



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

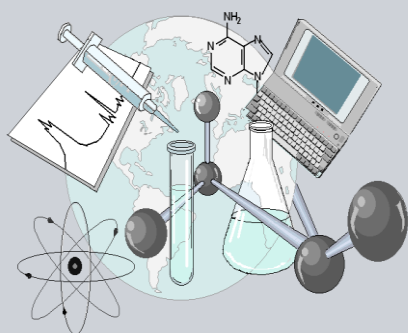
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo químico, caracterização e otimização da síntese de acil-homosserina lactonas presentes em *Saccharum X officinarum*, e seus possíveis efeitos na produtividade da planta.**

Tese apresentada por *Vanessa Guimarães Alves* ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, JANEIRO/2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo químico, caracterização e otimização da síntese de acil-homosserinas lactonas presentes em *Saccharum X officinarum*, e seus possíveis efeitos na produtividade da planta.**

**Vanessa Guimarães Alves**

**Orientador: Prof.º. Dr.º. Armando Mateus Pomini**

**Maringá, Janeiro/2016**

*Á minha mãe amada Alaide e ao meu querido esposo Diogo pelo apoio e amor ofertado, com todo carinho dedico.*

## ***Agradecimentos***

*Á Deus pela vida.*

*Á minha mãe Alaide Lemos Guimarães, a qual tornou possível a realização de mais um sonho, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e por todo amor e carinho ofertado.*

*Ao meu querido esposo Diogo José Olher, que nos momentos de dificuldade esteve ao meu lado, me apoiando com seu amor e carinho.*

*Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Armando Mateus Pomini, pela efetiva orientação durante o desenvolvimento deste trabalho e por contribuir amplamente em minha formação científica.*

*Á Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleuza Conceição da Silva, por contribuir significativamente para a minha formação científica e pelos conhecimentos transmitidos.*

*Aos demais professores da UEM da área de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Silvana, Débora, Jesui, Emerson e Maria Helena pelos conhecimentos transmitidos.*

*Aos funcionários do Departamento de Química, Moacir, Frimel, Cristiane e Claudemir pela disponibilidade e auxílio prestados.*

*Á Ivânia pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e pela amizade.*

*Aos professores do Departamento de Bioquímica, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese Filho e Aline Finger pelos testes de atividade de promoção de crescimento realizados e pelos conhecimentos de bioquímica transmitidos.*

*Aos meus queridos amigos de laboratório Mariana Passos, Gredson Keif, Emanuelle, Ane, Mayara, Nagela, José Eduardo, Vagner, Alan e Rafael Ferraz de Arruda, pelos momentos de alegria e incentivo.*

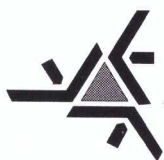
*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.*

*É melhor tentar ainda em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.*

*“Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver”. Martin Luther King*



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Vanessa Guimarães Alves**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 29 de janeiro de 2016.

**COMISSÃO JULGADORA:**

.....  
**Prof. Dr. Armando Mateus Pomini**  
PRESIDENTE - DQI/UEM

.....  
**Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin**  
MEMBRO - DQI/UEM

.....  
**Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos**  
MEMBRO - DBQ/UEM

.....  
**Prof. Dr. Francisco de Assis Marques**  
MEMBRO - UFPR

.....  
**Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira**  
MEMBRO - UFG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A474e Alves, Vanessa Guimarães  
Estudo químico, caracterização e otimização da síntese de acil-homosserina lactonas presentes em *Saccharum X officinarum*, e seus possíveis efeitos na produtividade da planta / Vanessa Guimarães Alves. - Maringá, 2016.  
xviii, 219 f. : il. (algumas color.), figs., tabs., esquemas

Orientador: Prof. Dr. Armando Mateus Pomini.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cleuza Conceição da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

1. *Saccharum X officinarum* - Flavonoides. 2. *Saccharum X officinarum* - (±)-N-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona. 3. Quorum-sensing. 4. Acil-homosserina lactona. I. Pomini, Armando Mateus, orient. II. Silva, Cleuza Conceição da, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 23.ed. 547

AMMA-003115

## RESUMO

Tese de Doutorado

Autora: Vanessa Guimarães Alves

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Armando Mateus Pomini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleuza Conceição da Silva

Este estudo se concentra no estudo de acil-homosserina lactonas presentes nas folhas e colmos da espécie *S. X officinarum* e seus possíveis efeitos nos tecidos da planta. As acil-homosserina lactonas (AHLs) são substâncias mensageiras responsáveis pela comunicação química entre as bactérias Gram negativas através de um mecanismo chamado de *Quorum sensing*. Tendo em vista a busca por alternativas capazes de aumentar a produtividade da cana-de-açúcar, uma importante cultura agrícola, este trabalho teve como objetivos isolar e identificar semioquímicos da classe das acil-homosserina lactonas presentes nas folhas e colmos de cana-de-açúcar, otimizar a síntese de acil-homosserina não substituídas e substituídas, avaliar os possíveis efeitos de ganho de produtividade ou ciclo de crescimento na administração das substâncias sintéticas em cultivos de cana-de-açúcar (cultivares SP80-3280 e RB96-6928) e avaliar a toxicidade das substâncias testadas através de microscopia eletrônica de varredura. Este estudo propiciou a identificação do semioquímico ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona através de análises em CG-EM nas folhas e colmos da espécie *S. X officinarum* relatado pela primeira vez nesta espécie. A partir desse resultado, dez derivados foram sintetizados através de otimização de metodologia presente na literatura, a saber (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona e seu enantiômero (*S*), (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homosserina lactona e seu enantiômero (*S*), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homosserina lactona e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(octanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona e (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona. As estruturas dos produtos foram confirmadas através da análise dos dados espectrais de RMN e CG-EM dos produtos. Os ensaios de avaliação de estímulo de crescimento em cana-de-açúcar realizados com as substâncias sintéticas demonstraram significativos aumentos de crescimento de radículas em colmos tratados com as substâncias sintéticas.



As análises de MEV das radículas tratadas com as acil-homosserina lactonas demonstraram que as concentrações não tóxicas são de 0,1 e 0,5 mg/L. Este trabalho constituiu-se de dois tópicos relacionados às substâncias provenientes do metabolismo secundário de *Saccharum X officinarum*. Visando a ampliação dos estudos químicos e farmacológicos para esta espécie, o presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas e colmos de *S. X officinarum*, bem como avaliar a atividade antiproliferativa para extratos, frações e substâncias puras provenientes desta espécie. Este estudo conduziu ao isolamento de onze substâncias: o flavonoide *tricin*, os ácidos fenólicos *trans-p*-hidroxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, vanilínico e ferúlico, os esteróides estigmasterol, sitosterol, campesterol e daucosterol, o  $\alpha$ -tocoferol e o tetraterpeno  $\beta$ -caroteno. A avaliação da atividade antiproliferativa mostrou que o extrato bruto acetato de etila e fração acetato de etila foram pouco seletivos emoderadamente ativos frente às linhagens de células cancerígenas testadas.

**Palavras-Chave:** *Saccharum X officinarum*, flavonoides, *quorum-sensing*, acil-homosserina lactona, ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona

---

**ABSTRACT**

This work focused on the study of acyl-homoserine lactones (AHL) in the leaves and stems of the species *S. X officinarum* and its possible effects on plant tissues. The AHLs are chemical messenger substances responsible for communication between the Gram-negative bacteria through a mechanism called quorum-sensing. In order to search for alternatives that increase the productivity of sugarcane, an important crop, this study aimed to isolate and identify semiochemicals of the class of AHL in the leaves and stems of sugarcane, optimize the synthesis of unsubstituted and substituted. Finally, the possible productivity gain effects or growth cycle changes in the administration of synthetic substances in sugarcane crops (SP80-3280 and RB96-6928 varieties) was evaluated, as well as the toxicity of substances tested. Scanning electron microscopy analyses of the roots were also performed. This study led to the identification of the semiochemical ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoyl)-homoserine lactone via GC-MS analyses. This is the first report of the presence of this class of substances in this species and the first isolation procedure carried out. From this result ten derivatives were synthesized, namely (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoyl)-homoserine lactone and its enantiomer (*S*), (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoyl)-homoserine lactone and its enantiomer (*S*), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoyl)-homoserine lactone and (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoyl) -homoserina lactone, (*R*)-*N*-(hexanoyl)-homoserine lactone, (*R*)-*N*-(octanoyl)-homoserine lactone, (*R*)-*N*-(decanoyl) homoserina lactone and (*R*)-*N*-(dodecanoyl) -homoserina lactone. The structures of the products were confirmed by analysis of the spectral data of NMR and GC-MS. Growth stimulation evaluation were performed with sugarcane and synthetic substances, showing significant growth changes of rootlets and stalks. The SEM analysis of rootlets treated with the AHLs shown that these substances are non-toxic at low concentrations (0.1 and 0.5 mg / L). This study also aimed to isolate and identify the main secondary metabolites present in the leaves and stems of *S. X officinarum*, and to evaluate the antiproliferative activity to extracts, fractions and pure substances from this species against human cancer cell lines. This study led to the isolation of eleven substances: the flavonoid tricetin, *p*- phenolic acids: *p*-hydroxycinnamic, *p*-hydroxybenzoic, ferulic and vanillic, the steroids stigmasterol, sitosterol, campesterol and daucosterol and the tetraterpenes  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene. The evaluation of antiproliferative activity showed that the crude extract and ethyl acetate fraction were active against some tested cancer cell lines.

**Keywords:** *Saccharum X officinarum*, flavonoids, *quorum-sensing*, acyl-homoserine lactone, ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoyl)-homoserine lactone

## SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Esquemas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xvii
Acil-HSL      Acil-homosserina lactona	xvii
Introdução geral	1
Produtos Naturais e a Química Medicinal	1
Produtos do metabolismo secundário e a comunicação química	4
1    Introdução	7
1.1    A Comunicação Química	7
1.2    Comunicação bacteriana	9
1.3    Identificação de sinalizadores químicos da classe das acil-homosserinas lactonas em bactérias Gram negativas e a expressão fenotípica	13
1.4    Possíveis efeitos fisiológicos de acil homosserinas lactonas em plantas hospedeiras	15
1.5    Importância econômica da cana-de-açúcar	16
1.6    Família Poaceae	18
1.7    Gênero <i>Saccharum</i> L.	21
1.8 <i>Saccharum X officinarum</i> .	22
1.9    Câncer	28
1.9.1    Tratamento e cura do câncer	30
1.10    Flavonoides	31
2    Objetivos	34
3    Parte Experimental	35
3.1    Material e Métodos	35
3.1.1    Identificação de acil homosserinas lactonas presentes nas folhas e colmos da espécie <i>Saccharum X officinarum</i> .	38
3.1.2    Síntese de acil-homosserina lactonas	40
3.1.2.1    Síntese de acil-homosserinas lactonas com o grupo carbonila na posição 3' da cadeia lateral (1-5a).	40

3.1.2.2	Síntese de acil-homosserinas lactonas sem o grupo carbonila na posição 3' da cadeia lateral.....	41
3.2	Bioensaio de atividade de promoção do crescimento em cana-de-açúcar	42
3.3	Tratamento Estatístico	44
3.4	Estudo Químico das folhas e colmos de <i>Saccharum X officinarum</i> .	45
3.4.1	Coleta do Material Vegetal	45
3.4.2	Obtenção do extrato bruto acetato de etila de <i>Saccharum X officinarum</i>	45
3.4.3	Isolamento dos Principais Constituintes Químicos das folhas e colmos de <i>Saccharum x officinarum</i>	45
3.4.3.1	Estudo da fração acetato de etila SOA .....	45
3.4.3.2	Estudo da fração hexânica SOH .....	60
4	Bioensaio para a avaliação da atividade antiproliferativa de extratos e frações de <i>Saccharum X officinarum</i> contra células cancerosas humanas	63
5	Resultados e discussão	64
5.1	Identificação de acil homosserinas lactonas presentes nas folhas e colmos da espécie <i>Saccharum X officinarum</i> .	64
5.2	Síntese de acil-homosserina lactonas	68
5.2.1	Síntese de acil-homosserina lactonas com grupo carbonila na posição 3'	69
5.2.2	Síntese das acil-homosserinas lactonas de cadeia linear saturada	80
5.3	Determinação da rotação ótica específica das acil-homosserina lactonas sintetizadas	87
5.4	Bioensaio de atividade de promoção do crescimento em cana-de-açúcar	89
5.5	Determinação Estrutural dos Compostos Isolados	103
5.5.1	Compostos fenólicos	103
5.5.1.1	Composto S4.....	103
5.5.1.2	Composto S7.....	112
5.5.1.3	Composto S8.....	113
5.5.1.4	Compostos S9+S10.....	116
5.5.2	Terpenoides e esteroides	120
5.5.2.1	Mistura de compostos S1+S2+S3.....	120
5.5.2.2	Composto S5.....	122
5.5.2.3	Composto S6.....	124
5.5.2.4	Composto S11 .....	126
6	Atividade Antiproliferativa	128
7	Conclusão	132

8	Referências	134
9	ANEXOS	153

### Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Bioensaio para a determinação do melhor procedimento para o bioensaio de atividade de promoção de crescimento em cana-de-açúcar (SP80-3280)

**Tabela 2:** Dados obtidos do fracionamento em gel de sílica do extrato bruto acetato de etila

**Tabela 3:** Dados obtidos do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração acetato de etila SOA

**Tabela 4:** Dados das frações reunidas provenientes do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração acetato de etila SOA.

