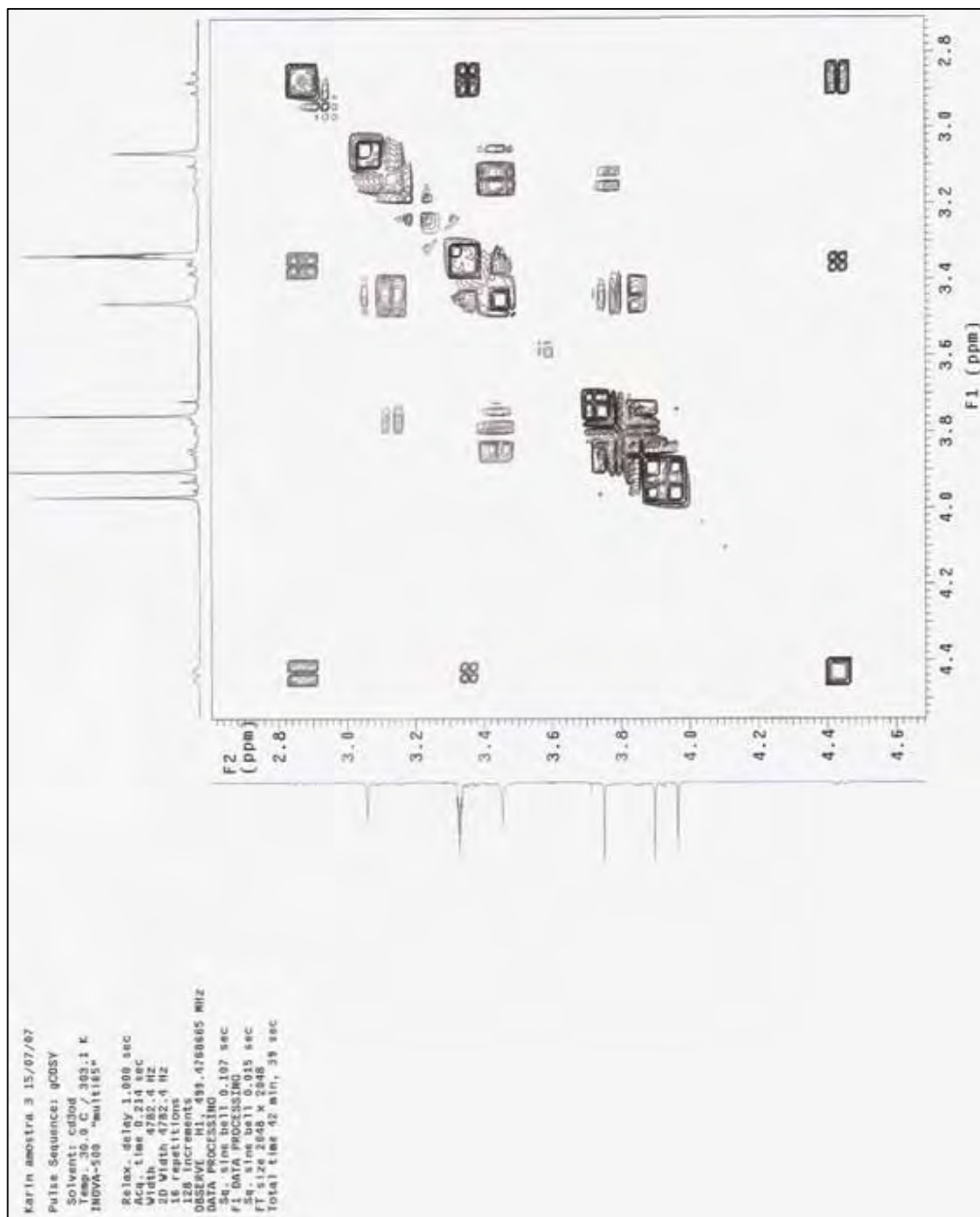
Anexo 8: Ampliação 1 do espectro de HMQC da substância 1.

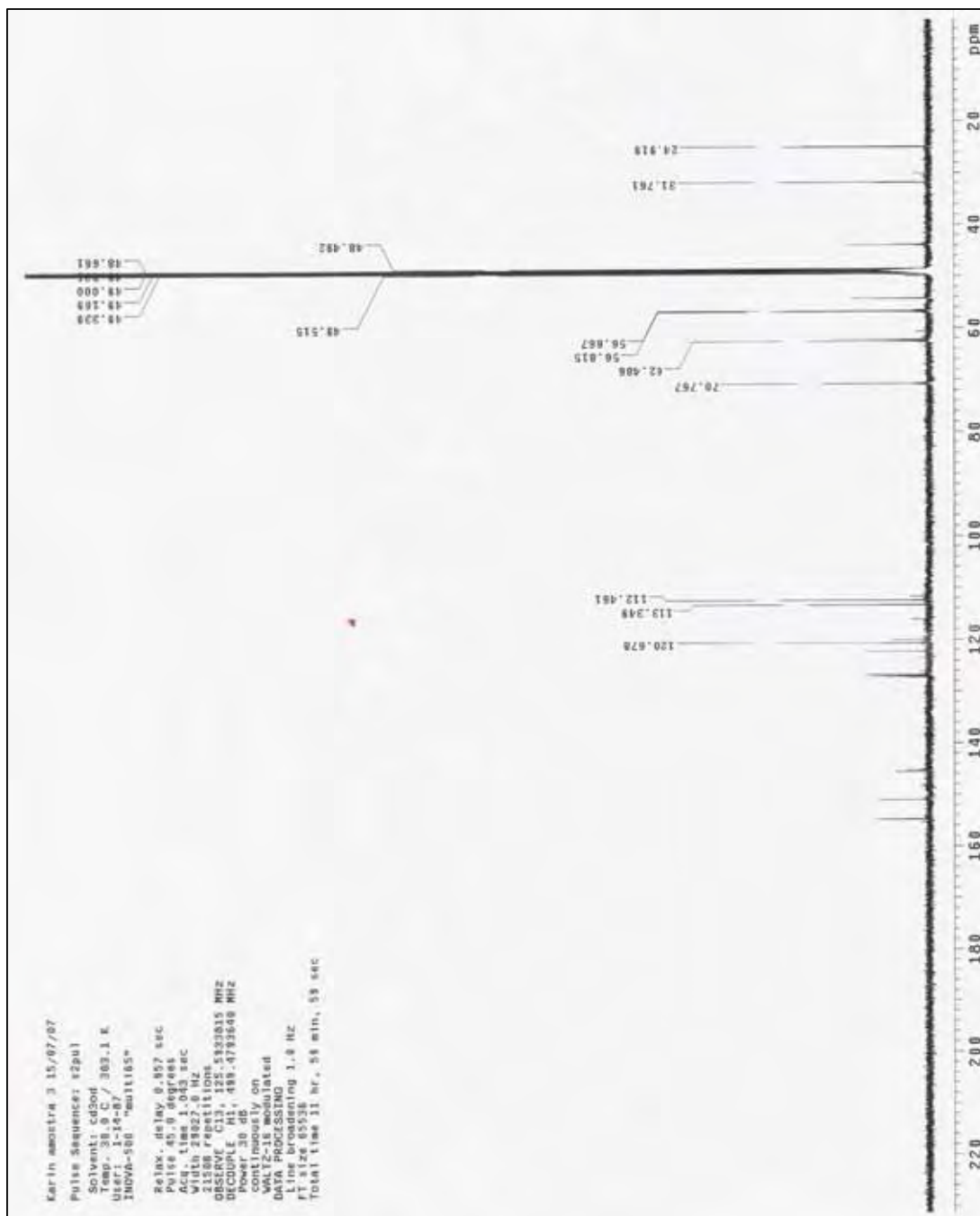


Anexo 9: Ampliação 2 do espectro de HMQC da substância 1.

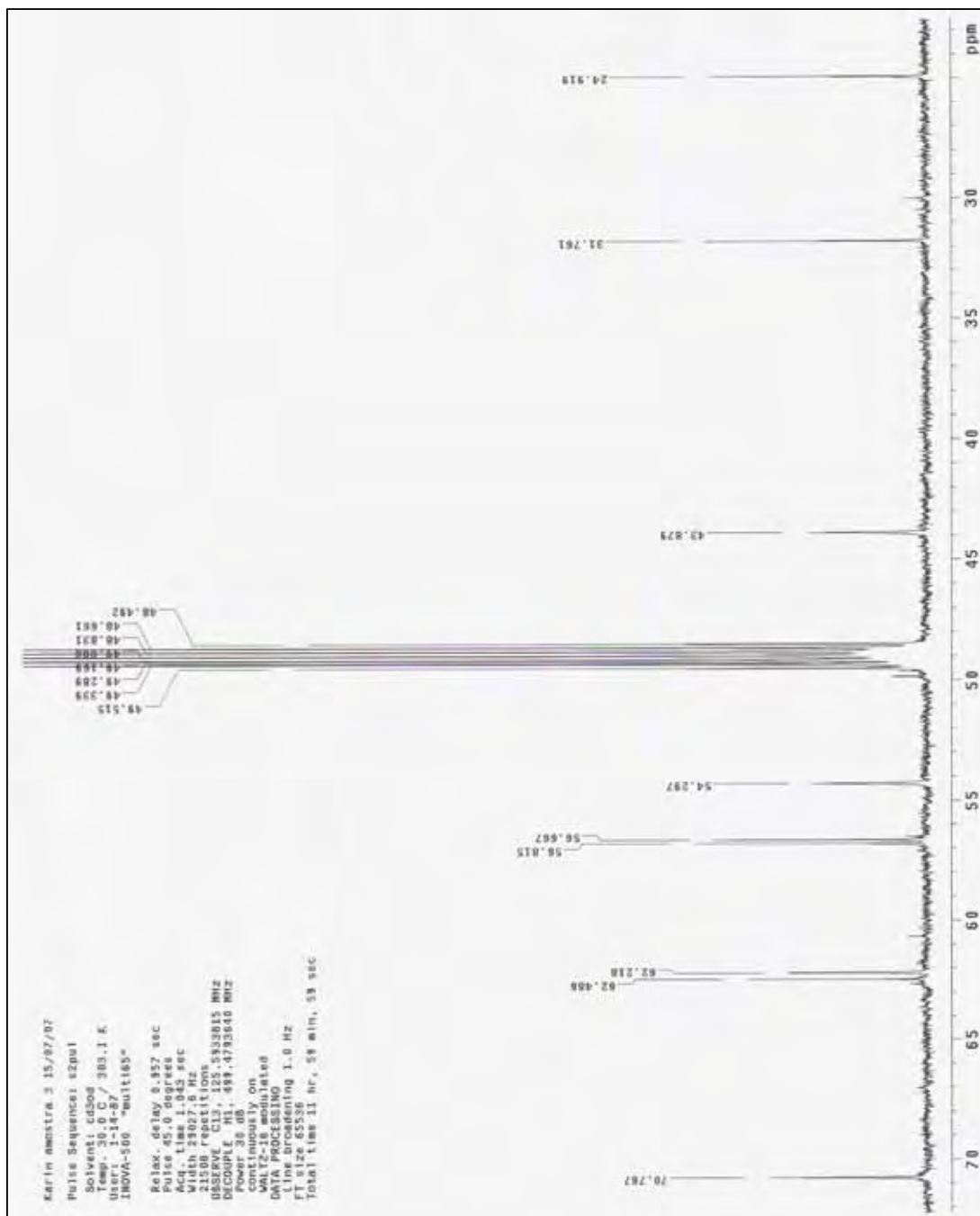


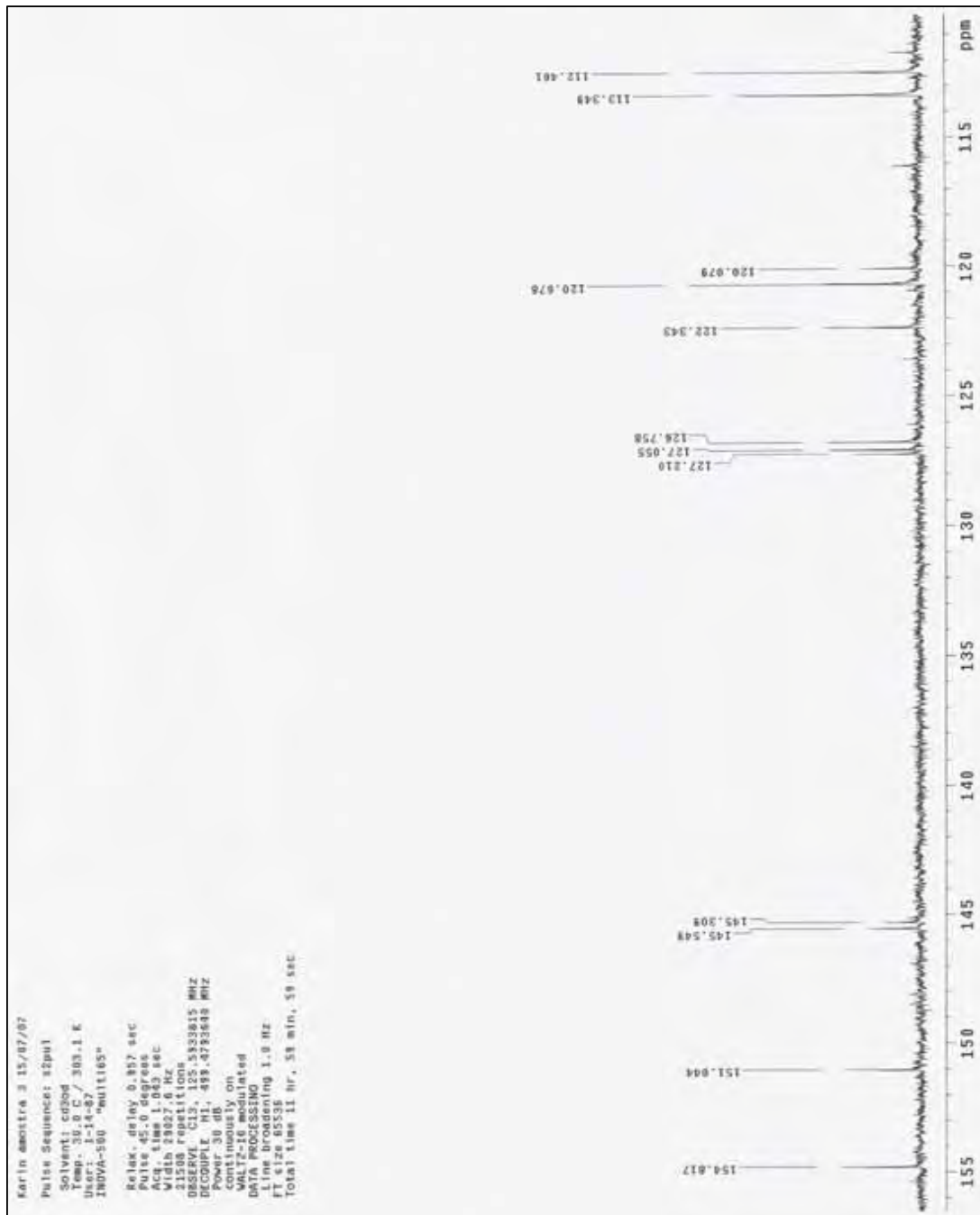
Anexo 10: Espectro de COSY da substância 1.



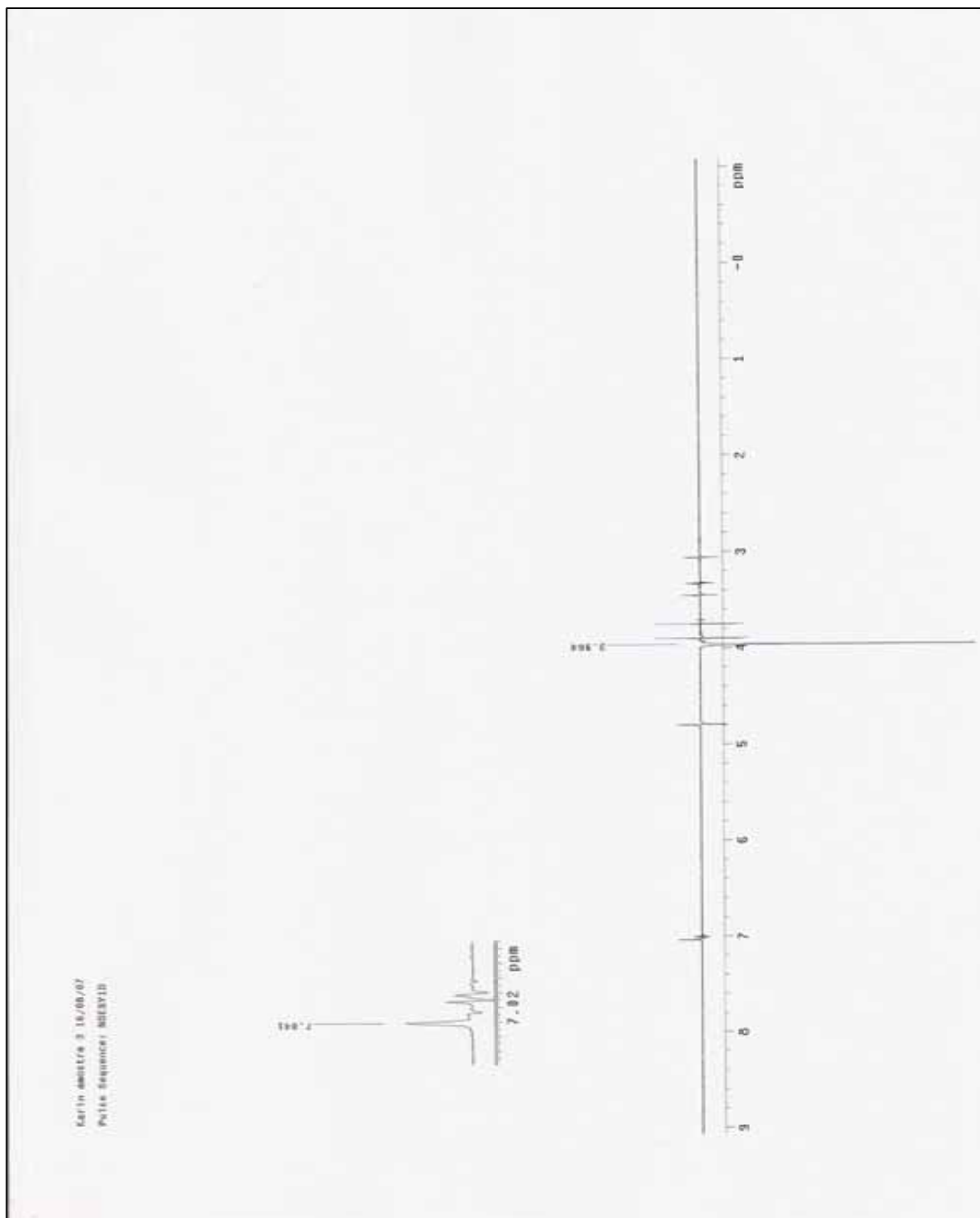
Anexo 11: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.

Anexo 12: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.