**Tabela 5:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração SOA.6

**Tabela 6:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração SOA.6.16

**Tabela 7:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.9

**Tabela 8:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.9.5

**Tabela 9:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.10

**Tabela 10:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.12

**Tabela 11:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.16

**Tabela 12:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.17

**Tabela 13:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.18

**Tabela 14:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.19

**Tabela 15:** Dados da CC em gel de sílica da fração SOA.19.6

**Tabela 16:** Dados da CC em gel de sílica da fração SOA.19.9-11

**Tabela 17:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.20

**Tabela 18:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.23

**Tabela 19:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.24

**Tabela 20:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.25

**Tabela 21:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração hexânica SOH

**Tabela 22:** Dados das junções das frações obtidas no fracionamento da fração hexânica SOH

**Tabela 23:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HSQC para (R)-N-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona **2a**

**Tabela 24:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona **1a**

**Tabela 25:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homosserina lactona **3a**

**Tabela 26:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homosserina lactona **4a**

**Tabela 27:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona **5a**

**Tabela 28:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(octanoil)-homosserina lactona **2b**

**Tabela 29:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona **1b**

**Tabela 30:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona **3b**

**Tabela 31:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona **4b**

**Tabela 32:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para (*S*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona **5b**

**Tabela 33:** Rotação óptica específica ( $\alpha_{20}^D$ ) das acil-homosserina lactonas sintetizadas.

**Tabela 34:** Porcentagens de aumento ou inibição de crescimento de raiz e brotos na administração das substâncias **3a**, **4a**, **5a**, **3b**, **4b** na concentração de 0,5 mg/L.

**Tabela 35:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para *tricin* e para o composto **S4**

**Tabela 36:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o ácido vanilínico e para o composto **S7**

**Tabela 37:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o ácido ferúlico e para o composto **S8**

**Tabela 38:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a mistura **S9+S10** e para os compostos ácido *p*-hidroxicinâmico e *p*-hidroxibenzóico.

**Tabela 39:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a mistura **S1**, **S2** e **S3** e para os compostos sitosterol, estigmasterol e campesterol

**Tabela 40:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S5** e para o daucosterol

**Tabela 41:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S6** e para o  $\alpha$ -tocoferol

**Tabela 42:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S11** e para o  $\beta$ -caroteno

**Tabela 43.** Valores de  $\text{GI}_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para o extrato bruto acetato de etila, frações hexânica, acetato de etila e metanólica e para o flavonoide *tricin*.



### **Lista de Esquemas**

**Esquema 1:** Classificação de alguns semioquímicos de acordo com sua função.

**Esquema 2:** Obtenção das frações selecionadas para análise em CG-EM

**Esquema 3:** Rota de síntese para a preparação de acil homosserinas com o grupo carbonila na posição 3'. Pomini, 2009.

**Esquema 4:** Rota de síntese para a preparação de acil-homosserinas sem o grupo carbonila na posição 3'. Pomini, 2009.

---

**Lista de Figuras**

**Figura 1:** Princípio básico do mecanismo quorum-sensing, baseado na síntese e percepção de semioquímicos (acil-HSLs) produzidos por bactérias Gram negativas

**Figura 2:** Princípio básico do mecanismo quorum-sensing, baseado na síntese e percepção de semioquímicos (oligopeptídeos) produzidos por bactérias Gram positivas.

**Figura 3:** Acil-homosserina lactonas, principais substâncias sinalizadoras em bactérias Gram-negativas

**Figura 4:** Foto da espécie *Saccharum X officinarum*.

**Figura 5:** Regiões de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil

**Figura 6:** Estatísticas sobre fatores externos e internos causadores de câncer. Fonte: INCA, 2012.

**Figura 7:** Incidência de casos de câncer no Brasil a cada 100 mil habitantes entre os anos de 1990 e 2013. (Fonte de dados estatísticos: JAMA, 2015)

**Figura 8:** Esqueletos básicos de flavonoides

**Figura 9:** (a) Espécie *Salvia uliginosa*. (b) Espécie *Nymphaea caerulea*.

**Figura 10:** Acil-homosserinas lactonas com carbonila na posição 3' sintetizadas

**Figura 11:** Acil-homosserinas lactonas sem carbonila na posição 3' sintetizadas

**Figura 12:** Acil-homosserinas lactonas sintéticas com carbonila na posição 3' avaliadas no bioensaio de promoção de crescimento em cana-de-açúcar.

**Figura 13:** Acil-homosserinas lactonas sintéticas sem carbonila na posição 3' avaliadas no bioensaio de promoção de crescimento em cana-de-açúcar.

**Figura 14:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a fração SOA 17.7

**Figura 15:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a fração SOA 17.7

**Figura 16:** Proposta de fragmentos característicos de acil-homosserina lactonas por CG-EM (70 eV, IE)

**Figura 17:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o padrão ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona.

**Figura 18:** Mecanismo para a primeira etapa da síntese de acil-homosserinas substituídas na posição 3'.

**Figura 19:** Mecanismo para a segunda etapa da síntese de acil-homosserinas substituídas na posição 3'.

**Figura 20:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **1a**

**Figura 21:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **2a**

**Figura 22:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **3a**

**Figura 23:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **4a**

**Figura 24:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **5a**

**Figura 25:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2<sup>a</sup>**

**Figura 26:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2a**

**Figura 27:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2a**

**Figura 28:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125,5 MHz) de **2a**

**Figura 29:** Espectro de DEPT 135° de **2<sup>a</sup>**

**Figura 30:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para a **2a**

**Figura 31:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **1a**

**Figura 32:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **3a**

**Figura 33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **4a**

**Figura 34:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **5a**

**Figura 35:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125,5 MHz) de **1a**

**Figura 36:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **3a**

**Figura 37:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **4a**

**Figura 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,5 MHz) de **5a**

**Figura 39:** Mecanismo de síntese para acil-homosserinas sem substituíntes na cadeia lateral

**Figura 40:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **1b**

**Figura 41:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **2b**

**Figura 42:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **3b**

**Figura 43:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **4b**

**Figura 44:** Fragmentações típicas de acil-homosserina lactonas de cadeia linear saturada observadas para as substâncias **1b-4b**.

**Figura 45:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **2b**

**Figura 46:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **2b**

**Figura 47:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **2b**

**Figura 48:** Mapa de correlações heteronucleares HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) de **2b**

**Figura 49:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **1b**

**Figura 50:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **3b**

**Figura 51:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **4b**

**Figura 52:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **5b**

**Figura 53:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **1b**

**Figura 54:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **3b**

**Figura 55:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando imersão e irrigações com a substância (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona na concentração de 0,1 mg/L, variedade SP80-3280. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm).

**Figura 56:** Representações fotográficas de toletes de cana-de-açúcar (variedade SP803280) representativos para o controle (A), imersão com na solução de (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil) homosserina lactona (**2a**) (0,1 mg/L) e (B) imersão seguida de irrigações com a solução da substância **2a** (C)

**Figura 57:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando a substância (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L, variedade SP80-3280. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm).

**Figura 58:** Microscopia eletrônica de varredura para radículas não expostas a substância **2a** (Controle) (A); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,1 mg/L (B); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,5 mg/L (C); tratadas com a substância **2a** na concentração de 1,0 mg/L (D); tratadas com a substância **2a** na concentração de 5,0 mg/L (E); 50  $\mu\text{m}$ ; Variedade SP80-3280.

**Figura 59:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona (**2a**) e o enantiômero (*S*) (**1a**) na concentração de 0,5 mg/L, variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm).

**Figura 60:** Microscopia eletrônica de varredura para radículas não expostas a substâncias **1a** e **2a** (Controle) (A); tratadas com a substância **1a** na concentração de 0,5 mg/L (B); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,5 mg/L (C); 50  $\mu\text{m}$ ; Variedade RB96-6928.

**Figura 61:** Valores absolutos e inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homosserina lactona (**3a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homosserina lactona (**4a**) e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona (**5a**), (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**3b**) e (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona (**4b**) na concentração de 0,5 mg/L,

variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm).

**Figura 62:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(decanoil)-homoserinalactona (**3b**) e o enantiômero (*S*) (**5b**) na concentração de 0,5 mg/L, variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm).

**Figura 63:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **S4**

**Figura 64:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para **S4**

**Figura 65:** Expansão da região de  $\delta_{\text{H}}$  6,20 a 6,60 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz)

**Figura 66:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para **S4**

**Figura 67:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S4**

**Figura 68:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S4**

**Figura 69:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S4**

**Figura 70:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S7**

**Figura 71:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para **S7**

**Figura 72:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,5 MHz) para **S7**

**Figura 73:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S7**

**Figura 74:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S7**

**Figura 75:** Espectro de NOE para **S7**

**Figura 76:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S8**

**Figura 77:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para **S8**

**Figura 78:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para **S8**

**Figura 79:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S8**

**Figura 80:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S8**

**Figura 81:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S8**

**Figura 82:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura de substâncias **S9+S10**

**Figura 83:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S10**

**Figura 84:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S9**

**Figura 85:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para a mistura **S9+S10**

**Figura 86:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para a mistura **S9+S10**

**Figura 87:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para a mistura **S9+S10**

**Figura 88:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{Hx}^1\text{H}$ ) para a mistura **S9+S10**

**Figura 89:** Principais correlações observadas no mapa de contornos COSY ( $^1\text{Hx}^1\text{H}$ ) para **S9**

**Figura 90:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ ) para a mistura de substâncias **S9+S10**

**Figura 91:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ ) para a mistura de substâncias **S9+S10**

**Figura 92:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S9**

**Figura 93:** Principais correlações observadas no mapa de contornos COSY ( $^1\text{Hx}^1\text{H}$ ) para **S10**

**Figura 94:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura de compostos **S1+S2+S3**

**Figura 95:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S1**

**Figura 96:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S2**

**Figura 97:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S3**

**Figura 98:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) para a mistura de compostos **S1+S2+S3**

**Figura 99:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (a)/DEPT 90° (b) e 135° (c) ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45 MHz) para a mistura de compostos **S1+S2+S3**

**Figura 100:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S5**

**Figura 101:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para o composto **S5**

**Figura 102:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,5 MHz) para o composto **S5**

**Figura 103:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S6**

**Figura 104:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300,06 MHz) para o composto **S6**

**Figura 105:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz) para o composto **S6**

**Figura 107:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300,06 MHz) para o composto **S11**

**Figura 108:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz) para o composto **S11**

**Figura 109:** Porcentagem de crescimento de células tumorais e não tumorais humanas versus a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio de avaliação de atividade antiproliferativa para (a) extrato bruto, (b) fração acetato de etila e (c) tricina.

**Figura 110:** Porcentagem de crescimento de células tumorais e não tumorais humanas versus a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio de avaliação de atividade antiproliferativa para (d) fração hexânica, (e) fração metanólica.

### **Lista de Símbolos e Abreviaturas**

<b>Acil-HSL</b>	Acil-homosserina lactona
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ )
<b>d</b>	Dupleto
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>DEPT</b>	Distortionless enhancement by polarization transf.
<b>HSQC</b>	heteronuclear multiple quantum coherence
<b>HMBC</b>	heteronuclear multiple bond coherence
<b>Hz</b>	Hertz
<b>m</b>	Multipeto
<b>MHz</b>	Megahertz
<b><i>m/z</i></b>	Relação massa por carga
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
<b>s</b>	Simpleto
<b>t</b>	Tripleto
<b>td</b>	Tripleto de dupletos
<b><math>\delta</math></b>	Deslocamento químico
<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>	Deslocamento químico de carbono-13
<b><math>\delta_{\text{H}}</math></b>	Deslocamento químico de hidrogênio





## Introdução geral

### Produtos Naturais e a Química Medicinal

A natureza contém de um precioso acervo de substâncias biotivas que são fontes de inspiração e aprendizado (Veigas & Bolzani, 2002). Mesmo considerando o expressivo avanço da química sintética, as substâncias provenientes de fungos, bactérias, organismos marinhos e plantas continuam atuando como protótipos de substâncias ativas farmacologicamente para diversas áreas da Química, especialmente a medicinal e a da agricultura (Barreiro *et al.*, 1997).

Terminada a Revolução industrial, a indústria farmacêutica intensificou pesquisas para o desenvolvimento e produção de fármacos sintéticos (Gilani & Rahman, 2005). Contudo, os Produtos Naturais permanecem exercendo papel de destaque na descoberta de novos medicamentos (Yunes & Filho, 2012). As substâncias provenientes da natureza possuem três características difíceis de se obter por métodos convencionais de síntese em laboratório, complexidade e diversidade estrutural (Yunes & Filho, 2012) e pureza enantiomérica (Gilani & Rahman, 2005).

A complexidade e diversidade estrutural surgem da evolução biológica. Plantas, fungos e bactérias comumente biossintetizam substâncias (metabólitos secundários) com o objetivo de adaptar-se ao meio (Yunes & Filho, 2012), de proteger-se contra agentes patogênicos e de comunicar-se intra e interespecies (Vidal & Bauman, 1997). Neste aspecto, centenas de anos de evolução tem formado um amplo arsenal de moléculas complexas, as quais, evidentemente, são difíceis serem obtidas por métodos sintéticos (Yunes & Filho, 2012).

Adicionalmente, a obtenção de protótipos bioativos enantiomericamente puros tem sido alvo de pesquisas na área da química medicinal e agroquímica (Barreiro *et al.*, 1997), que buscam desenvolver métodos de síntese e biotransformações (Duran *et al.*, 200) capazes de fornecer produtos enantiomericamente puros. Os seres vivos são essencialmente formados por moléculas orgânicas enantiomericamente puras e em consequência são capazes de reconhecer e diferenciar pares de enantiômeros. Em função disso, a atividade dos fármacos depende fundamentalmente de sua estrutura química e de seu reconhecimento e metabolização no organismo. Neste sentido, os

produtos naturais ainda são considerados a maior fonte de substâncias quirais farmacologicamente ativas (Barreiro *et al.*, 1997).

Em 2014, o *Center for Drug & Evaluation and Research* (CDER), agência responsável pela aprovação de novos medicamentos nos Estados Unidos da América aprovou para comercialização 41 novos fármacos, dentre os quais 11 são oriundos de Produtos Naturais e 2 foram inspirados nos alcaloides escopolamina e morfina (Santos *et al.*, 2015). Uma significativa parcela dos fármacos aprovados destina-se ao tratamento do câncer ou a combater os efeitos causados pela quimioterapia e de doenças causadas por bactérias. Estima-se que a indústria farmacêutica brasileira fature aproximadamente 25% com medicamentos oriundos de plantas (Santos *et al.*, 2015).

O uso de Produtos Naturais tem se destacado nos tratamentos convencionais ou alternativos e na prevenção de várias enfermidades (Cordell *et al.*, 2001). Doenças do fígado como hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular atingem mais de 10% da população mundial (Mishra & Tiwari, 2011) e tem como principal forma de tratamento os biofármacos (Zhang *et al.*, 2013). Estudos têm reportado que o flavonoide naringenina, metabólito secundário presente em espécies da família Fabaceae, pode ser útil na prevenção e desenvolvimento da fibrose hepática (Zhang *et al.*, 2013). Compostos pertencentes às classes das cumarinas (Yu *et al.*, 2011), dos iridoides (Ma *et al.*, 2011) e antraquinonas (Guo *et al.*, 2002) também têm demonstrado expressivos efeitos hepatoprotetores.

No campo da oncologia houve um expressivo avanço nas pesquisas com produtos naturais a partir do século XX objetivando desenvolver fármacos seletivos e com baixa toxicidade. Este avanço propiciou o desenvolvimento de diversas substâncias antineoplásicas usadas atualmente. De fato, aproximadamente 60% dos agentes anticâncer disponíveis no mercado são provenientes de fontes naturais (Newman & Cragg, 2007; Butler, 2008; Harvey, 2008), os quais se destacam os alcaloides vincristina e vimblastina presentes em *Catharanthus roseus*, a lactona sesquiterpênica paclitaxel isolada de *Taxus brevifolia*, as lignanas podofilotoxina, etoposídeo e teniposídeo isoladas de *Podofillum peltatum* (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Para esses medicamentos é previsto uma movimentação anual de aproximadamente de 60 bilhões de dólares (Pinto *et al.*, 2002).

Modificações estruturais através de semi-síntese de produtos naturais bioativos, visando aumentar o potencial farmacológico também têm se mostrado uma ferramenta importante na descoberta de novos fármacos anticâncer (Vandresen *et al.*, 2014).

Contudo, muitos tipos de câncer ainda respondem de forma moderada aos protocolos clínicos existentes e, portanto torna-se imprescindível descobrir e introduzir novas formas terapêuticas antineoplásicas (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). No Brasil muitos grupos de pesquisas tem utilizado a bioprospecção como ferramenta rápida para a descoberta de novas moléculas com potencial anticâncer, sendo que esta estratégia tem conduzido a um expressivo número de moléculas promissoras (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, os metabólitos secundários provenientes da natureza também têm demonstrado potencial terapêutico contra a *Leishmaniose* (Almeida *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2014). Considerada a maior doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde com expressivos impactos políticos, econômicos e sociais, a *Leishmaniose* distribui-se por mais de 90 países atingindo a marca de 1,5 a 2,0 milhões de novos casos por ano (Who, 2015). Os agentes quimioterapêuticos utilizados contra as manifestações da *Leishmaniose* são compostos antimoniais pentavelantes, os quais são extremamente tóxicos, além disso, apresentam limitações como altos custos e forma de administração (Croft & Olliaro, 2011; Tempone *et al.*, 2011; Singh & Sundar, 2012)

No Brasil, muitas plantas medicinais tem sido utilizadas pela população de classe baixa como principal modalidade de tratamento contra a *Leishmaniose*, muitas vezes sem base científica. Entretanto nos últimos anos, muitos trabalhos têm reportado efeitos leishmanicida para plantas brasileiras (Santin *et al.*, 2009; Albernaz *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2013; Antinarelli *et al.*, 2015).

Produtos do metabolismo secundário também são essencialmente importantes para o tratamento da tuberculose, uma doença respiratória causada pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Mesmo considerada erradicada, acredita-se que um terço da população mundial esteja infectado com o agente causador da tuberculose, sendo assim um grande problema de saúde pública, principalmente se associada a doenças como a AIDS (Arruda *et al.*, 2012). Diversas classes de metabólitos secundários provenientes de plantas têm apresentado significativos efeitos antimicobacterianos contra a bactéria causadora da tuberculose (Okunade *et al.*, 2004; Mcgaw *et al.*, 2008), incluindo os flavonoides (Murillo *et al.*, 2003).

Considerando a magnitude e a diversidade do potencial biológico apresentado pelos produtos naturais nos últimos anos, aliado à rica e complexa e pouco explorada biodiversidade brasileira, pouco explorada até então, pesquisas com produtos naturais

visando obter moléculas bioativas são de suma importância para o desenvolvimento de medicamentos de alta seletividade e maior eficácia.

### **Produtos do metabolismo secundário e a comunicação química**

Diante da necessidade de investigar o comportamento e as relações entre os seres vivos a partir de interações moleculares, nasceu a Ecologia Química que consiste no estudo de substâncias químicas mediadoras de comunicação entre organismos.

Ao longo da evolução os seres vivos desenvolveram formas de comunicação química característica, utilizada para a transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou indivíduos de espécies distintas. Neste contexto, os sinais químicos desempenham um papel significativo na transmissão de informações biologicamente importantes (Nordlund & Lewis, 1976). A comunicação química entre indivíduos é feita por meio de substâncias de baixa massa molecular biossintetizadas pelo organismo e excretadas para o ambiente pelo emissor, sendo que na maioria dos casos essas substâncias são provenientes do metabolismo secundário. O sinal do emissor provoca uma resposta do indivíduo receptor, a qual pode ser imediata ou a longo prazo, alterando seu comportamento ou a sua fisiologia. Essas substâncias mensageiras são chamadas de semioquímicos (Whitehead *et al.*, 2001).

Os semioquímicos são divididos em duas classes principais, os feromônios e os aleloquímicos. Os feromônios são substâncias que permitem que indivíduos da mesma espécie se reconheçam, e têm como principais objetivos a reprodução, a marcação territorial e a sincronização de atividades em populações (Nordlund & Lewis, 1976). Em contra partida, os aleloquímicos são substâncias químicas que provocam efeitos entre indivíduos de espécies distintas. Nos últimos anos a importância da alelopatia, ciência que estuda os aleloquímicos, tem sido evidenciada devido ao seu valioso potencial herbicida e a sua baixa toxicidade (Waterman & Mole, 1994).

Assim como insetos, plantas e animais, as bactérias endofíticas, presentes nos tecidos vegetais, também utilizam os semioquímicos na sua comunicação, sendo fundamentais para a sobrevivência e desenvolvimento desses organismos. Desta forma, a literatura relata diversos exemplos de bactérias que não sobrevivem como células independentes, mas como microrganismos coloniais que exploram sistemas elaborados

de comunicação intercelular para facilitar sua adaptação às mudanças das condições ambientais (Whitehead *et al.*, 2001; Eberhard *et al.*, 1981).

O mecanismo de comunicação intercelular entre bactérias, que torna esses microrganismos capazes de perceber e responder a estímulos do meio ambiente, ou até mesmo provocar mudanças fisiológicas em populações bacterianas vizinhas é chamado de quorum-sensing, um processo amplamente difundido entre diversos gêneros de bactérias. Esse processo consiste na produção de um semioquímico de baixa massa molecular, cuja concentração extracelular está relacionada à densidade populacional do microrganismo produtor (Whitehead *et al.*, 2001).

O semioquímico pode ser detectado pelas células e isto permite a população como um todo iniciar uma ação coordenada, uma vez atingida uma densidade populacional crítica. Isto pode ser de vital importância, por exemplo, em infestações patogênicas (Fast, 2003), formação de biofilme, motilidade, esporulação, nodulação das raízes bem como a produção de bioluminescência e antibióticos.

Diversas classes químicas de semioquímicos foram identificadas em bactérias. Entretanto, elas podem ser classificadas em dois grupos, os aminoácidos e peptídeos de cadeia pequena empregados por bactérias *Gram*-positivas, e os derivados de ácidos graxos, especialmente as acil-homosserina lactonas empregadas por bactérias *Gram*-negativas. As acil-homosserinas lactonas são  $\alpha$ -amino-lactonas com uma cadeia lateral saturada ou insaturada, a qual pode conter diferentes estados de oxidação na posição 3'.

Além da comunicação inter-espécie, nos últimos anos, tem sido reportado na literatura que compostos da classe das acil-homosserinas lactonas (AHLs) causam efeitos significativos no crescimento e desenvolvimento de plantas (Rad *et al.*, 2008; Schugger *et al.*, 2006; Joseph & Phillips, 2003).

Os efeitos fisiológicos e os mecanismos de ação desses compostos têm sido investigados principalmente na espécie *Arabidopsis thaliana*, espécie daninha cujo genoma foi completamente sequenciado (Delatorre & Silva, 2008). Em um estudo realizado por Castro-Ortíz e colaboradores (2008) foi demonstrado que acil-homosserinas lactonas com cadeia lateral acila de 4 a 14 carbonos afetam significativamente o crescimento de raízes primárias em *A. thaliana* promovendo aumento no desenvolvimento do vegetal. Neste mesmo trabalho foi verificado que o composto ( $\pm$ )-*N*-(decanoil)-homosserina lactona apresenta maior potencial de promoção de crescimento que as demais acil-homosserinas avaliadas. Evidências preliminares sobre o mecanismo de ação pelo qual as acil-homosserinas atuam foi reportado por Rad

e colaboradores (2008) que demonstraram aumento nos níveis de auxinas e citocininas nas raízes de *A. thaliana* após tratamento com ( $\pm$ )-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona.

Um mecanismo de ação mais detalhado foi recentemente reportado por Palmer e colaboradores (2014). Eles demonstraram que a resposta de *A. thaliana* a acil-homosserinas está associada à enzima de degradação hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH), comum em espécies vegetais e conhecida pela capacidade de hidrolizar compostos que possuem a função amida, incluindo as AHLs. Adicionalmente, foi reportado neste trabalho que AHLs de cadeia longa são mais facilmente hidrolizadas pela enzima (FAAH) e, portanto demonstraram maior potencial de aumento no crescimento de raízes primárias de *A. thaliana*. Além disso, foi reportado que o composto (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona foi mais ativo que seu enântiômero (*R*).

Ademais, efeito de proteção contra agentes patogênicos tem sido observado para as AHLs (Wagner *et al.*, 2006).

Diante da importância da busca por novos metabólitos secundários com atividades farmacológicas e potencial mediador de comunicação entre espécies, e o interesse do nosso grupo de pesquisa em estudar espécies comercialmente importantes foi realizado o presente trabalho que constituiu-se de dois tópicos relacionados às substâncias provenientes do metabolismo secundário. O primeiro tópico trata-se do estudo químico e avaliação da atividade antiproliferativa de extrato e frações de *Saccharum X officinarum*. *Saccharum X officinarum* é conhecida popularmente como cana-de-açúcar e representa uma das maiores culturas agrícolas do Brasil. Além de seu amplo aproveitamento comercial, a literatura relata propriedades medicinais para esta espécie como anti-hipertensiva, diurética, e anticâncer, as quais estão relacionadas aos colmos, parte da planta utilizada pela população na preparação de sucos. Compostos fenólicos são largamente encontrados em *Saccharum X officinarum*, onde os mais comuns pertencem à classe dos flavonoides e de ácidos fenólicos. O segundo tópico se concentra no isolamento, caracterização e síntese de acil-homosserinalactonas presentes nas folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum*, bem como, na avaliação da atividade promotora de crescimento das substâncias sintéticas e avaliação da toxicidade dessas substâncias aos tecidos de *S. X officinarum* através de microscopia eletrônica de varredura.

## 1 Introdução

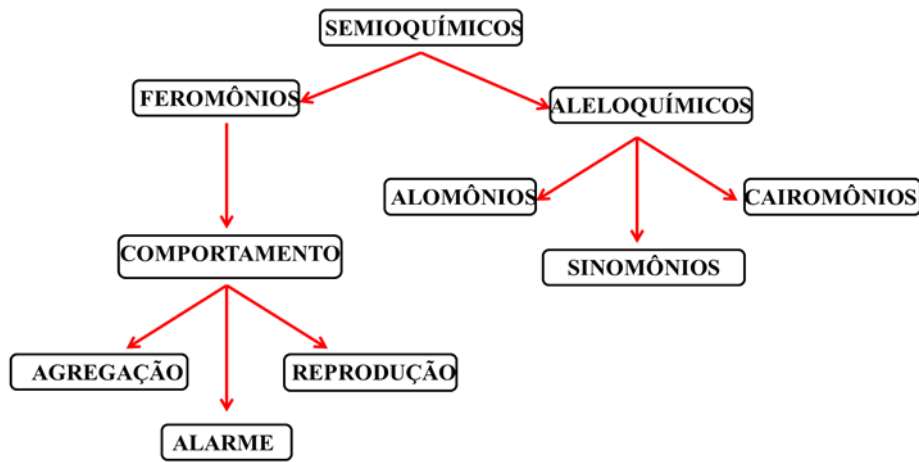
### 1.1 A Comunicação Química

Em um ambiente, onde há diversos organismos vivos que interagem entre si, pode ser benéfico para uma determinada espécie estabelecer efetiva comunicação entre os indivíduos garantindo a sobrevivência. A comunicação entre os organismos vivos que compõem um ecossistema pode ocorrer, basicamente, em três formas distintas: visuais, químicas, ou mecânicas (Greenfiel, 2002). Dentre essas formas, a comunicação química ocorre em todos os níveis bióticos, desde a regulação de tecidos, estruturas celulares e órgãos que constituem um organismo, até as interações ecológicas entre indivíduos (Penn, 2006).

Assim mediante o interesse no comportamento e as relações entre os seres vivos a partir de interações moleculares, nasceu a Ecologia Química que consiste no estudo de substâncias químicas mediadoras de comunicação entre organismos (Eisner & Meinwald, 1995). A comunicação química entre indivíduos é feita por meio de substâncias de baixa massa molecular biossintetizadas pelo organismo e excretadas para o ambiente. O sinal do indivíduo produtor provoca uma resposta do indivíduo receptor, a qual pode ser imediata ou a logo prazo, alterando seu comportamento ou a sua fisiologia de forma vantajosa ou desvantajosa. Essas substâncias mensageiras são chamadas de semioquímicos (Trigo *et al.*, 2000).