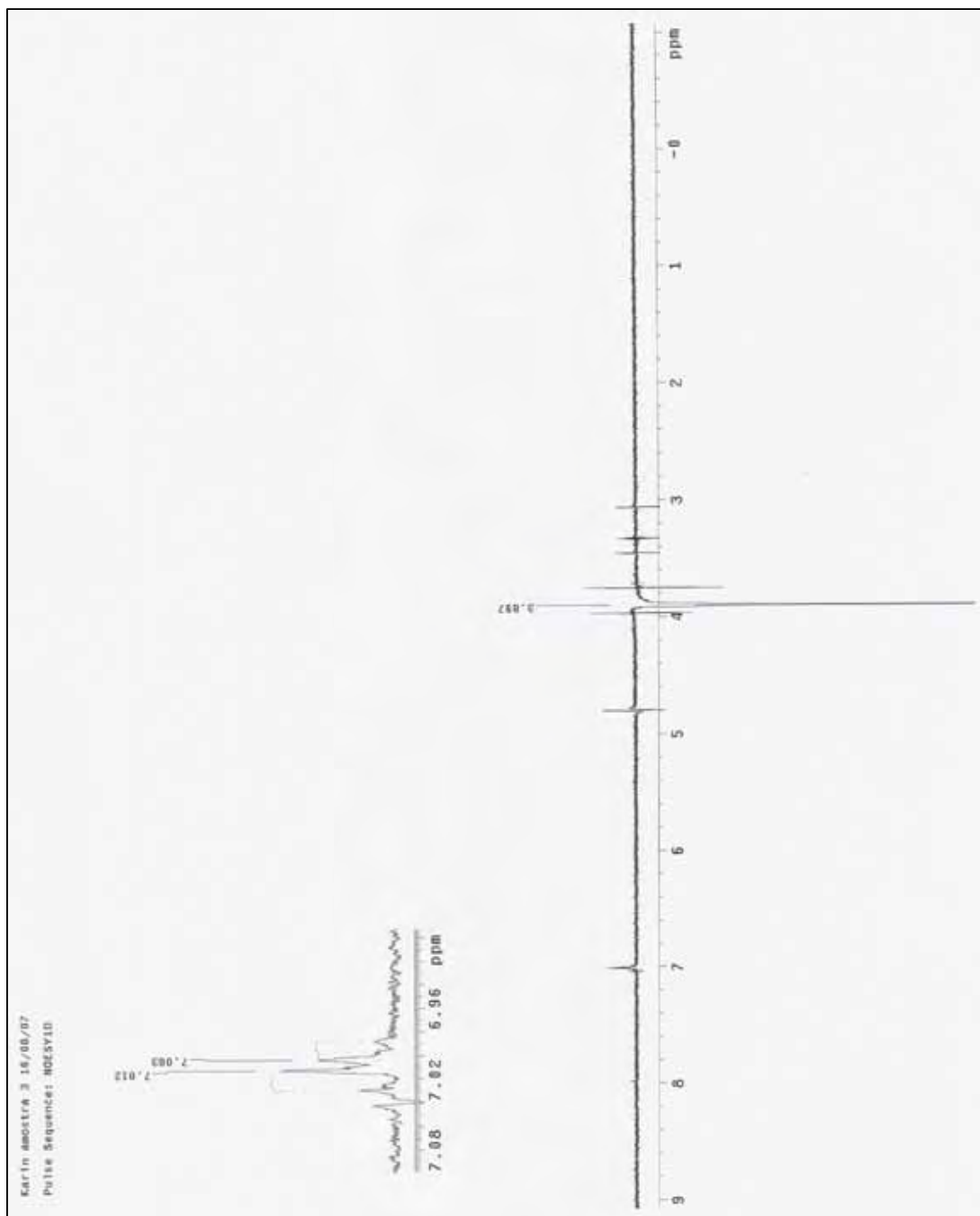


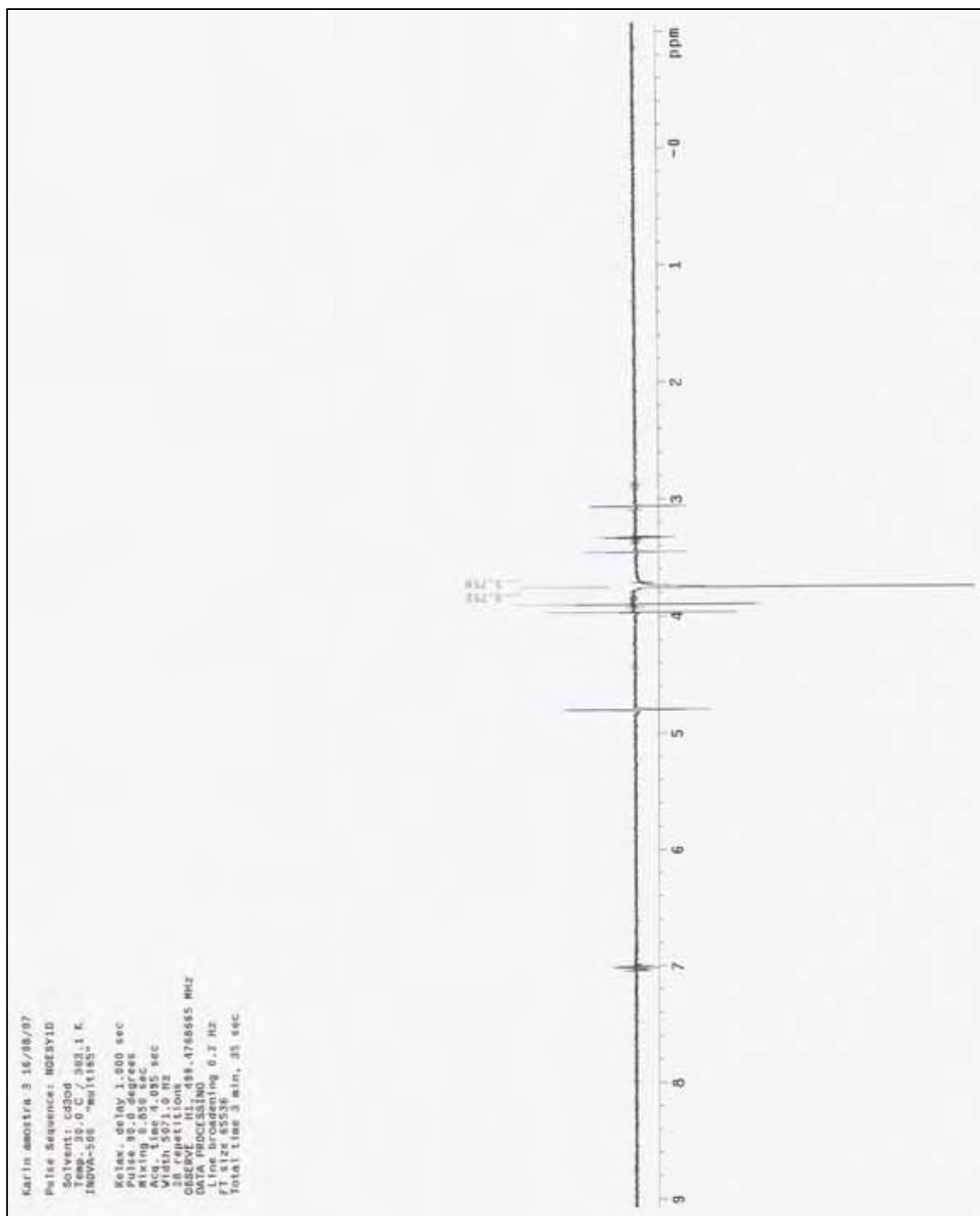
Anexo 13: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1.

Anexo 14: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,97.