Os semioquímicos (do grego *semeion* = sinal) podem ser classificados mediante sua função intraespecífica (feromônios) ou interespecífica (aleloquímicos). Os feromônios podem ser subdivididos de acordo com a função que desempenham (reprodução, de alarme, de trilha, procura por alimento, agregação, entre outros). No entanto, os aleloquímicos são classificados em cairomônios, alomônios e sinomônios, sendo esta classificação relativa aos custos e benefícios provocados no indivíduo emissor e receptor. Os cairomônios provocam respostas positivas somente para o indivíduo receptor e incluem sinais utilizados para a localização de presas ou seleção de hospedeiro. Os alomônios apresentam benefícios para o indivíduo emissor e correspondem a sinais utilizados para camuflagem e defesa. Já os sinomônios provocam respostas positivas para ambos emissores e receptores, e normalmente estão relacionados a interações simbióticas (Nordlund & Lewis, 1976). (**Esquema 1**).



**Esquema 1:** Classificação de alguns semioquímicos de acordo com sua função.

Esta classificação tem como critério principal a origem dos sinais, o que pode torná-la confusa quando houver interações que envolvam mais de dois níveis tróficos. Assim, na década de 90, Dicke e Sabelis (1988) inferiram o termo infoquímicos, ao invés de semioquímicos, no qual foi considerado o critério de emissor que não era considerado na definição de semioquímicos, onde somente o organismo produtor do sinal era considerado (Trigo *et al.*, 2000). Este termo é especialmente útil quando os infoquímicos são produzidos por microorganismos e coordenam interações entre outros dois organismos.

Os sinais químicos são produzidos através do metabolismo do organismo produtor, o qual pode ser classificado em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário constitui-se de rotas biossintéticas responsáveis pela biossíntese ou degradação de substâncias de alta massa molecular importantes para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, tais como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, entre outros. Normalmente, as substâncias provenientes do metabolismo primário são comuns à maioria dos organismos e são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos no reino. Entretanto, o metabolismo secundário representa as vias sintéticas responsáveis pela biossíntese de substâncias de baixa massa molecular envolvidos nas interações químicas, proteção do organismo contra agentes externos, tais como flavonoides, triterpenos, alcaloides, ácidos fenólicos, cumarinas, entre outros (Morgan, 2010). Outra característica importante é que as substâncias

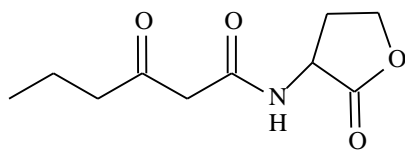
provenientes do metabolismo secundário são restritas sob o ponto de vista taxonômico (Berenbaum, 1995).

## 1.2 Comunicação bacteriana

Assim como insetos, plantas e animais, as bactérias também utilizam os semioquímicos na sua comunicação, sendo fundamentais para a sobrevivência e desenvolvimento de alguns desses organismos. Desta forma, a literatura relata diversos exemplos de bactérias que não sobrevivem como células independentes, mas como microrganismos coloniais que exploram sistemas elaborados de comunicação intercelular para facilitar sua adaptação às mudanças das condições ambientais (Whitehead *et al.*, 2001).

O mecanismo de comunicação intercelular entre bactérias, que torna esses microrganismos capazes de perceber e responder a estímulos do ecossistema, ou até mesmo provocar mudanças fisiológicas em populações bacterianas vizinhas é chamado de quorum-sensing (QS), um processo amplamente difundido entre diversos gêneros de bactérias. Esse processo consiste na produção de um semioquímico de baixa massa molecular, cuja concentração extracelular está relacionada à densidade populacional do microrganismo produtor. O semioquímico pode ser detectado pelas células através de proteínas receptoras específicas e isto permite a população como um todo iniciar uma ação coordenada, uma vez atingida uma densidade populacional crítica. Tal resposta pode estar relacionada, por exemplo, à expressão de genes responsáveis por fatores fenotípicos essenciais para a sobrevivência celular. Isto pode ser de vital importância, por exemplo, em infestações patogênicas, onde a produção de fatores de virulência prematuramente (em baixas densidades celulares) pode alertar os sistemas de defesa do hospedeiro minimizando as chances de infestação bem sucedida (Fuqua *et al.*, 1994; Gray & Garey, 2001; Reading & Sperandio, 2006).

O sistema QS foi primeiramente descrito em *Vibrio fischeri*, uma bactéria simbiote e luminescente que coloniza um organismo eucariótico proporcionando bioluminescência ao seu hospedeiro (Nealson *et al.*, 1970). A produção de bioluminescência depende da expressão do *operon* da luciferase, que acontece quando a densidade populacional é alta o bastante para atingir um acúmulo do semioquímico, neste caso uma acil-homoserina lactona (AHL) (1) (Eberhard *et al.*, 1981)



1

O gene *luxI* controla a produção de AHLs, que ao atingir a concentração crítica forma um complexo com a proteína LuxR e ativa a expressão dos genes alvo através da ligação ao *operon* da luciferase (Eberhard *et al.*, 1981). As proteínas homólogas LuxI e LuxR ocorrem amplamente em espécies de *proteobacterias*, incluindo as bactérias oportunistas de animais e plantas (Parsek & Greenberg, 2000).

Além disso, tem sido observado que diversas espécies de bactérias possuem homólogos múltiplos de LuxI e LuxR permitindo a detecção ou produção de sinais distintos, os quais podem também conduzir a ativação de funções gênicas diferentes em resposta ao sinal (Sebahia & Jones, 1995).

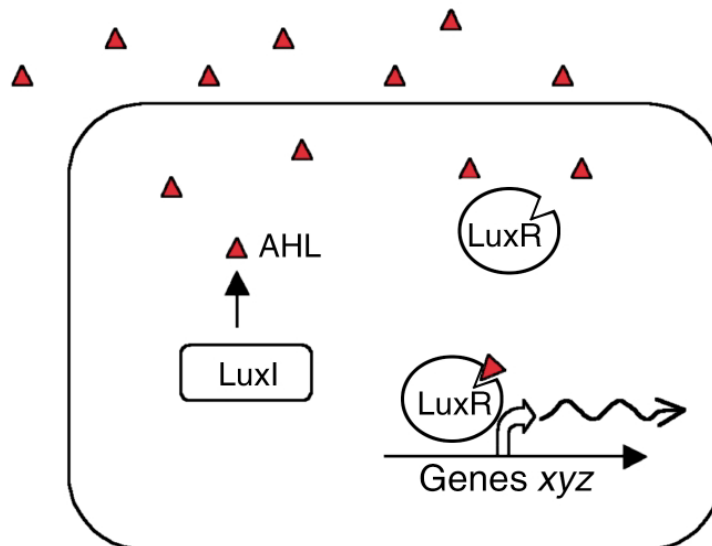
Neste contexto, o sistema de comunicação mediado por QS pode ser dividido em duas classes: LuxI/LuxR homólogos, empregados no sistema de comunicação de bactérias Gram negativas e os oligopeptídeos empregados no sistema de comunicação de bactérias Gram positivas. Em bactérias Gram negativas a proteína homóloga LuxL, codificada pelo gene *luxI*, é a enzima responsável pela síntese de semioquímicos, as acil-homoserinas lactonas (AHLs) (Pearson *et al.*, 1995).

Cada gênero de bactéria Gram negativa produz uma ou uma combinação única de AHLs (se houver mais que uma proteína homóloga LuxL) em nível ideal capaz de pemeas as membranas celulares por difusão ou transporte ativo (Pearson *et al.*, 1995). Quando a concentração crítica de AHLs é atingida, ou seja, quando a concentração extracelular é igual a concentração intracelular (citoplasmática) ocorre uma interação das AHLs com o fator de transcrição homólogo LuxR, anteriormente codificado pelo gene *luxR*, o qual também é responsável pela detecção das AHLs. O complexo LuxR-AHLs liga-se a elementos promotores específicos do DNA iniciando a expressão de genes alvos homólogos *xyz* que controlam amplas funções biológicas (Federle & Bassler, 2003), incluindo a produção de bioluminescência, de pigmentos e de antibióticos, ou a formação de biofilmes (Parsek & Greenberg, 2000). A combinação das AHLs com a proteína homóloga LuxR é amplamente específica e limita a comunicação interespecies em indivíduos que utilizam esse complexo na comunicação

celular. Ao longo dos anos, mais de 70 espécies de bactérias Gram negativas que utilizam no mecanismo de percepção do quorum os análogos LuxL/LuxR foram identificadas (Federle & Bassler, 2003)

A participação das AHLs no mecanismo de comunicação celular foi representado em um trabalho publicado por Fedeler e Bassler da Universidade de Princeton-USA, 2003, (**Figura 1**).

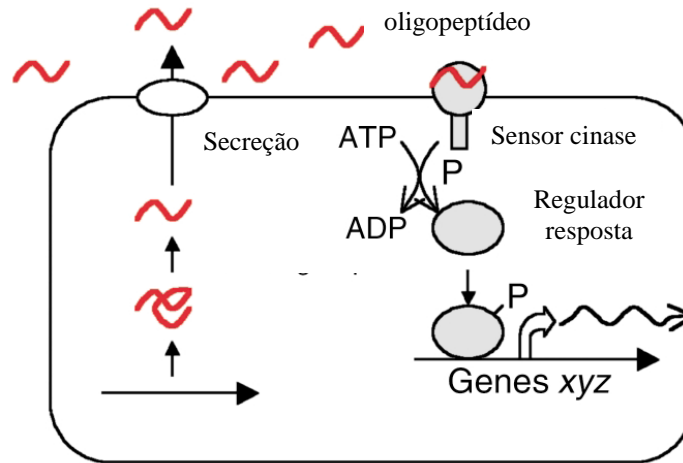
**Figura 1:** Princípio básico do mecanismo quorum-sensing, baseado na síntese e percepção de semioquímicos (acil-HSLs) produzidos por bactérias Gram negativas.



Fonte: Fedeler e Bassler, 2003.

Para as espécies de bactérias Gram positivas a comunicação bacteriana é mediada por oligopeptídeos, os quais consistem, tipicamente, na sequência de 5 a 17 aminoácidos (Lazazzera & Grossman, 1998). Diferente das AHLs, os oligopeptídeos não são permeáveis nas membranas celulares e necessitam ser carregados por transportadores de superfície celular para facilitar a emissão para o meio extracelular. O reconhecimento dos oligopeptídeos ocorre através de sistemas de transdução de dois componentes. Este mecanismo foi também representado no trabalho de Federle e Bassler, 2003. (**Figura 2**).

**Figura 2:** Princípio básico do mecanismo quorum-sensing, baseado na síntese e percepção de semioquímicos (oligopeptídeos) produzidos por bactérias Gram positivas.



Fonte: Fedeler e Bassler, 2003.

O mecanismo de dois componentes é responsável por reconhecer flutuações no ambiente externo e transduzir a informação para a célula (Madigan *et al.*, 2000). Esse mecanismo consiste em uma cascata de fosforilação envolvendo um sensor cinase e um par de regulador resposta. O sensor cinase possui resíduos de histidina e os reguladores de ácido aspártico, sendo esses resíduos sítios de fosforilação (Madingan *et al.*, 2000).

O sistema de dois componentes é variável e pode ser constituído de dois, três ou até quatro pares de proteínas. Normalmente o componente final do circuito, o regulador de resposta, é uma proteína que liga-se ao DNA, que quando é fosforilada modifica a transcrição dos genes alvo (Hakenbeck & Stock, 1996). Os oligopeptídeos atuam como ligantes para os sensores cinases e a cascata de fosforilação transmitindo informação em cadeia para a célula sobre a densidade populacional. A especificidade desse sistema de comunicação é conferida pelas diferenças entre as sequências de aminoácidos nos oligopeptídeos (Federle & Bassler, 2003).

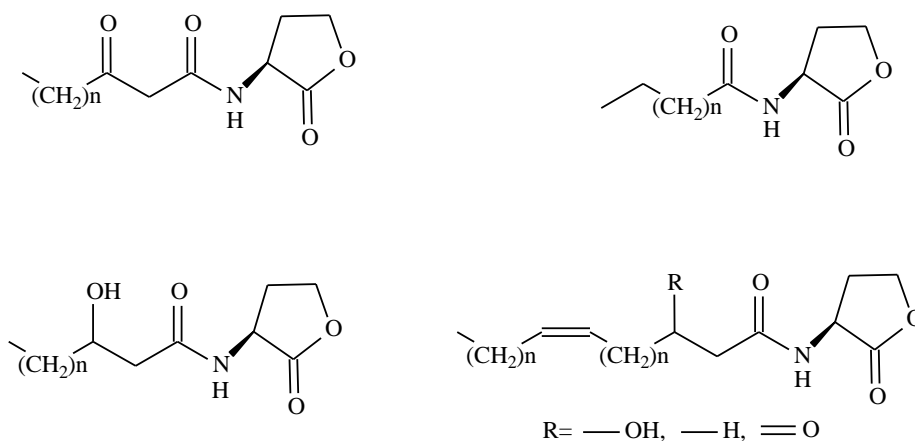
Atualmente sabe-se que elucidar os mecanismos de comunicação celular empregado pelas bactérias remete à evolução e fornece a medicina uma nova estratégia: silenciar a comunicação entre os agentes patogênicos resistentes a antibióticos impedindo um ataque eficaz (Dong *et al.*, 1998). Para a agricultura, pode-se silenciar a comunicação entre as bactérias causadoras de doenças em culturas agrícolas e impedir

baixa na produtividade (Pomini *et al.*, 2005; Pomini *et al.*, 2007). Além disso, pode-se estimular o sistema QS e conduzir a um aumento na fixação de nitrogênio e assim aumentar o crescimento e desenvolvimento de culturas economicamente importantes. Para a indústria alimentícia, pode-se aumentar a resistência de alimentos a determinados tipos de bactérias deteriorantes (Oliveira *et al.*, 2010).

### 1.3 Identificação de sinalizadores químicos da classe das acil-homosserinas lactonas em bactérias Gram negativas e a expressão fenotípica

A expressão fenotípica mediada por acil-homosserinas lactonas é empregada pelas bactérias Gram-negativas, geralmente, para responder às condições ambientais variáveis, tais como, pH, temperatura, radiação substâncias tóxicas, abundância de nutrientes, entre outros. As acil-homosserinas lactonas, metabólitos característicos de gêneros específicos de bactérias, são  $\alpha$ -amino-lactonas com uma cadeia lateral saturada ou insaturada, a qual pode conter substituintes (carbonila ou hidroxila na posição 3') (Figura 3).

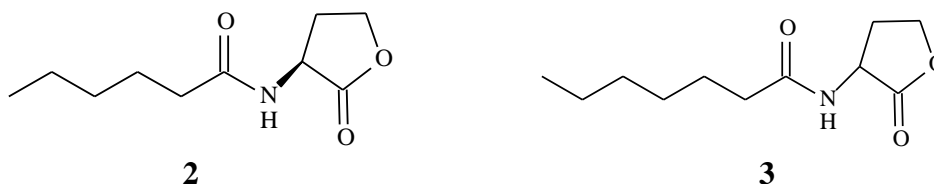
**Figura 3:** Acil-homosserina lactonas, principais substâncias sinalizadoras em bactérias Gram-negativas



As acil-homosserinas lactonas são derivadas dos ácidos graxos e, portanto, são biossintetizadas a partir da via do acetato. A biossíntese dos ácidos graxos é bem estabelecida em *Escherichia coli*, pelo complexo ácido graxo sintase (Lehninger, 1995). O grupo acetato (unidade C<sub>2</sub>) geralmente é o iniciador da cadeia acila e posteriormente

novas unidades C<sub>2</sub> são inseridas pelo ataque nucleofílico do malonato ativado por descarboxilação. Esse fato confere as moléculas de AHLs um número par de átomos de carbono. No entanto, recentemente foi relatado a presença do metabólito *N*-heptanoil-HSL na espécie *Pantoea ananatis*, sendo este relato inédito na literatura (Pomini *et al.*, 2005). A presença dessa substância também é relatada para a espécie *Sinorhizobium leguminosarum*, a qual participa do mecanismo de formação de nódulos em leguminosas, bem como na espécie *Serratia marcescens* onde controla a síntese do antibiótico que confere com vermelha as suas colônias bacterianas (Horng *et al.*, 2002; Lithgow *et al.*, 2000). A identificação da *N*-heptanoil-HSL nas espécies bacterianas citadas acima foi realizada por análises de CG-EM e CLAE-EM-EM e por comparação do padrão de fragmentação e co-injeção com o produto sintético.

Em *Erwinia psidii* R, um fitopatogêno da espécie *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, foram identificadas os sinalizadores *S*-(-)-*N*-hexanoil (**2**) e pequenas quantidades de *N*-(heptanoil) homosserina lactona (**3**). Neste estudo destaca-se a determinação da configuração absoluta para a substância *S*-(-)-*N*-hexanoil homosserina lactona, resultado que corrobora com a literatura, a qual demonstra que AHLs naturais possuem preferencialmente configuração *S* (Pomini *et al.*, 2005).



Muitos estudos têm mostrado que a cana-de-açúcar pode conter uma ampla variedade de microrganismos que colonizam seus tecidos de forma simbiótica, sendo que vários pertencem a gêneros reconhecidamente produtores de acil-homosserina lactonas. Dentre esses microrganismos, a literatura reporta bactérias pertencentes aos gêneros *Glucoacetobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, os quais são agentes simbióticos fixadores de nitrogênio e assim podem influenciar no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar (Assis *et al.*, 2000; Boddey *et al.*, 1991; Boddey *et al.*, 1995). Adicionalmente, outros agentes fixadores de nitrogênio são reportados, tais como *Enterobacter*, *Pantoea*, *Kluyvera*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (Mendes *et al.*, 2007; Magnani *et al.*, 2010). Dentre esses gêneros, vários

são conhecidos por produzir acil-homosserina lactonas, especialmente o gênero *Azospirillum* (Vial *et al.*, 2006). Neste sentido, as espécies de *Glucoacetobacter* também se destacam devido a capacidade em biossintetizar diversas AHLs. O estudo químico de extratos de culturas bacterianas dessa espécie mostrou a presença de acil-homosserinas lactonas saturadas *N*-hexanoil-HL, *N*-octanoil-HL, *N*-decanoil e os derivados carbonilados *N*-(3-oxo-decanoil)-HL e *N*-(3-oxo-dodecanoil)-HL (Nieto-Penalver *et al.*, 2012). No entanto, até o presente momento, não há relatos na literatura de isolamento dessas substâncias a partir de extratos de cana-de-açúcar. Vários estudos com o objetivo de caracterizar AHLs em tecidos vegetais têm sido reportados na literatura. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa observou que biossensores baseado em células mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) foram capazes de detectar AHLs em extratos das folhas de *Zea mays* infectadas por *Pantoea agglomerans* (Pomini *et al.*, 2007). O mesmo fenômeno foi previamente reportado em ervilhas (Teplitski *et al.*, 2000).

#### **1.4 Possíveis efeitos fisiológicos de acil homosserinas lactonas em plantas hospedeiras**

Nos últimos anos, tem sido reportado na literatura que compostos da classe das acil-homosserinas lactonas (AHLs) causam efeitos significativos no crescimento e desenvolvimento de plantas (Rad *et al.*, 2008; Schuegger *et al.*, 2006; Joseph & Phillips, 2003). Os efeitos fisiológicos e os mecanismos de ação desses compostos têm sido investigados principalmente na espécie *Arabidopsis thaliana*, espécie daninha cujo genoma foi completamente sequenciado (Delatorre & Silva, 2008). Em um estudo realizado por Castro-Ortíz e colaboradores (2008) foi demonstrado que acil-homosserinas lactonas com cadeia lateral acila de 4 a 14 carbonos afetam significativamente o crescimento de raízes primárias em *A. thaliana* promovendo aumento no desenvolvimento do vegetal. Neste mesmo trabalho foi verificado que o composto ( $\pm$ )-*N*-(decanoil)-homosserina lactona apresenta maior potencial de promoção de crescimento que as demais acil-homosserinas avaliadas. Evidências preliminares sobre o mecanismo de ação pelo qual as acil-homosserinas atuam foi reportado por Rad e colaboradores (2008) que demonstraram aumento nos níveis de auxinas e citocininas nas raízes de *A. thaliana* após tratamento com ( $\pm$ )-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona.



Um mecanismo de ação mais detalhado foi recentemente reportado por Palmer e colaboradores (2014) que demonstraram que a resposta de *A. thaliana* a acil-homosserina lactonas está associada à enzima de degradação hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH), comum em espécies vegetais e conhecida pela capacidade de hidrolizar compostos que possuem a função amida, incluindo as AHLs. Adicionalmente, foi reportado neste trabalho que AHLs de cadeia longa são mais facilmente hidrolizadas pela enzima (FAAH) e, portanto demonstraram maior potencial de aumento no crescimento de raízes primárias de *A. thaliana*. Além disso, foi reportado que o composto (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona foi mais ativo que seu enantiômero (*R*). Ademais, efeito de proteção contra agentes patogênicos tem sido observado para as AHLs (Wagner *et al.*, 2006).

### 1.5 Importância econômica da cana-de-açúcar

Atualmente a produção de açúcar e álcool no Brasil provém da fermentação de caldos obtidos de hidrídios multiespecíficos pertencentes ao gênero *Saccharum*, o qual denomina-se *Saccharum x officinarum*, conhecida popularmente como cana-de-açúcar (Macedo *et al.*, 2008).

Normalmente a cana-de-açúcar se propaga de forma assexuada por secções de toletes contendo uma ou mais gemas. Historicamente a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo o principal tipo de biomassa energética base para o agronegócio sucroalcooleiro. Na safra de 2012/13 a produção de açúcar atingiu a marca de 38,3 milhões de toneladas, sendo que há estimativa de ter havido crescimento de 6,9% para a safra de 2013/14. Com relação a produção de etanol, na safra de 2012/13 foram produzidos 23,6 bilhões de litros com previsão de um incremento de 14,9 % para a safra de 2013/14. Esses dados tornam nosso país o maior produtor de açúcar do mundo e segundo no ranking de produção de etanol (Companhia Nacional de Abastecimento, 2015; Paula *et al.*, 2009). No Estado do Paraná, onde grande parte do mercado consumidor de etanol é abastecido através de produção própria, representa uma das maiores culturas do setor agrícola, nucleada em diversas usinas (privadas ou cooperadas) localizadas nas regiões norte e noroeste do Estado. Devido ao expressivo interesse comercial por esse produto agrícola aliado à necessidade de produzir alimentos com qualidade e quantidade para satisfazer a demanda mundial, o desenvolvimento de novos compostos capazes de aumentar a produtividade desta

cultura tem sido alvo de diversas áreas da ciência como Agronomia, Química, Bioquímica e Ecologia entre outras.

Neste contexto, os fertilizantes são de longa data uma ferramenta utilizada na agricultura com o intuito de fornecer nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos produtos agrícolas. Os fertilizantes são compostos que fornecem nitrogênio, potássio, oxigênio, cálcio, enxofre, fósforo e magnésio aos vegetais e são considerados macronutrientes (nutrientes necessários em grande quantidade às plantas). Geralmente os fertilizantes são classificados em minerais, orgânicos ou mistos. Os fertilizantes minerais são constituídos apenas por nitrogênio, fósforo e potássio e possuem fácil absorção, os orgânicos são dejetos de animais e possuem absorção lenta, e finalmente os fertilizantes mistos são constituídos pela combinação de fertilizantes fosfatados, nitrogenados ou potássicos. O uso dessas substâncias pode promover um acréscimo de até 50% na produtividade dos produtos agrícolas (Lopes & Guilherme, 2007). Contudo, a utilização de fertilizantes pode resultar em um aumento de elementos-traço no ambiente, prejudiciais à saúde humana caso ocorram em níveis tóxicos. Os elementos-traço no solo podem contaminar águas superficiais ou subsuperficiais ou ainda se acumular em plantas em concentrações tóxicas aos animais e seres humanos sem causar efeitos no crescimento das plantas (Gimeno-Garcia *et al.*, 1996). Os elementos arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio são exemplos de contaminantes considerados maléficos. Esses elementos em fertilizantes são derivados das matérias-primas usadas na produção do insumo ou são adicionados no processo de fabricação (Hooda, 2010). Assim, Alternativas como a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos vem sendo utilizadas para diminuir ou substituir o uso de fertilizante (insumo) (Hungria, 2011).

Outra técnica que busca a ação biológica dos fertilizantes sem riscos de toxicidade é o uso de fitorreguladores. Estudos sobre a utilização de fitorreguladores vegetais, como auxinas, giberilinas e citocininas almejando o controle fisiológico com a finalidade de acelerar o crescimento das plantas têm mostrado bons resultados. Entretanto, o uso de auxinas para promover o crescimento de *S. officinarum* tem mostrado desvantagens (Buenaventura & Rosário, 1978; Castro *et al.*, 1975). Há relatos na literatura sobre respostas discordantes de variedades de cana-de-açúcar frente ao uso de reguladores auxinas, sendo que algumas variedades não apresentam efeitos consideráveis sobre o crescimento. Outro fator desvantajoso seria a concentração ideal

de aplicação, uma vez que concentrações que aumentam o crescimento das partes aéreas tendem a inibir o crescimento radicular.

Neste contexto, nos últimos anos o interesse dos pesquisadores tem se voltado para o estudo de microrganismos simbiotes de plantas, visando promover o crescimento de culturas agrícolas. Desta forma, observar os mecanismos microbiológicos envolvidos no crescimento de *S. X officinarum* pode ser a chave para diminuir o tempo entressafras e tornar este setor mais rentável.

## 1.6 Família Poaceae

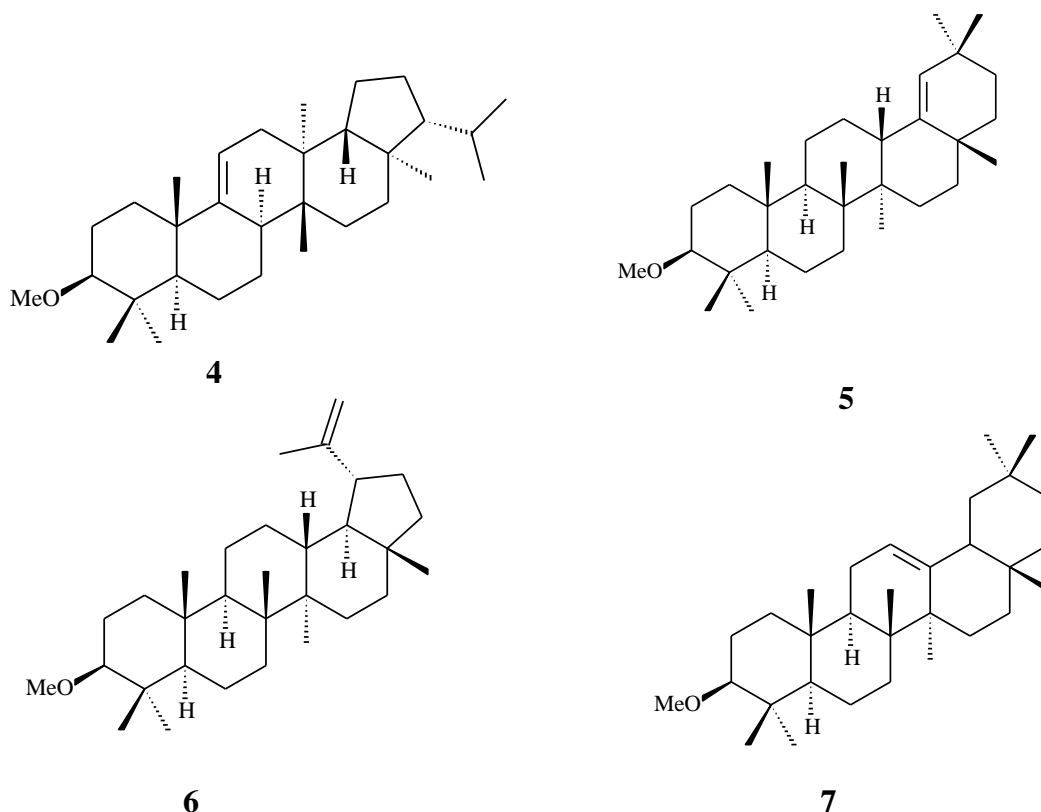
A família Poaceae, anteriormente conhecida como Graminae, destaca-se devido a sua grande importância econômica. Fornecedora de grãos, formas de alimentos mais cultivados e consumidos em todo mundo, tais como arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum sp. pl.*), bem como combustíveis e açúcar (*Saccharum ssp.*), esta família é constituída por 790 gêneros e cerca de 10000 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais. No Brasil, são conhecidas cerca de 1370 espécies distribuídas em todos os ecossistemas (Clayton & Renvoise, 1986). As espécies desta família apresentam-se, na maioria das vezes, como herbáceas, anuais ou perenes além de lenhosas como várias espécies de bambus. Além disso, abrange numerosas plantas ornamentais amplamente utilizadas em paisagismo como as diversas espécies de grama.