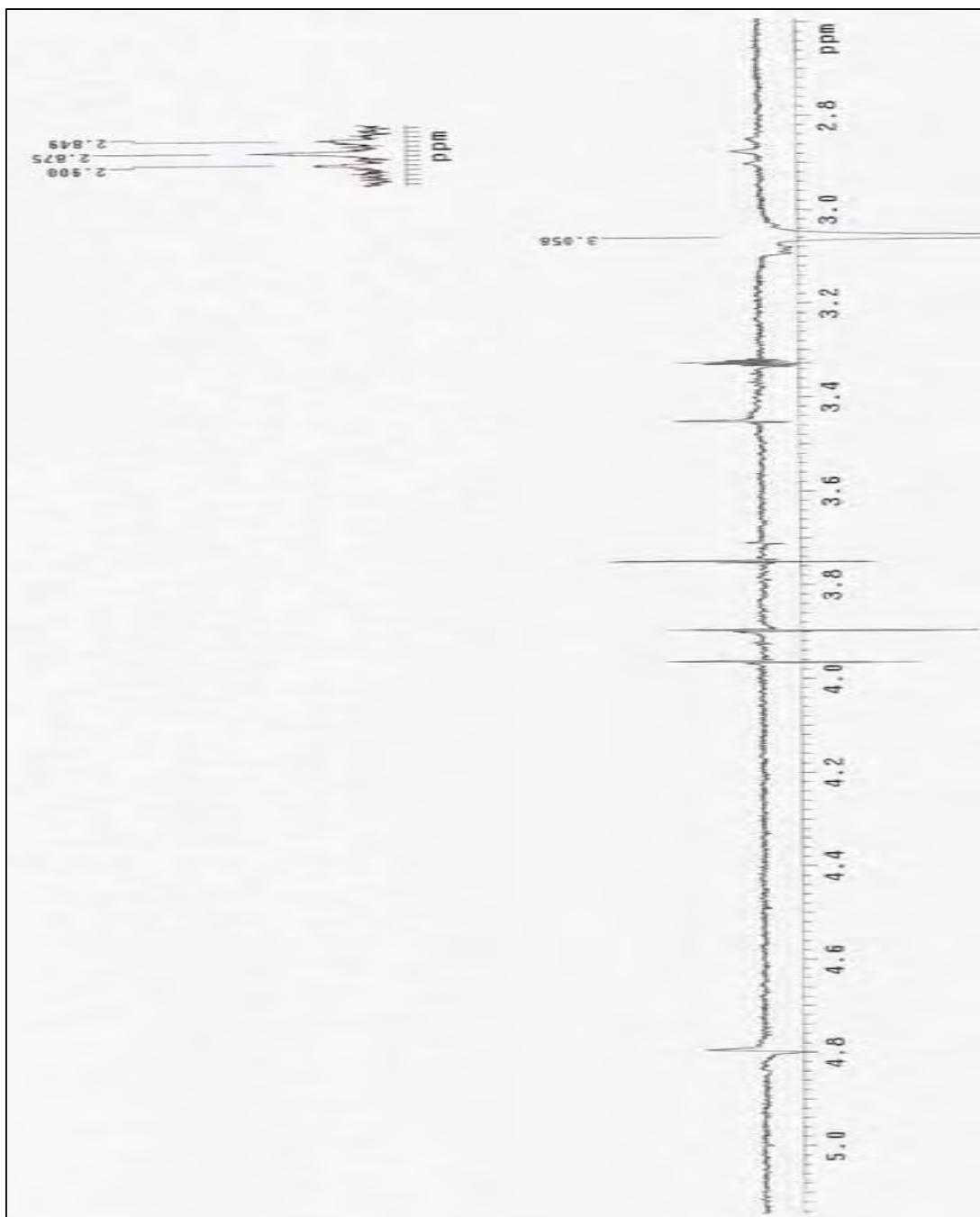


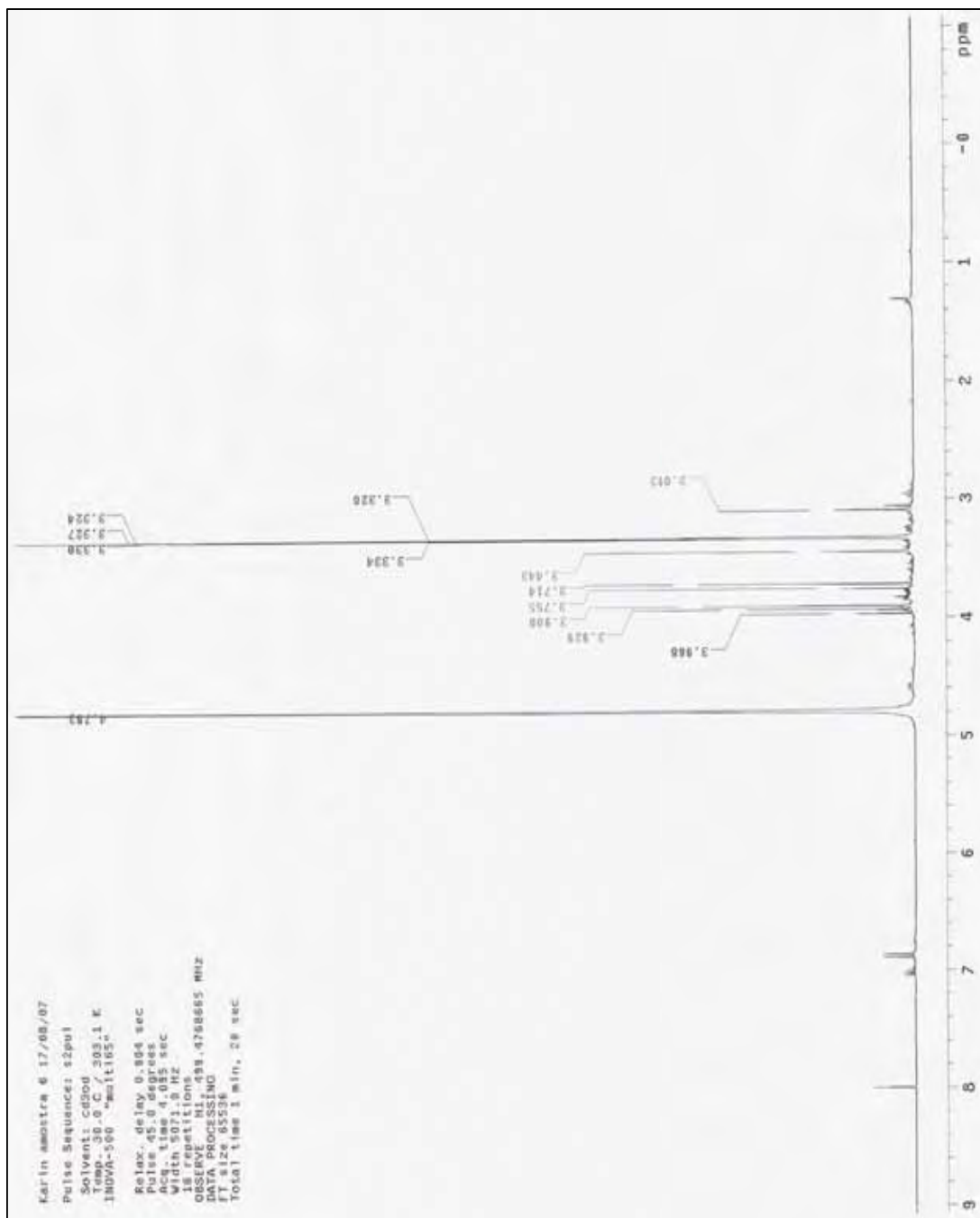
Anexo 15: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,90.

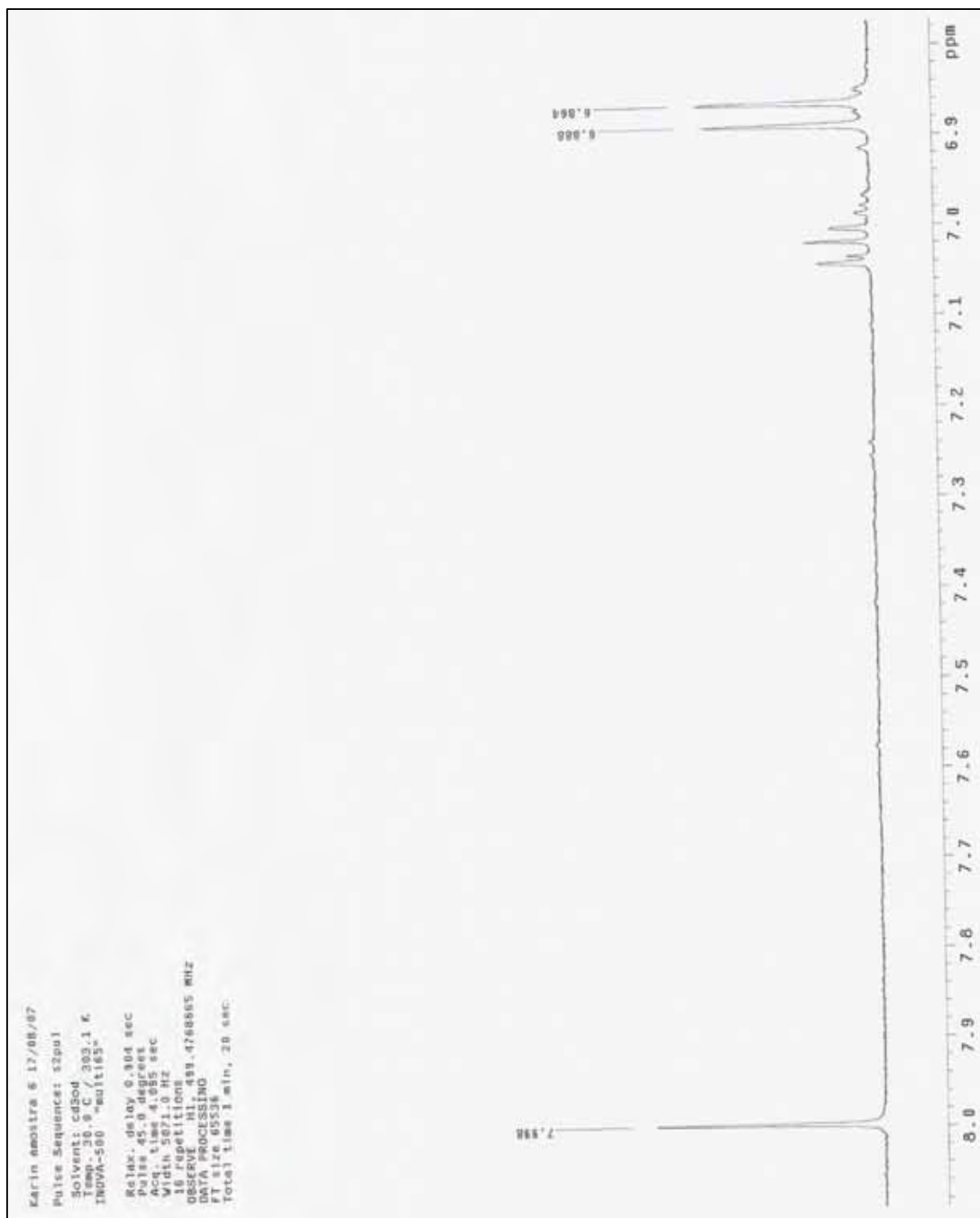


Anexo 16: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,95.

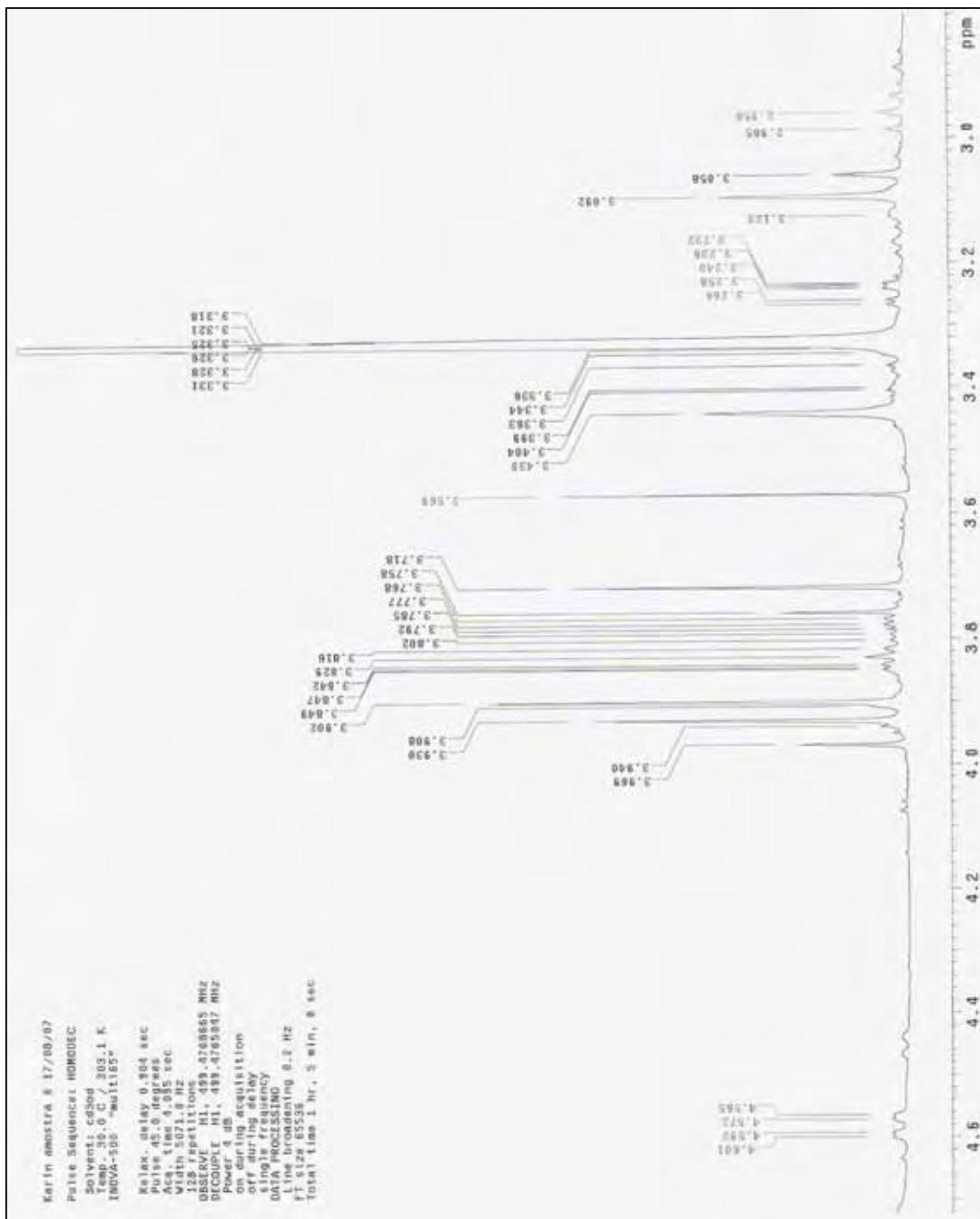
Anexo 17: Espectro de NOE da substância 1 com irradiação em δ 3,06.