Além da importância econômica, investigações químicas realizadas com espécies da família Poaceae mostram a presença de metabólitos secundários com importantes potenciais farmacológicos como antiinflamatório, antioxidante, antimutagênico e anticarcinogênico. Triterpenos metil éteres e compostos fenólicos são os principais constituintes químicos presentes em espécies da família Poaceae, sendo que alguns trabalhos discutem a importância quimiotaxonômica dos triterpenos pentacíclicos para esta família (Ohmoto & Ikuse, 1970; Russell *et al.*, 1976).

Uma triagem fitoquímica realizada por Ohmoto e Ikuse (1970) com 56 espécies de diversos gêneros pertencentes a família Poaceae demonstrou a presença de triterpenos pentacíclicos da série dos oleananos, ursanos, hopanos, lupanos e dos arboranos, delineando a ampla distribuição dos triterpenos nesta Família.

Russell e colaboradores (1976) avaliaram a presença dos triterpenos arundoina (4), miliacina (5), éter metílico do lupeol (6) e éter metílico da  $\beta$ -amirina (7) em vinte

espécies do gênero *Chionochloa*, sendo constatada a presença destas substâncias em 12 das vinte espécies avaliadas.

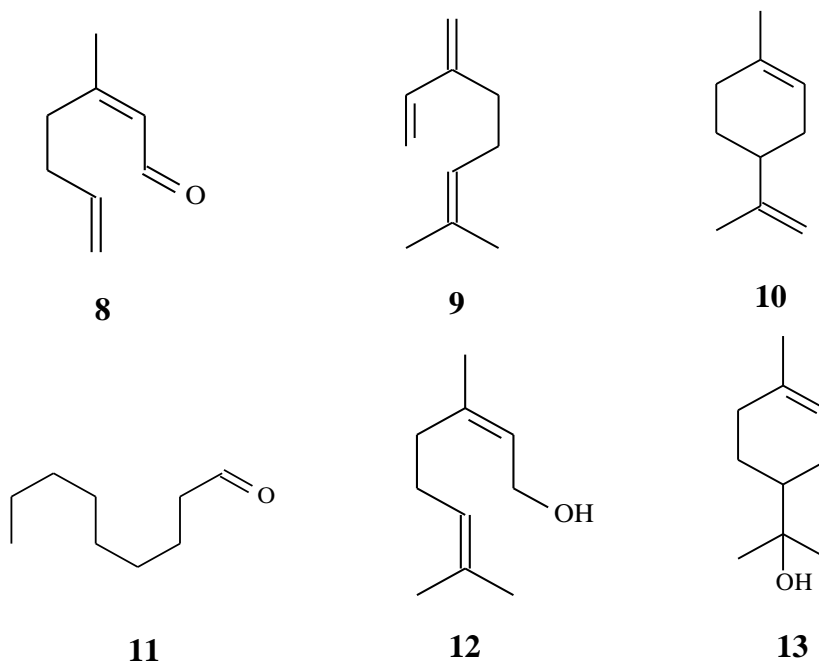


Para *Zea mays*, conhecida popularmente como milho e com reconhecida importância comercial, é reportada a presença de: flavonoides (Makrimovic & Kovscevic, 2003), esteroides (Abdel-Wahab *et al.*, 2002), alcaloides, fenóis, de terpenoides e de taninos (Solihah *et al.*, 2002). Recentemente, foi reportado por Solihah e colaboradores (2012) a presença de antraquinonas, além dos metabólitos citados acima. Além disso, para os metabólitos presentes em *Zea mays* tem sido observado notáveis potenciais farmacológicos incluindo efeitos sobre nefrite crônica, hiperplasia de próstata e cistite (Ribeiro *et al.*, 1988; Tahraoui *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi verificado que *Zea mays* é capaz de aumentar os níveis de insulina no sangue (Hu & Deng, 2011).

Em *Oryza sativa* (arroz) foram identificados compostos fenólicos como os ácidos ferúlico, benzóico, hidroxicinâmico e diferulatos além de antocianinas e proantocianidinas. Além disso, têm sido reportadas as atividades antiinflamatória, antimutagênica, antioxidante e anticarcinogênica para este cereal (Maillard & Berset,

1995; Lloyd *et al.*, 2000; Liu, 2004; Prior *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2005; Soobrattee *et al.*, 2005; Mira *et al.*, 2008.

Além de cereais, a família Poaceae também se destaca por conter espécies ricas em óleos essenciais com extensivos potenciais farmacológicos, incluindo a espécie *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como “erva-cidreira”. Na medicina popular esta erva é amplamente utilizada na forma de infusões para o tratamento de hipertensão, distúrbios estomacais e nervosos, e tem emprego na indústria alimentícia como matéria-prima para a fabricação de chás (Carvalho *et al.*, 2005). Além disso, seu óleo essencial, rico em citral, é utilizado como flavorizante e aromatizante, sendo utilizado na fabricação de fitoterápicos, cosméticos e inseticidas. Além do citral (**8**), mirceno (**9**), limoneno (**10**), nonanal (**11**), nerol (**12**) e terpinol (**13**) são os principais componentes presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Abegaz & Yohannes, 1983; El fattah *et al.*, 1992; Carriconde *et al.*, 1996).



Para esta espécie também é reportado à presença de flavonoides (Dematouschek & Sathlbiskup, 1991), saponinas (D’Mello *et al.*, 1991) e alcaloides (Souza *et al.*, 1991).

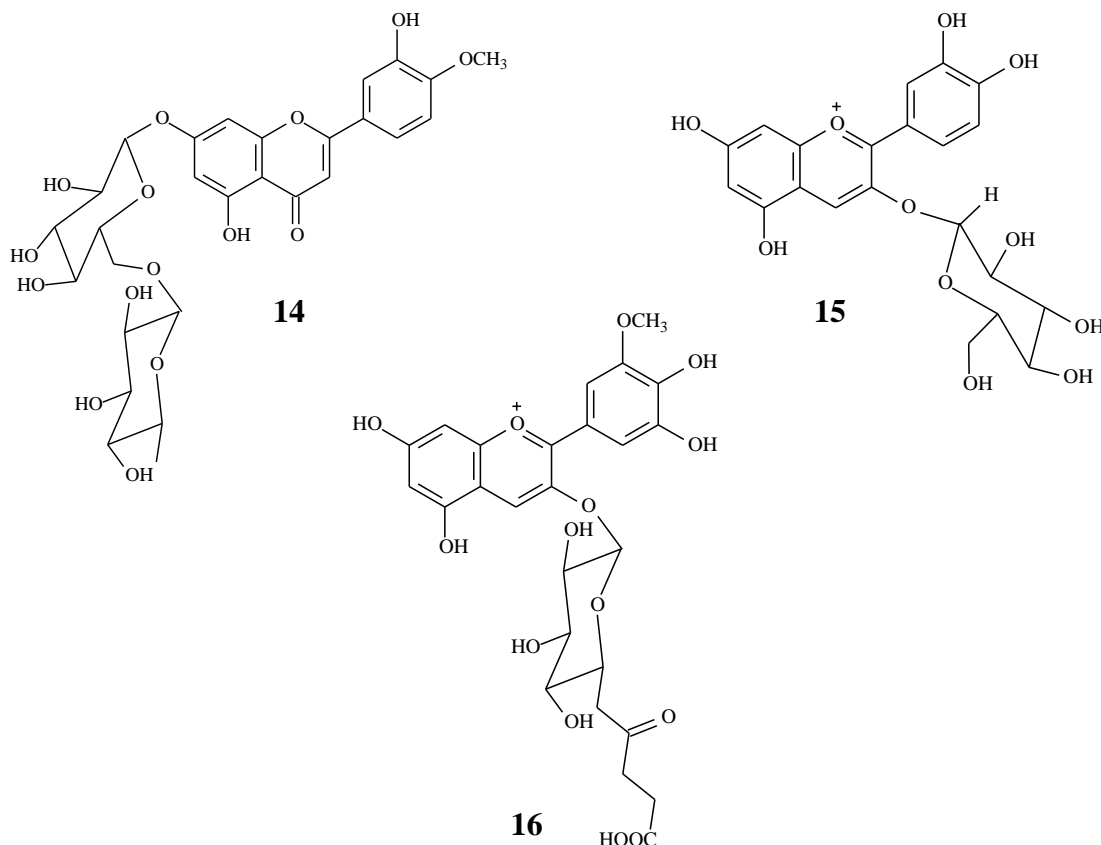
Diversas propriedades farmacológicas foram relatadas para “erva-cidreira”, dentre as quais se destacam os potenciais antimicrobiano (Fiori *et al.*, 2000), analgésico (Viana *et al.*, 2000), sedativo (Blanco *et al.*, 2007) e anticancerígeno (Balboa & Lim, 1995).

### 1.7 Gênero *Saccharum* L.

O gênero *Saccharum* L. é constituído de 32 espécies conhecidas e catalogadas, dentre as quais seis espécies são consideradas mais importantes e utilizadas em melhoramentos genéticos por possuírem características de resistência e alta produtividade, quais sejam: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. sinensis* Roxb., *S. barberi* Jew., *S. robustum* Jew. e *S. edule* Hask (Landell & Bressiani, 2010). No entanto, somente as espécies *S. robustum* Jew. e *S. edule* Hask são consideradas puras e as demais são provenientes de híbridos, segundo Artchwager & Brandes (1958). Por muitos anos, a espécie *S. officinarum* L. foi utilizada como matéria-prima para a produção comercial de açúcar, entretanto outras espécies do gênero têm sido utilizadas na China e Índia para obtenção da sacarose. Devido a importância comercial desta cultura agrícola, é crescente a procura por híbridos mais resistentes e com maior teor de sacarose, e assim, tem surgido centenas de variedades dificultando a identificação taxonômica das mesmas. Desta forma, a classificação correta é considerar a cana-de-açúcar como um híbrido multiespecífico que recebe a designação de “*Saccharum spp.*” ou *Saccharum X officinarum* (de Almeida *et al.*, 1995).

Apesar da ampla importância econômica e farmacológica que o gênero *Saccharum* L. apresenta os estudos químicos se restringem a apenas triagens fitoquímicas das espécies *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. sinensis* Roxb., *S. barberi* Jew., *S. robustum* Jew., *S. edule* Hask e *S. muja* Roxb. Para essas espécies são descritos na literatura a presença de ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos, saponinas, taninos e alcaloides (Kumar *et al.*, 2009; Khalid & Siddiqui, 2011; Ejoba *et al.*, 2013). Além disso, devido à alta concentração de compostos fenólicos, estas espécies são amplamente investigadas quanto ao seu potencial antioxidante e demonstram eficiência ao combate de radicais livres.

A partir do caule, raiz e folhas de *S. sinensis* foram identificados os flavonoides diosmentina (**14**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**15**) e petunidina (**16**) (Li *et al.*, 2010).



Diversas propriedades terapêuticas são reportadas para algumas das espécies citadas acima. Para as partes aéreas de *S. spontaneum* L. é relatado propriedades laxativas, afrodisíacas e utilizada no tratamento de doenças do sangue e mentais, anemia e desordens abdominais (Kumar *et al.*, 2009; Khalid & Siddiqui, 2011). Para *S. barberi* são reportadas propriedades anticâncer, antialérgica, antiviral, antiinflamatória e a mesma é usada no tratamento da diarreia (Chopra *et al.*, 1956).

### 1.8 *Saccharum X officinarum*.

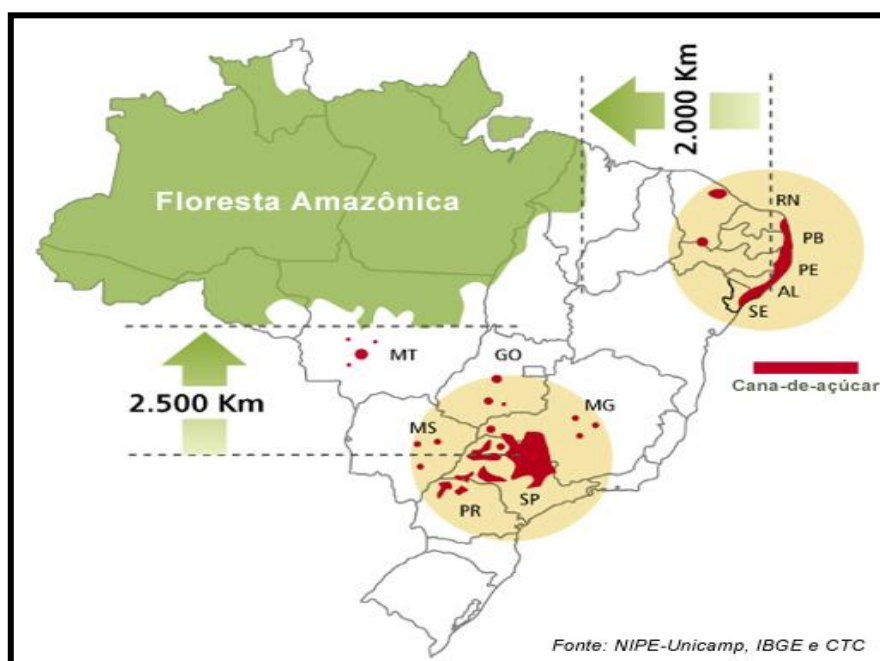
*Saccharum X officinarum* (**Figura 4**) é uma gramínea perene de grande porte pertencente à família Poaceae e conhecida popularmente como cana-de-açúcar, com distribuição em regiões de clima tropical e subtropical (Segato *et al.*, 2006). Seu centro de origem não é bem definido, mas acredita-se que seja o sudoeste asiático, Java, Nova Guiné e também Índia (Landell & Bressiani, 2010).

**Figura 4:** Foto da espécie *Saccharum X officinarum*.



Apesar de ser uma espécie de origem asiática, a cana-de-açúcar se adaptou ao clima tropical brasileiro, tendo como principal ocorrência a região Norte do estado de São Paulo, Norte do Paraná e Nordeste (**Figura 5**).

**Figura 5:** Regiões de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil





Segundo Bacchi (1983), a classificação botânica para esta espécie é a seguinte:

**Divisão:** Angiosperma

**Classe:** Monocotiledonea

**Ordem:** Glumiflorae

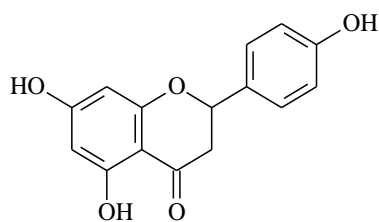
**Família:** Poaceae

**Tribo:** Andropogone

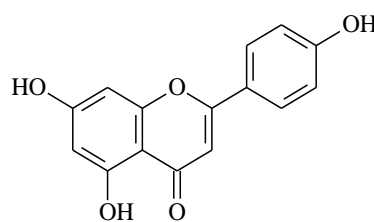
**Gênero:** *Saccharum L.*

**Espécie:** *Saccharum X officinarum.*

Além de seu amplo aproveitamento comercial, a literatura relata propriedades medicinais para *Saccharum X officinarum* como anti-hipertensiva e diurética e para o tratamento da osteoporose (de Barros *et al.*, 2007), as quais estão relacionadas aos colmos, parte da planta utilizada pela população na preparação de sucos. Compostos fenólicos são largamente encontrados em *Saccharum officinarum*, onde os mais comuns pertencem à classe das flavonas, como a naringenina (**17**), apigenina (**18**) e derivados da luteolina (Willians *et al.*, 1974).



**17**

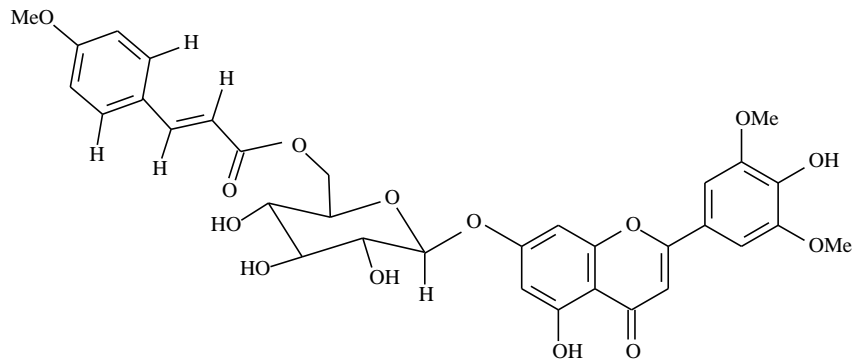
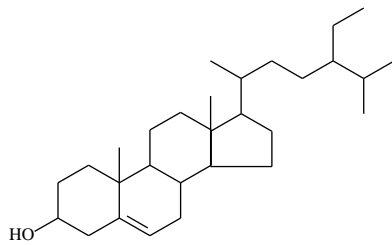
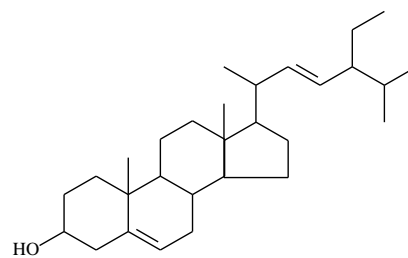
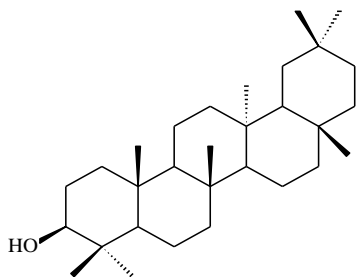
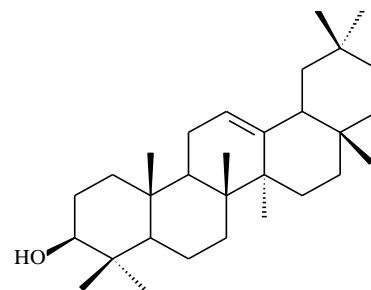
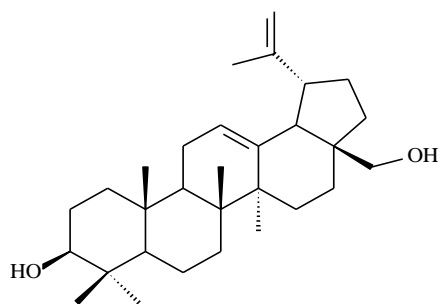
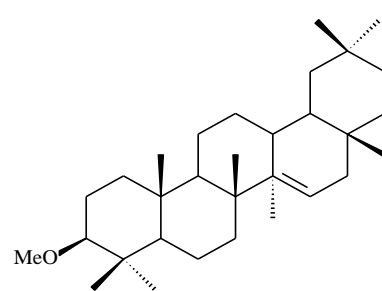


**18**

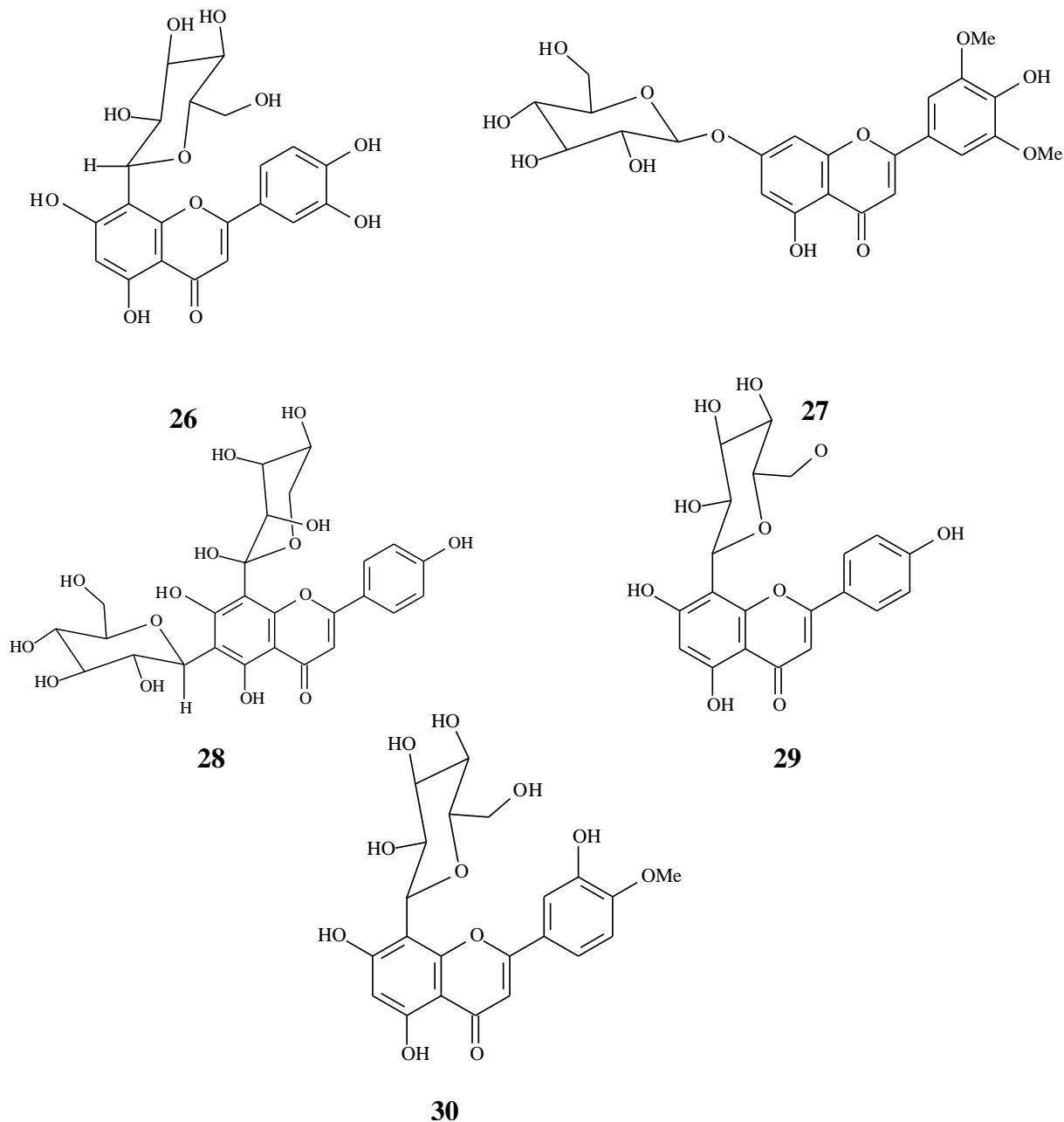
Essas substâncias são conhecidas atualmente pelos efeitos benéficos à saúde, como proteção das células contra processos degenerativos evitando, assim, o desenvolvimento de patologias como o câncer.

Em um estudo químico realizado com o suco de *S. officinarum* foi relatada a presença do flavonóide tricina-7-*O*-β-(6''-metoxicinamico)-glucosídeo (**19**), o qual mostrou considerável potencial antioxidante e antiproliferativo (Almeida *et al.*, 2007). Além dos esteroides estigmasterol (**20**) e β-sitosterol (**21**) (Narasingarao & Vidarthi,

1939), os triterpenos taraxferol (**22**),  $\beta$ -amirina (**23**), betulina (**24**) e sawamiletina (**25**) (Deshmane & Dev, 1971) foram isolados de *S. officinarum*.

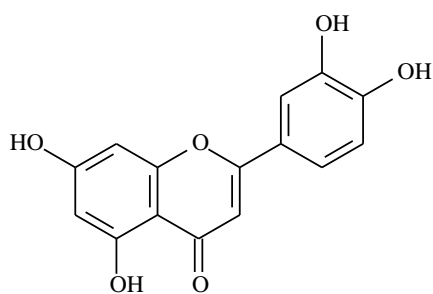
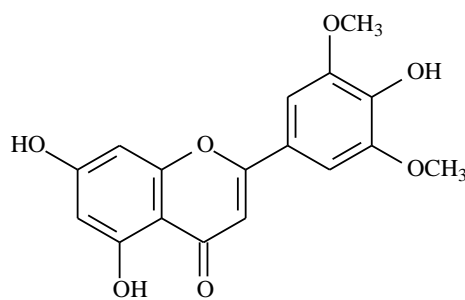
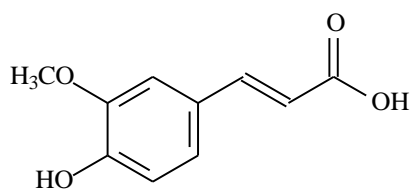
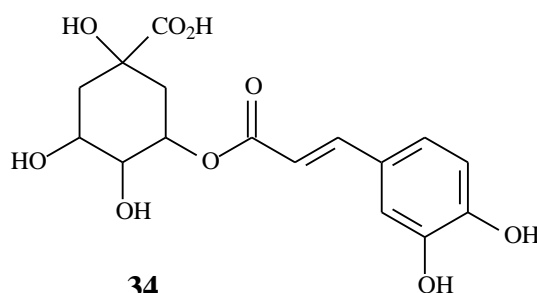
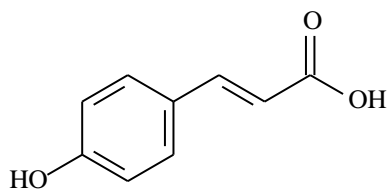
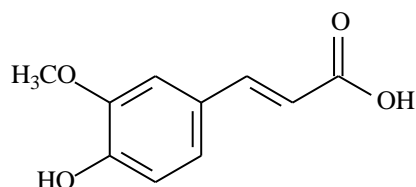
**19****20****21****22****23****24****25**

Vila e colaboradores (2008) relataram a presença dos flavonoides orientina (**26**), tricina 7-*O*-glicosídeo (**27**), schaftosídeo (**28**), vitexina (**29**) e diosmetina-8-*C*-glicosídeo (**30**) nas folhas e bagaço desta espécie. O potencial antioxidante do suco de *Saccharum officinarum* também foi avaliado neste estudo, demonstrando potencial moderado.



Outros estudos descritos na literatura reportam a presença de flavonoides glicosilados derivados de tricín e diosmetina (Vila *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006).

A presença de flavonoides, bem como, o potencial antioxidante das folhas e colmos de *Saccharum officinarum* também foi verificada por Almeida e colaboradores (2007) e (2011). A partir destes estudos foram identificados apigenina (**18**), luteolina (**31**), tricín (**32**) além dos ácidos fenólicos: caféico (**33**), clorogênico (**34**), *p*-cumárico (**35**) e ferúlico (**36**).

**31****32****33****34****35****36**

Nesta ocasião, o extrato bruto proveniente das folhas e colmos de *S. officinarum* exibiu potente atividade antioxidante (Duarte-Almeida *et al.*, 2011), provavelmente devido a presença dos compostos fenólicos.

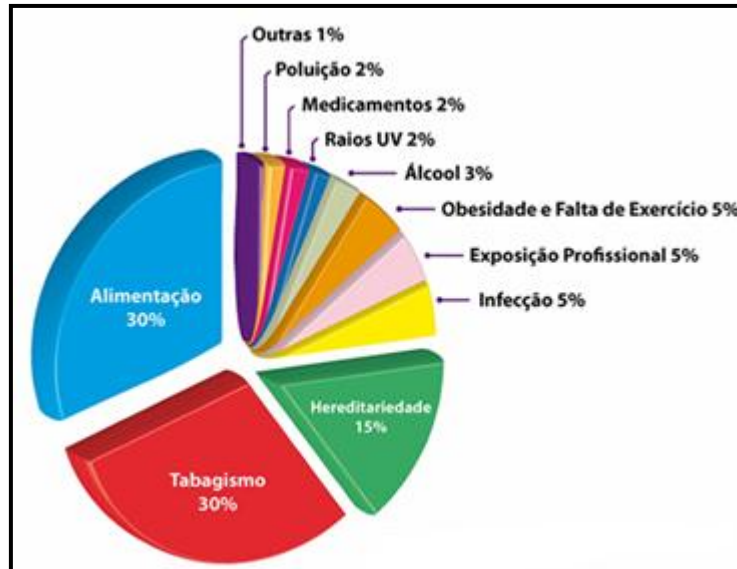
Outros compostos bioativos importantes tem sido encontrados nesta espécie, tais como ácidos hidroxicinâmicos,  $\alpha$ -hidroxi ácidos, ácidos alifáticos e poliamidas (Loyd & Naidoo, 1983). Os  $\alpha$ -hidroxi ácidos são amplamente utilizados em cosméticos como agentes fotoprotetores e antiinflamatórios (Ruciani, 1997). Recentemente Pallavi e colaboradores (2012) demonstraram a presença de antocianinas nas cascas de *S. officinarum* e moderada atividade antiproliferativa contra células tumorais HT 29 (carcinoma de cólon).