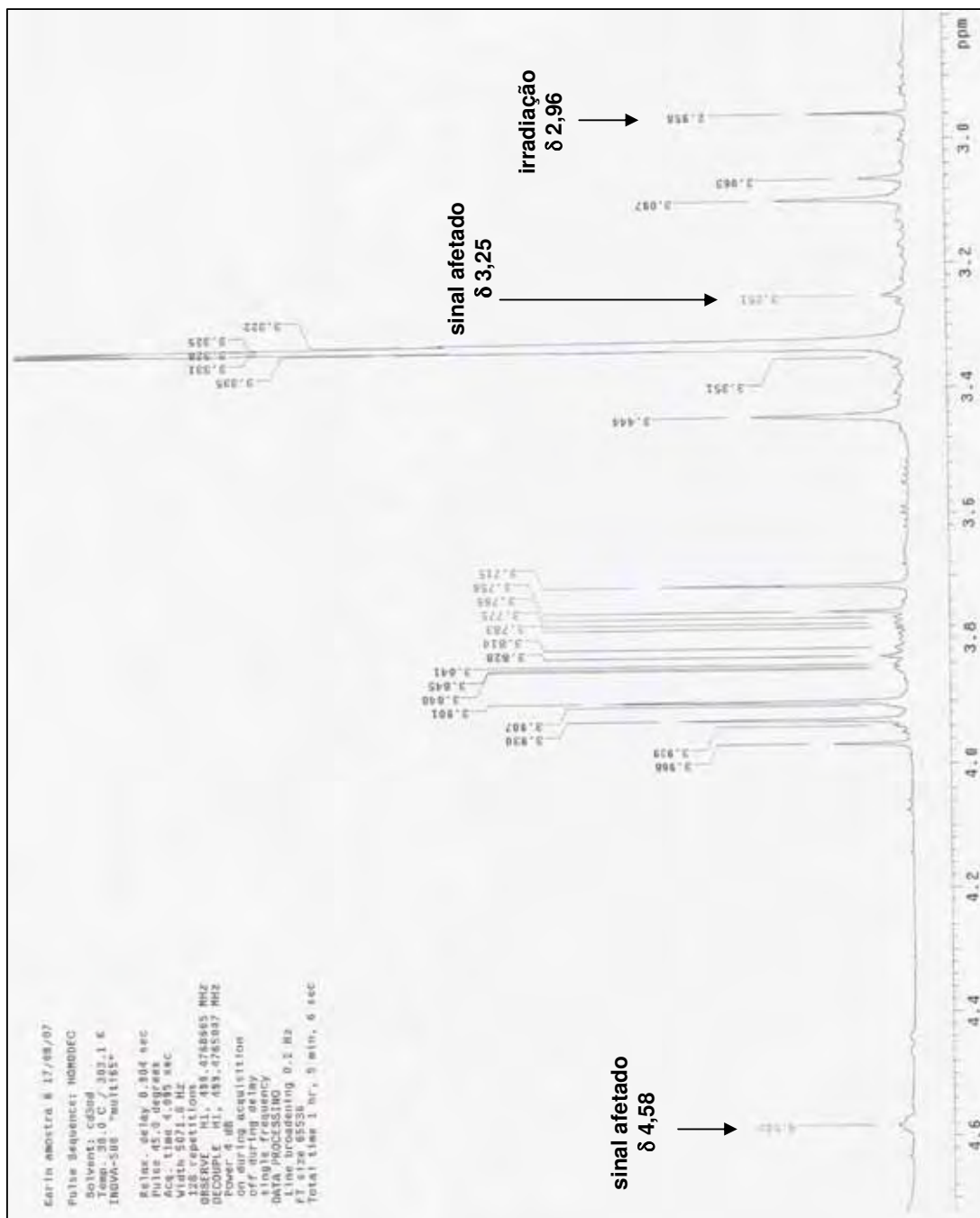
Anexo 18: Espectro de RMN de ^1H da substância 2..

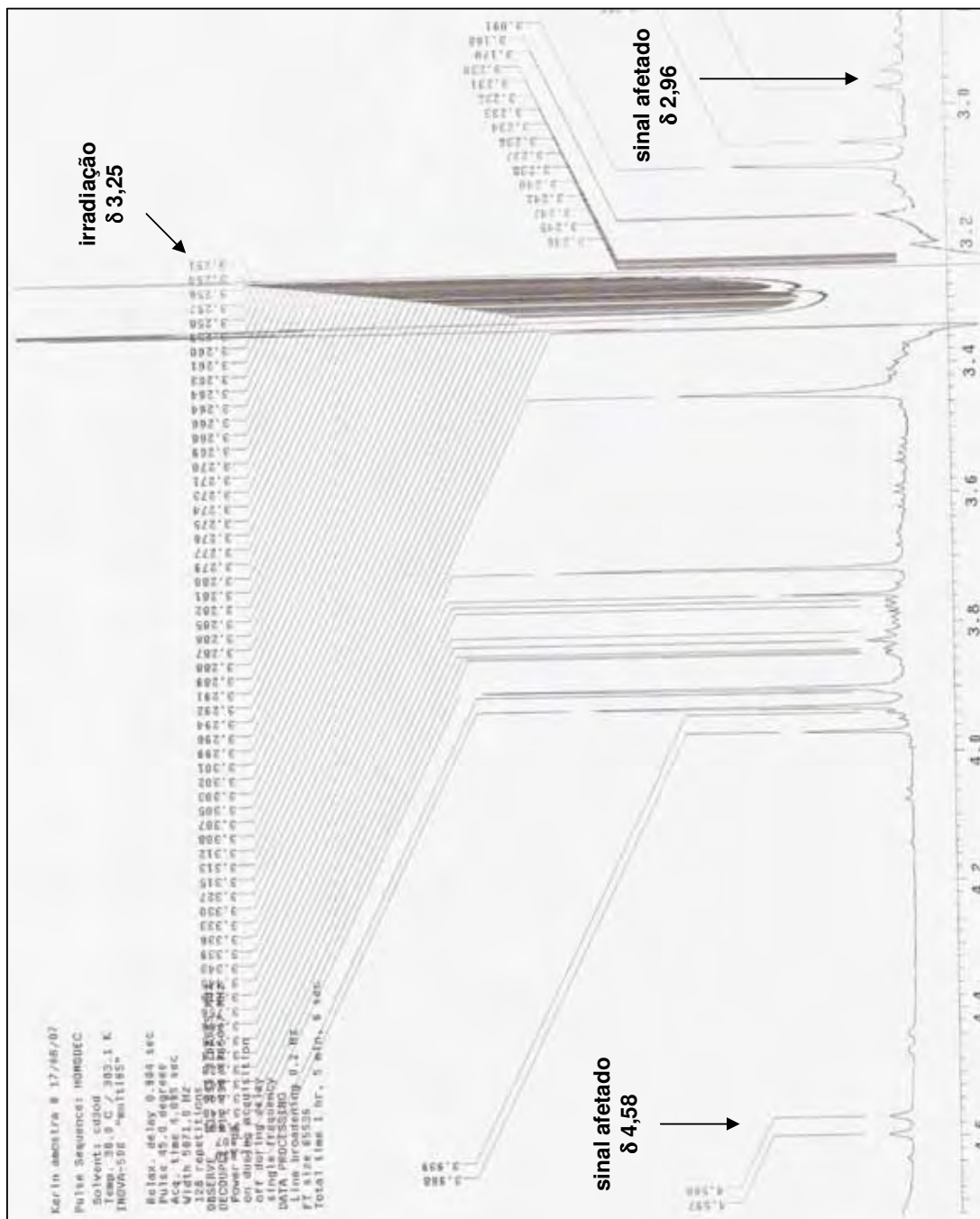
Anexo 19: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H da substância 2.

Anexo 20: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H da substância 2.

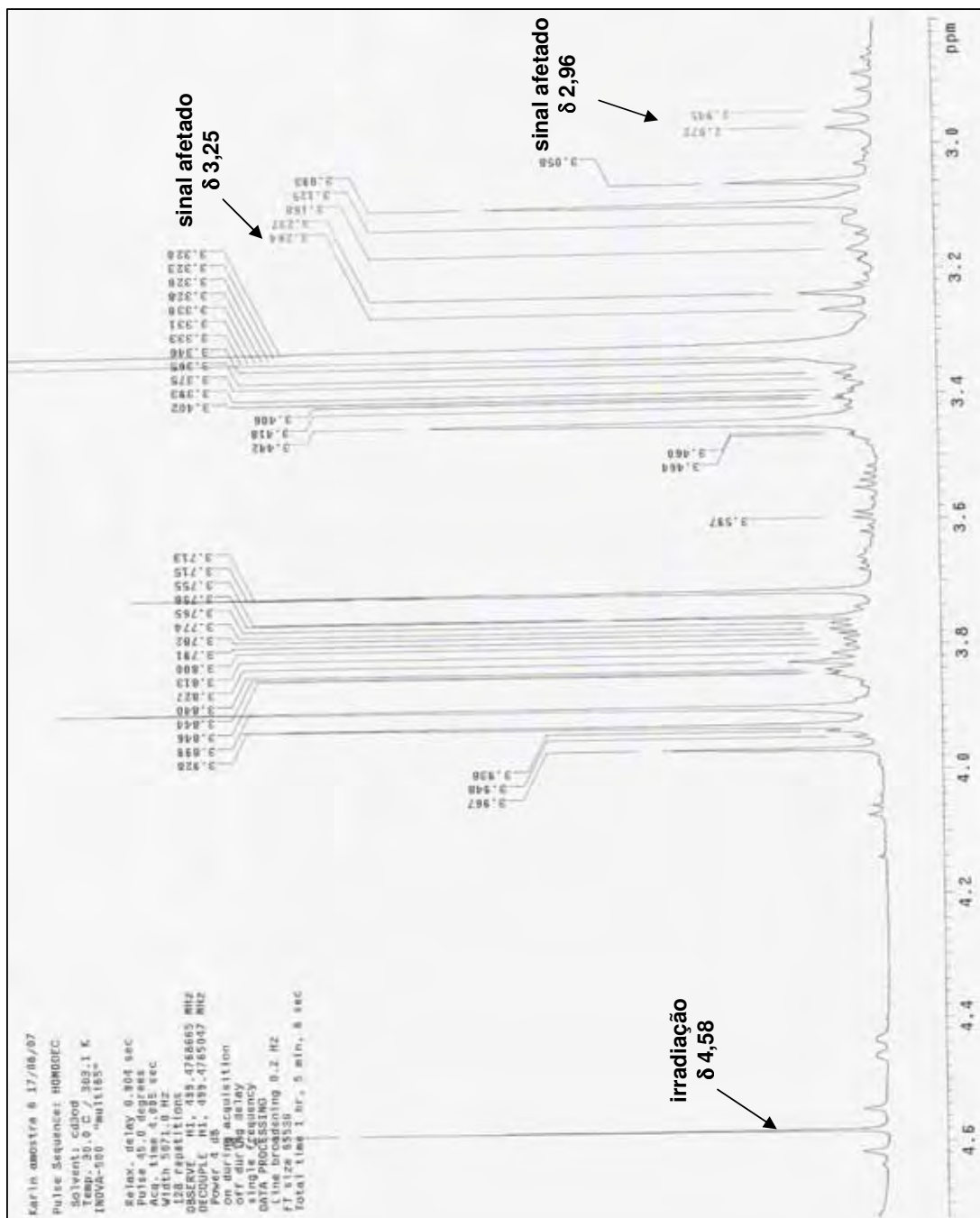


Anexo 21: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 2,96.

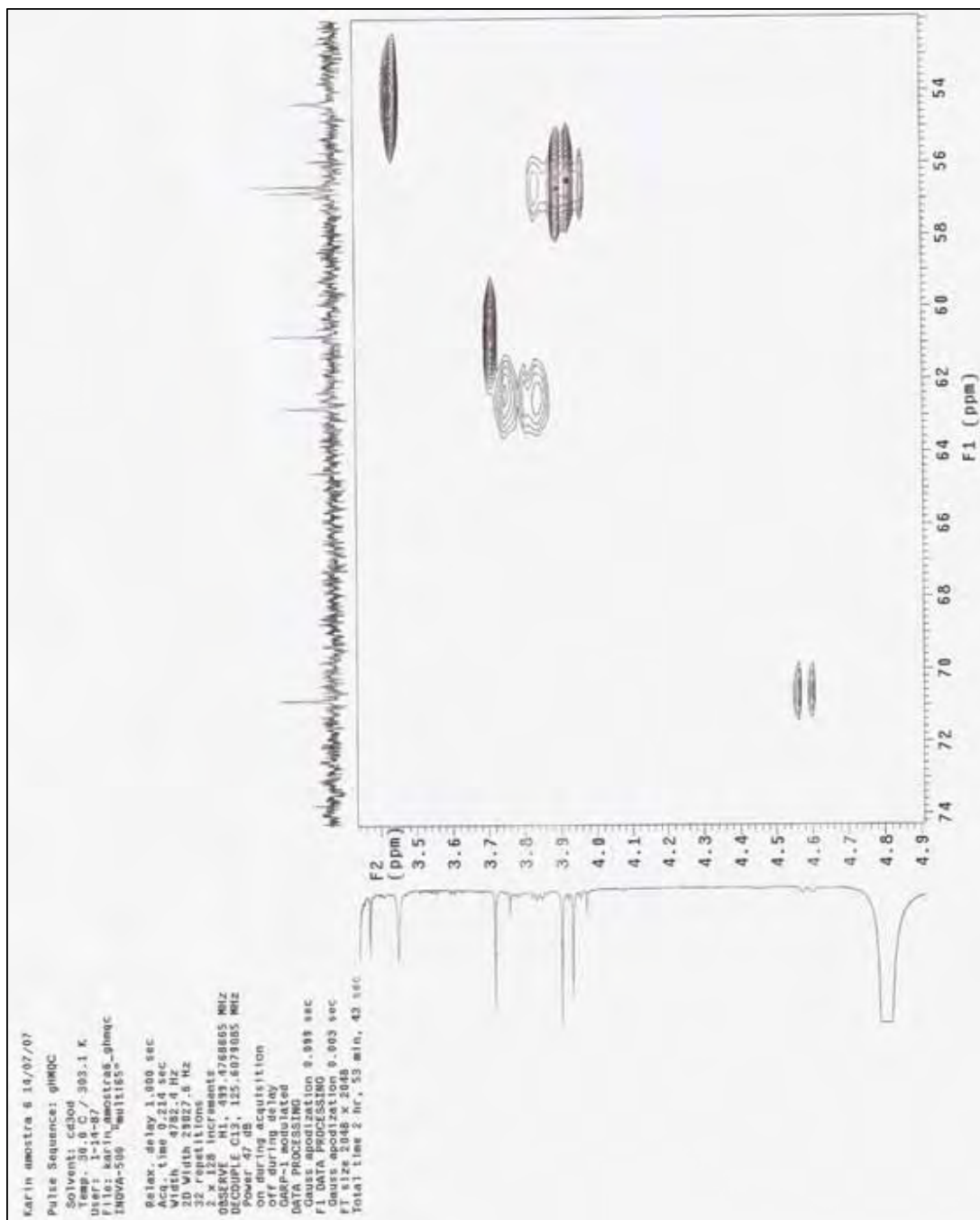


Anexo 22: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 3,25.

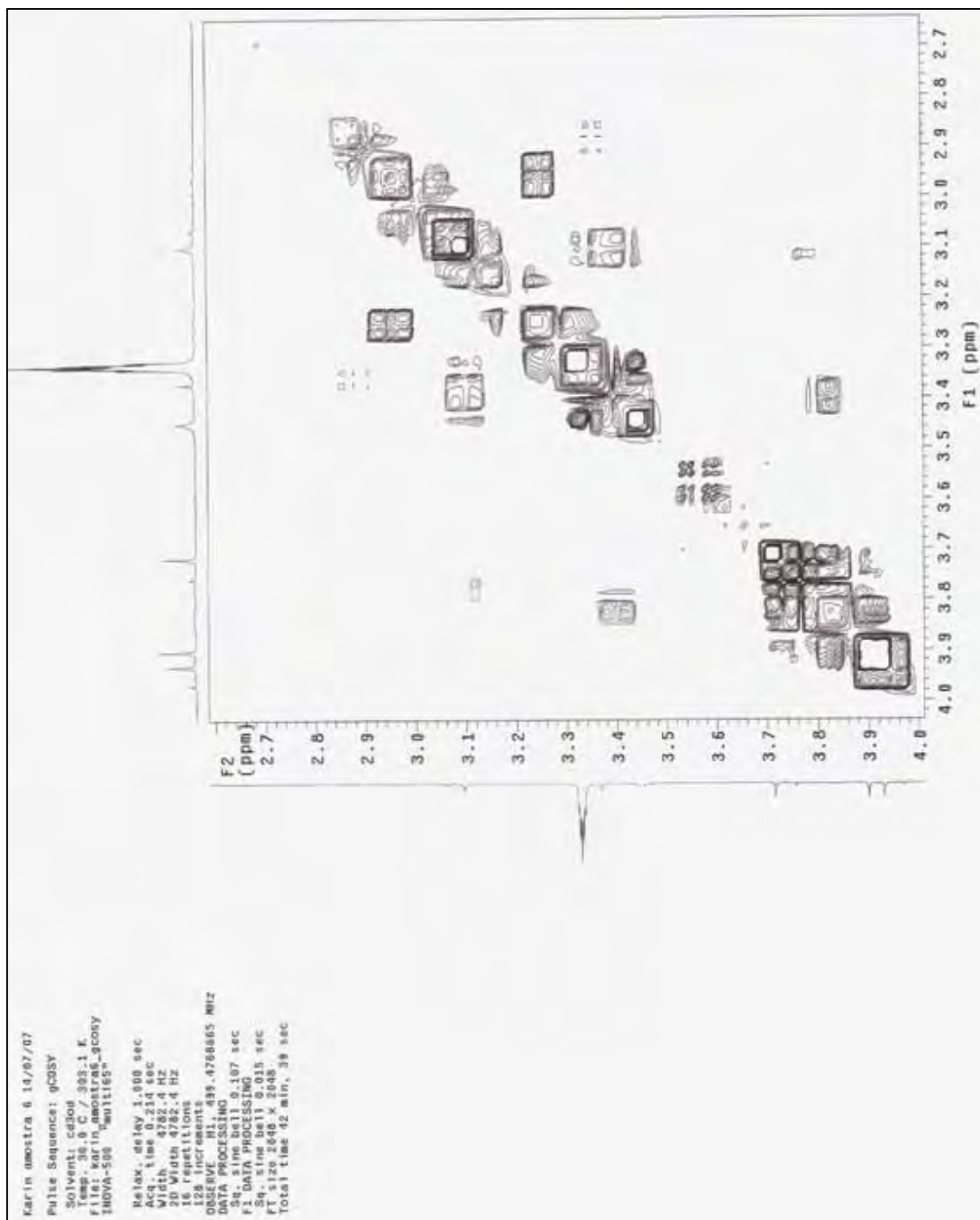
Anexo 23: Espectro de HOMODEC da substância 2 com irradiação em δ 4,58.

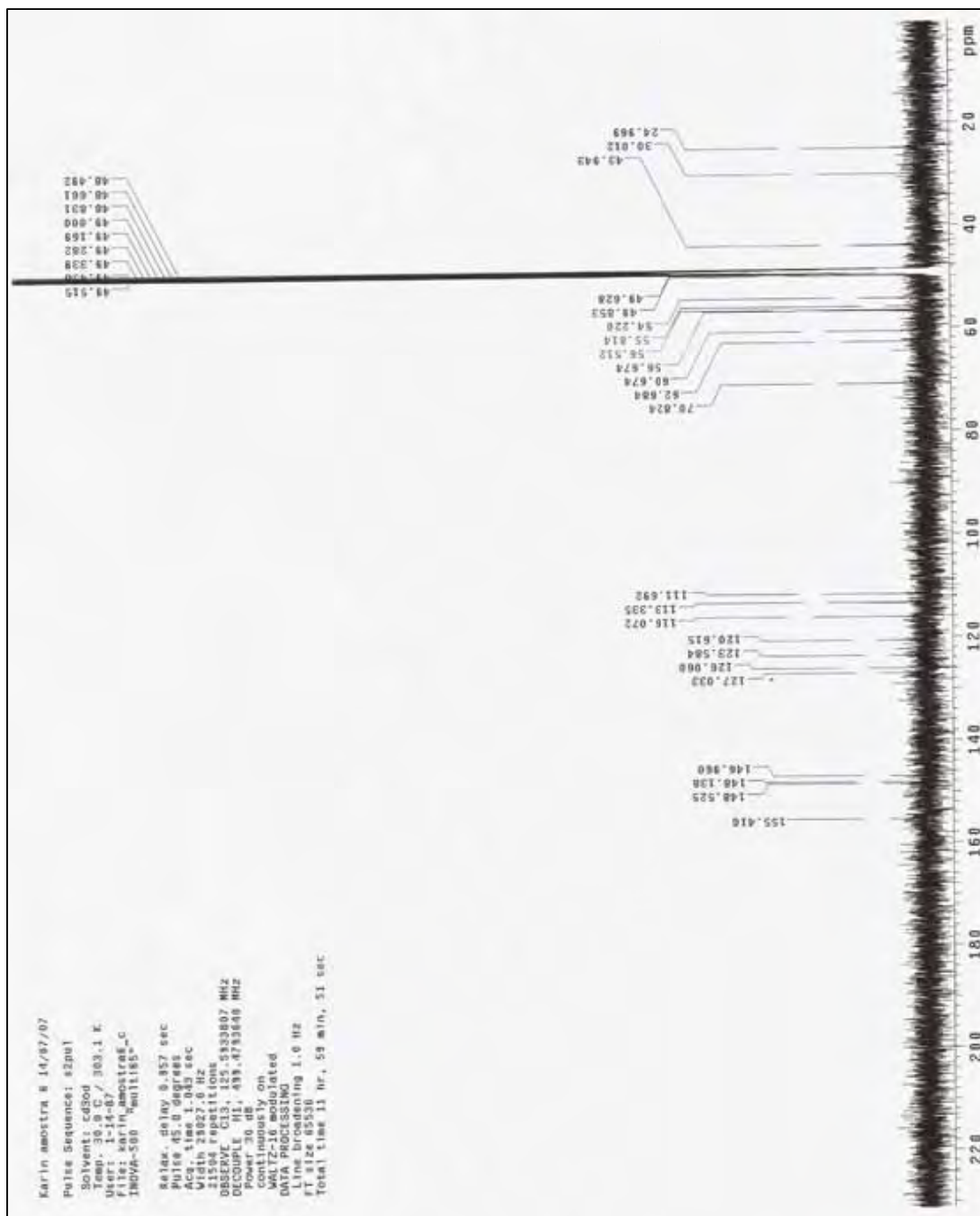


Anexo 24: Espectro de HMQC da substância 2.

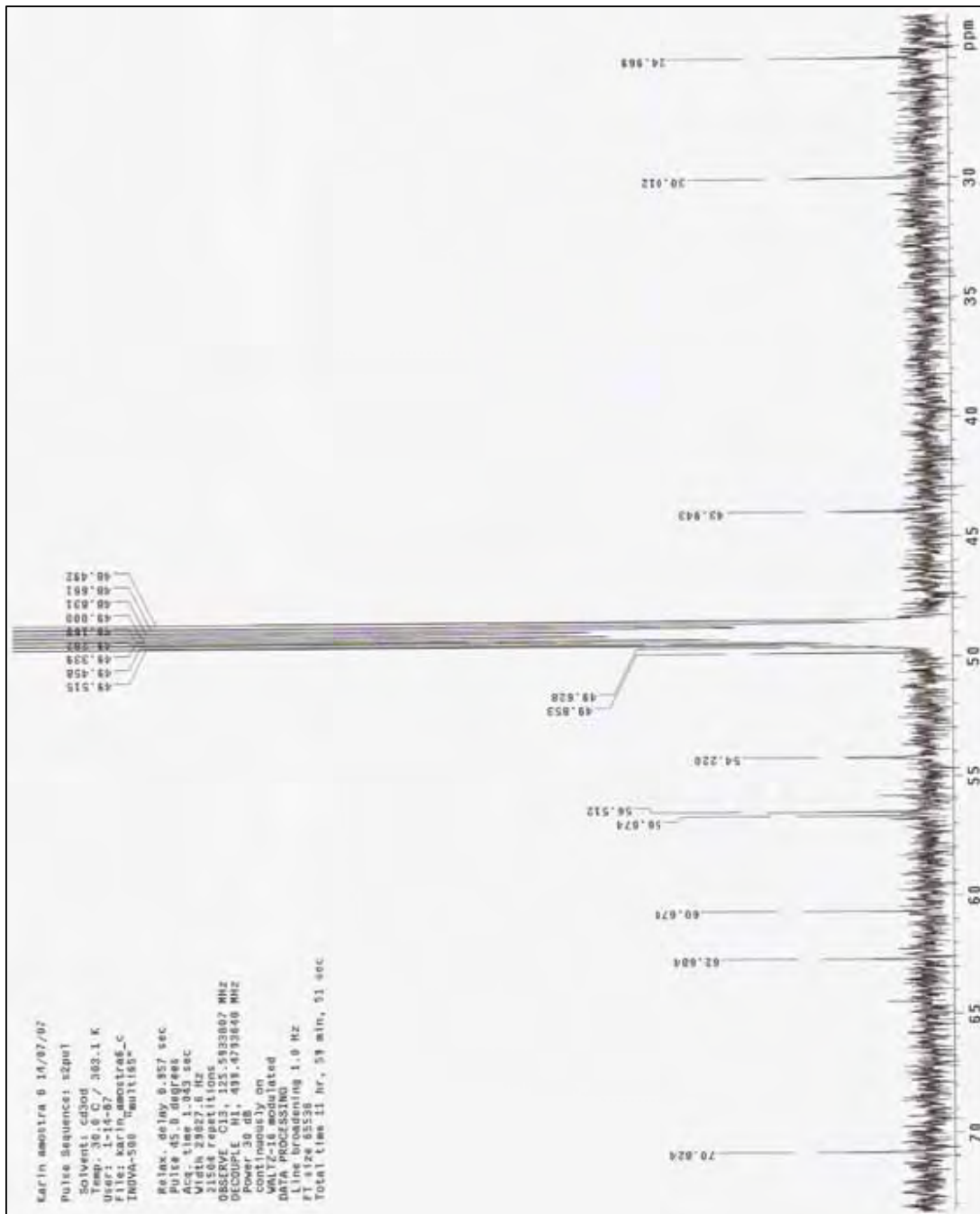


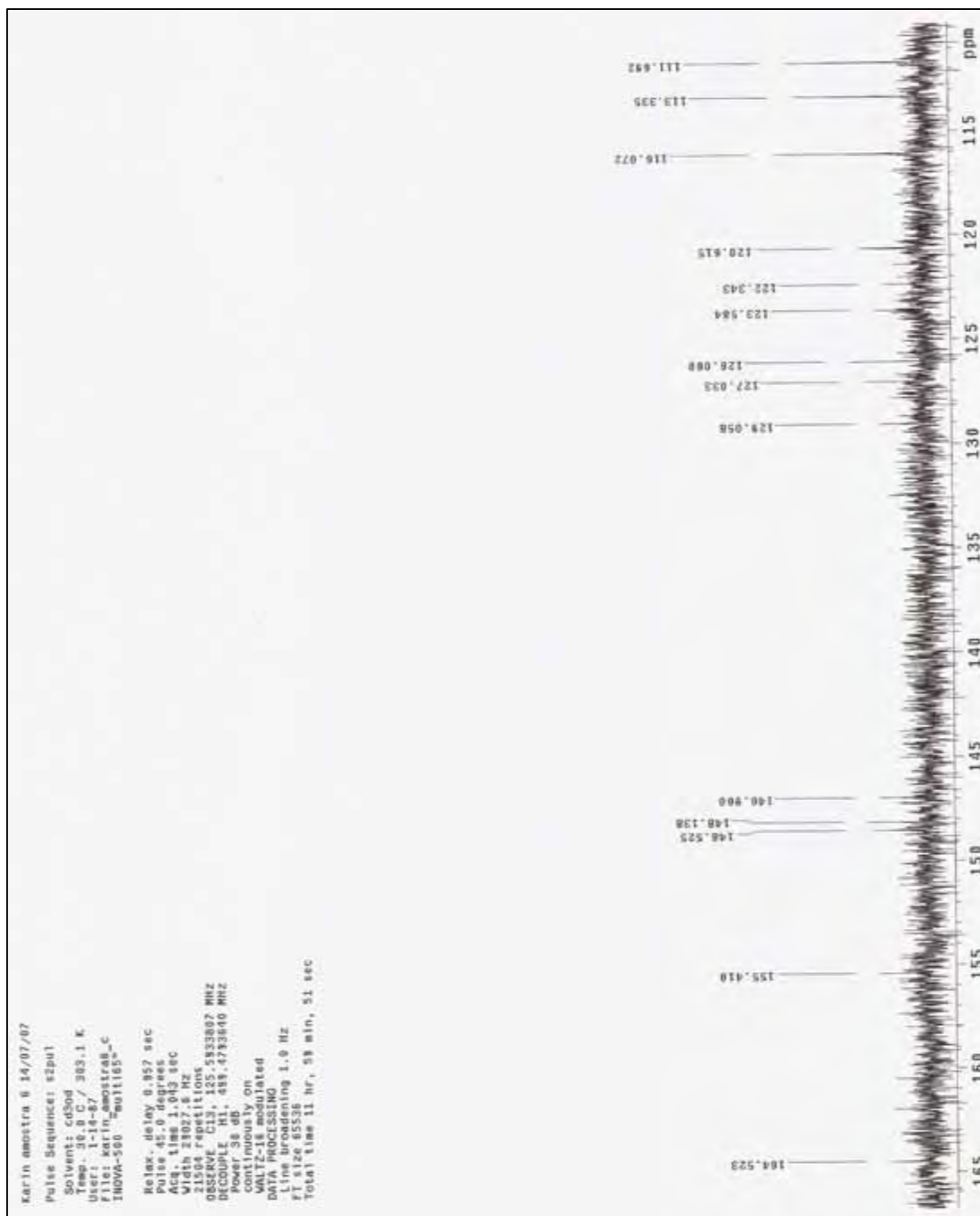
Anexo 25: Espectro de COSY da substância 2.

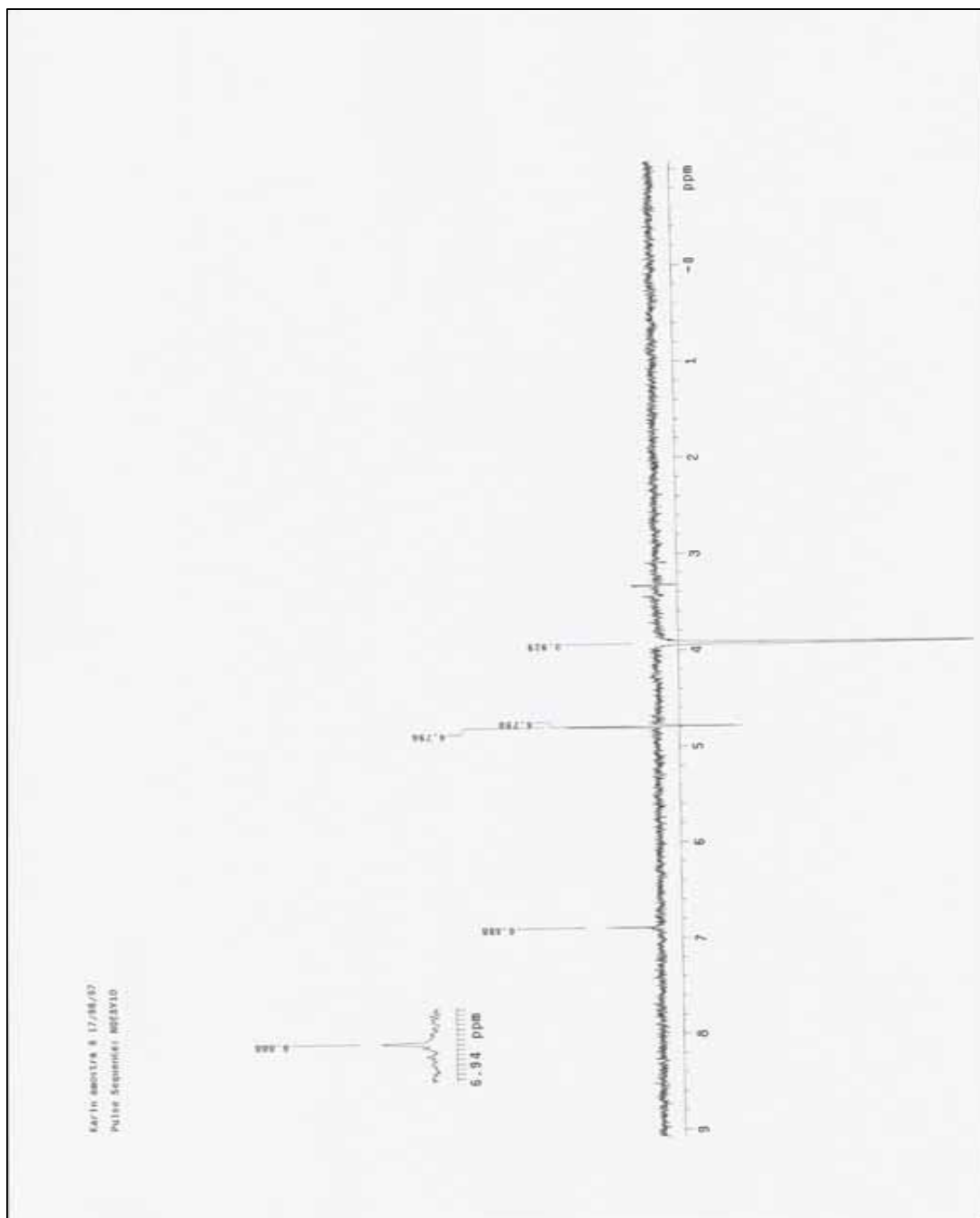


Anexo 26: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2..

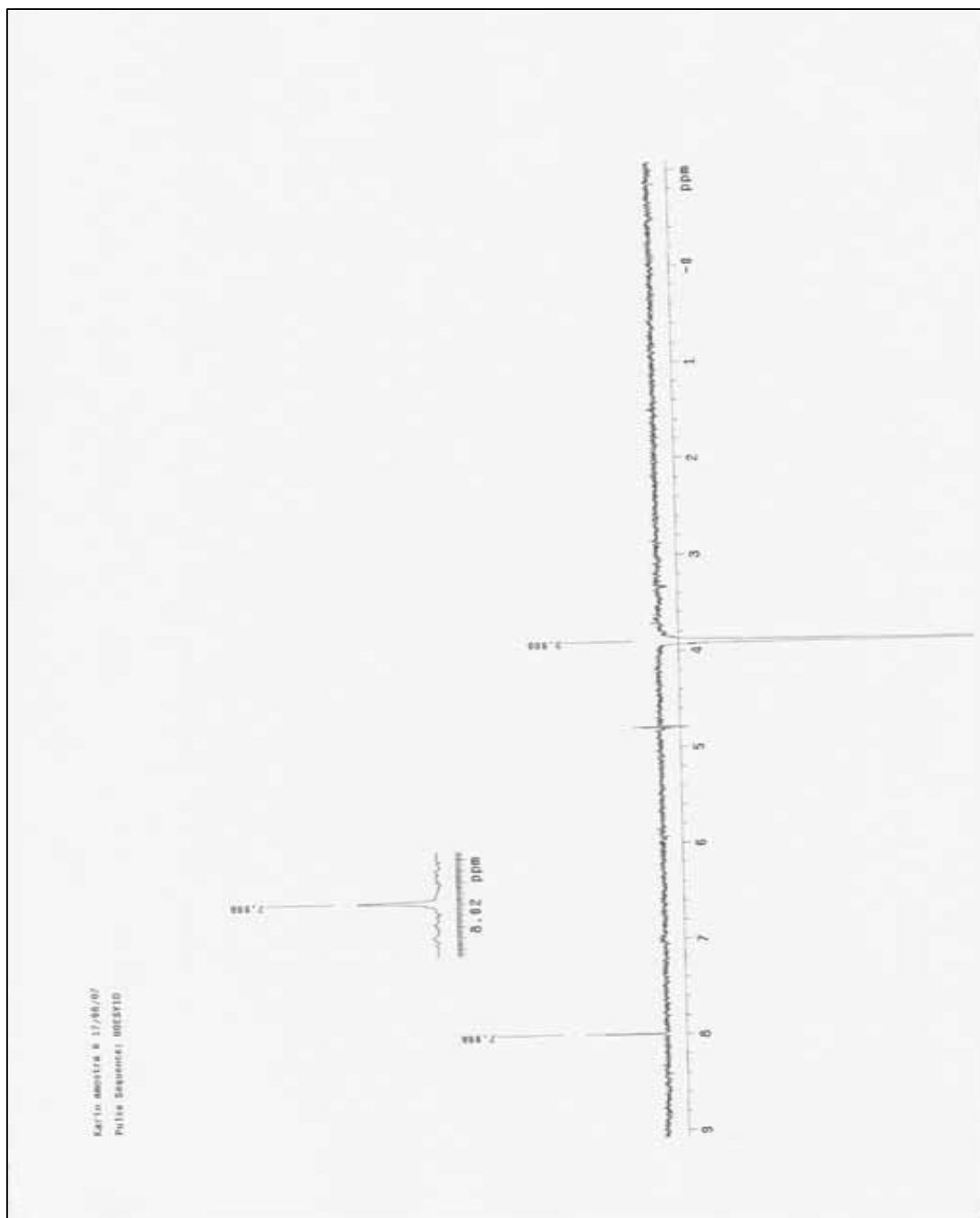
Anexo 27: Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.

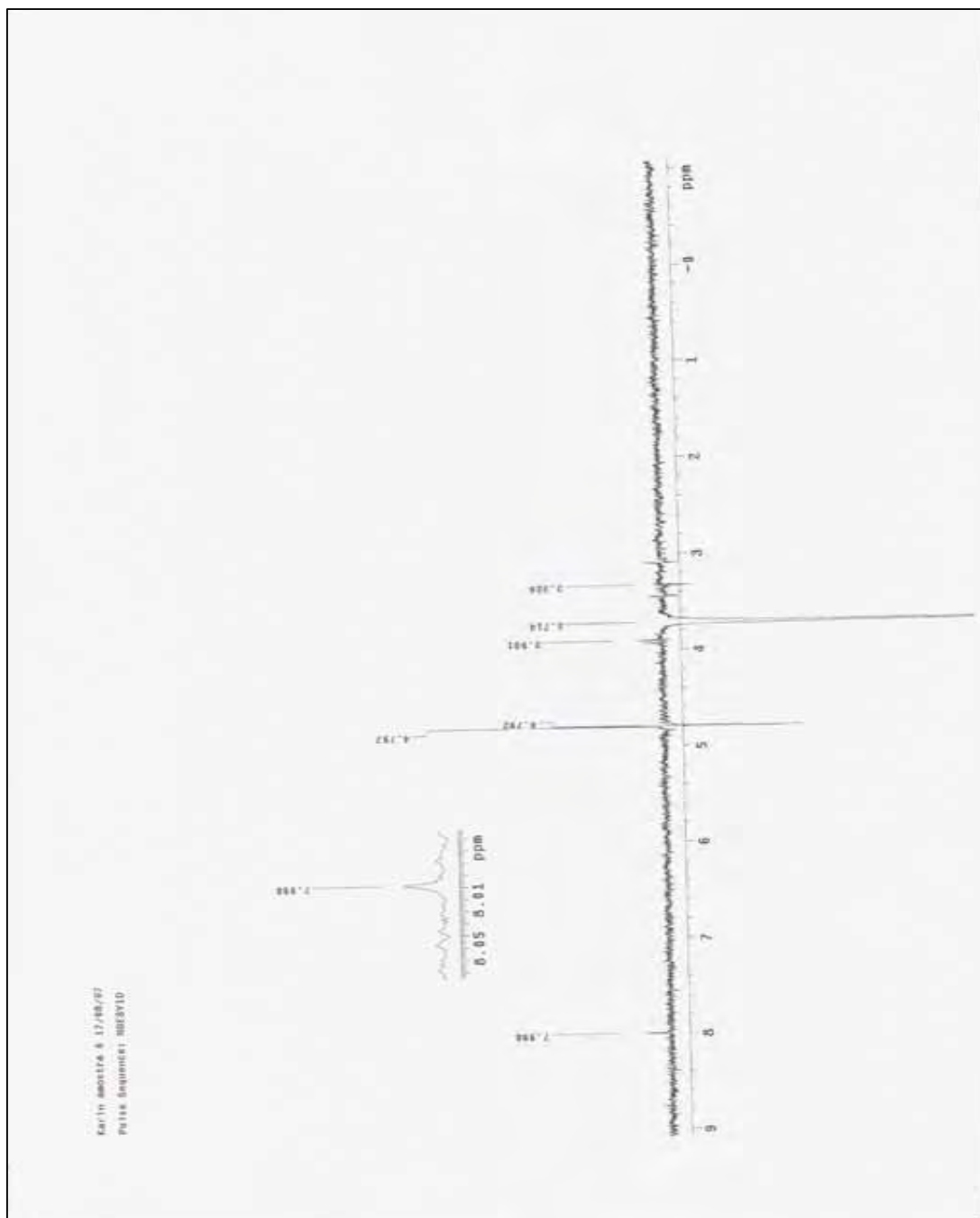


Anexo 28: Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.

Anexo 29: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,93.

Anexo 30: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,90.



Anexo 31: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 3,71.

Anexo 32: Espectro de NOE da substância 2 com irradiação em δ 6,86.