Segundo Feng e colaboradores (2014) a espécie *S. officinarum* pode ser considerada uma importante fonte de triterpenos bioativos, além de fitoesteroides e flavonoides com potente potencial antioxidante.

## 1.9 Câncer

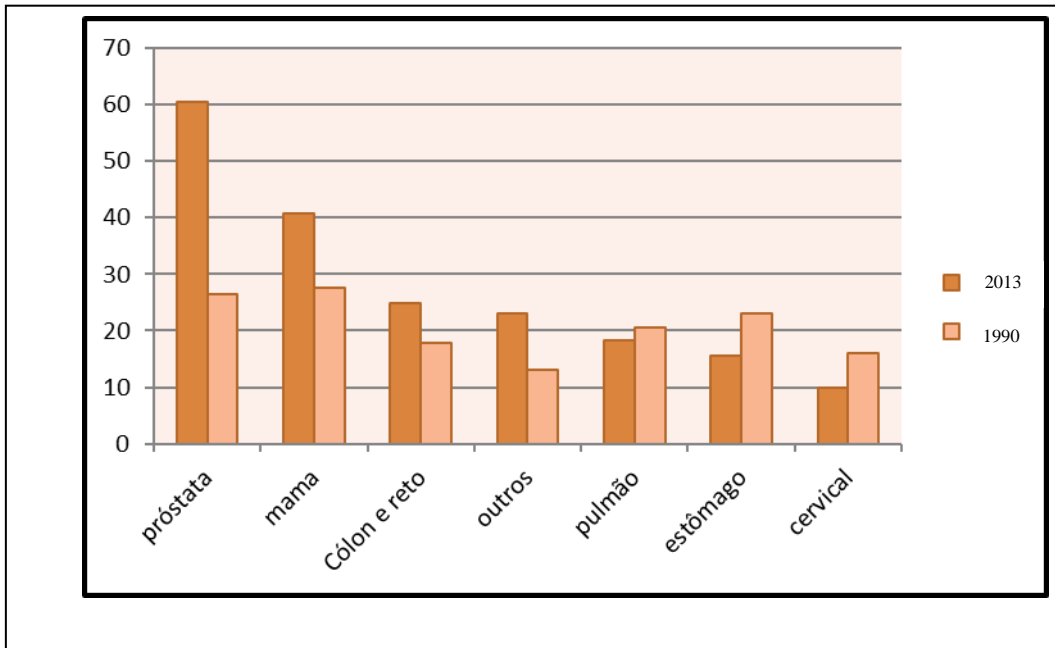
O câncer é uma denominação genérica que constitui um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem órgãos e tecidos (Who, 2015). Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis devido a rápida divisão celular, a qual pode resultar na formação de tumores malignos que podem difundir-se para outras regiões do corpo (metástase) (Ministério da Saúde, 2013). O mecanismo de formação do câncer (oncogênese) geralmente ocorre lentamente, acarretando em um longo período de tempo até seu estabelecimento. As causas do câncer estão relacionadas com fatores externos (exposição a agentes carcinogênicos biológicos, químicos ou físicos) e internos (fatores geneticamente pré-determinados) ao organismo, podendo estes estar associados. No entanto, aproximadamente 85% dos casos de câncer estão relacionados com fatores externos, como pode ser observado na **Figura 6** (Organização Mundial da Saúde, 2013a; Ministério da Saúde & INCA, 2014).

**Figura 6:** Estatísticas sobre fatores externos e internos causadores de câncer. Fonte: INCA, 2012.



O câncer ocupa o segundo lugar no ranking de causas de morte em todo o mundo, sendo considerado um grande problema de saúde pública. Em 2012 a doença atingiu cerca de 14,1 milhões de novos pacientes, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes. Ainda nesta estatística, os casos mais frequentes foram os cânceres de pulmão, fígado e estômago. Segundo levantamento publicado pelo periódico *Journal of American Medical Association Oncology* (JAMA) em julho de 2015, o número de casos de câncer de próstata e mama no Brasil aumentou consideravelmente entre os anos de 1990 a 2013 (**Figura 7**).

**Figura 7:** Incidência de casos de câncer no Brasil a cada 100 mil habitantes entre os anos de 1990 e 2013. (Fonte de dados estatísticos: JAMA, 2015)



Ainda segundo o periódico, um dos fatores que explicam este fenômeno no Brasil seria o envelhecimento da população.

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (2013a), o câncer poderá causar mais de 13,1 milhões de mortes em 2030. No Brasil, estimativas apontam a ocorrência de 576.580 novos casos de câncer em 2015, sendo os de maior incidência o câncer de pele tipo não melanona, seguido de próstata e mama (Mohsen *et al.*, 2015).

### 1.9.1 Tratamento e cura do câncer

A quimioterapia aliada à radioterapia e procedimentos cirúrgicos são as três modalidades principais de tratamento para o câncer (Sawada *et al.*, 2009). Essas modalidades geralmente objetivam a cura, o prolongamento da vida ou a melhora na qualidade de vida do paciente. A quimioterapia é a modalidade que emprega substâncias químicas no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando empregada para o tratamento do câncer é chamada de quimioterapia antineoplásica (tumores malignos) ou quimioterapia antitumoral (tumores benignos) (INCA, 2014). Apesar da evolução, nas últimas décadas, das áreas responsáveis por descobrir e desenvolver novas modalidades terapêuticas contra o câncer, como a medicina, a química medicinal

e sintética, a quimioterapia ainda apresenta diversas limitações. Essas substâncias normalmente afetam tanto as células normais quanto às neoplásicas (possuem baixa seletividade e alta toxicidade) e também muitos tumores apresentam resistência frente aos quimioterápicos existentes.

Os tecidos normais que se renovam constantemente, como medula óssea, os pelos e a mucosa do tubo digestivo também são atacados pelos quimioterápicos, desencadeando diversos efeitos indesejáveis e de desconforto ao paciente (Sawada *et al.*, 2009). Devido a esses efeitos, muitos pacientes têm recorrido a metodologias terapêuticas secundárias, incluindo o uso de produtos naturais (Melo *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, até 2010 eram 206 quimioterápicos aprovados para o tratamento do câncer no mundo todo, sendo estes de origem sintética ou semissintética e fontes naturais (plantas, fungos, organismos marinhos, bactérias) (Newman & Cragg, 2012). Os produtos naturais têm sido considerados como uma importante fonte de substâncias ativas anticâncer. Segundo Costa-Lotufo e colaboradores (2010) mais de 60% das drogas anticâncer utilizadas clinicamente são provenientes ou derivados de produtos naturais. Diversos trabalhos descritos na literatura têm demonstrado expressivas atividades anticâncer para uma ampla quantidade de classes de produtos naturais, destacando-se flavonoides e ácidos fenólicos (Kampa *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004).

### **1.10 Flavonoides**

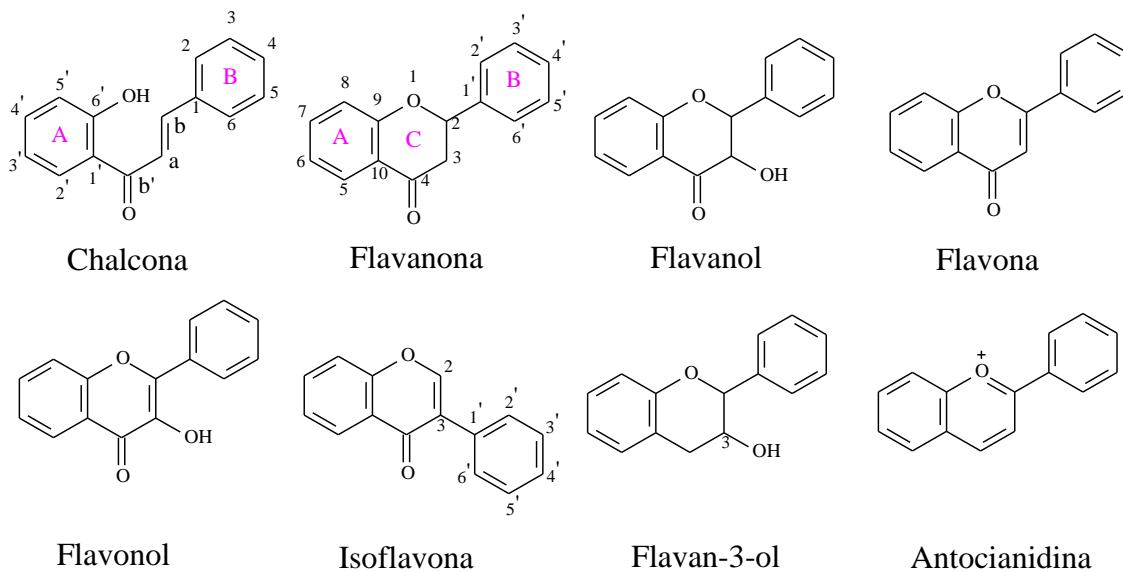
Os flavonoides constituem um dos grupos fenólicos mais diversificados entre as classes de compostos provenientes de fontes naturais, sendo amplamente difundido no reino vegetal (Simões *et al.*, 2004). Podem ser encontrados em sementes, cascas de árvores, raízes, frutas, verduras, grãos e principalmente em folhas e flores. Diversos produtos industrializados também contêm flavonoides, como chás, vinhos, cervejas e mel, entre outros (Nijveldt *et al.*, 2001).

Os flavonoides têm como característica estrutural um núcleo C6-C3-C6, totalizando 15 átomos de carbono em suas estruturas e são biossintetizados a partir de duas vias metabólicas distintas, a via do acetato e a via do chiquimato (Cazarolli *et al.*, 2008). As modificações estruturais no esqueleto carbônico básico dos flavonoides conferem a ampla diversidade estrutural apresentada por esta classe de compostos e provém, principalmente, de reações de alquilação e glicosilação (Tahara, 2007). Podem ser

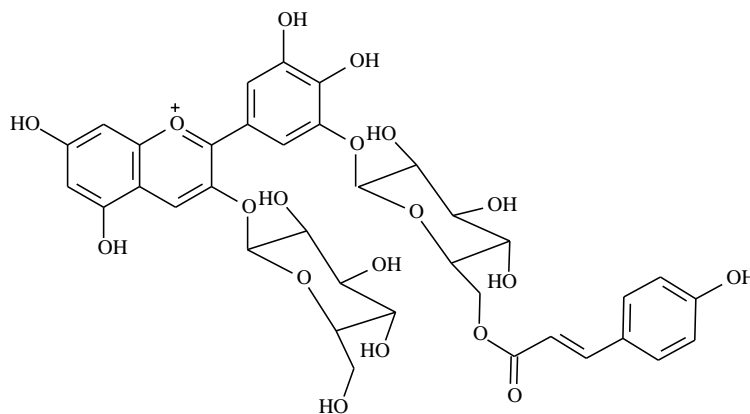


encontrados como agliconas ou na forma de glicosídeos, ou ainda derivados metilados e acilados. Além disso, as diferentes modificações no anel C conduzem às distintas subclasses, tais como as chalconas, flavanonas, flavanóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-óis e antocianidinas, como mostra a **Figura 8**.

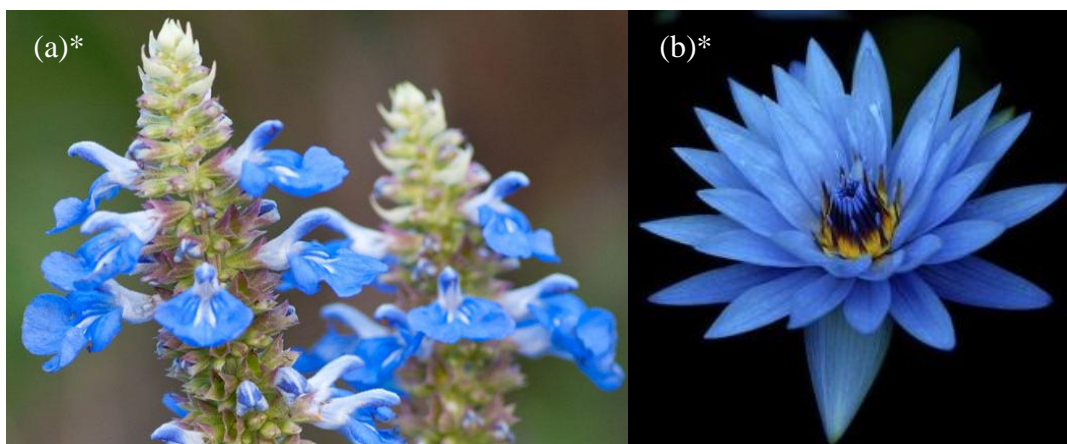
**Figura 8:** Esqueletos básicos de flavonoides



Nas plantas, os flavonoides e seus derivados desempenham diversas funções importantes que incluem desde pigmentação até proteção contra agentes patogênicos. O glicosídeo delphinina (**37**), por exemplo, é responsável pela pigmentação azul das flores das espécies *Salvia uliginosa* e *Nymphaea caerulea* (**Figura 9**).

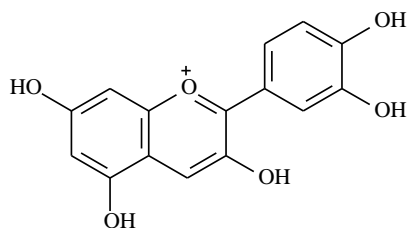


**37**

**Figura 9:** (a) Espécie *Salvia uliginosa*. (b) Espécie *Nymphaea caerulea*.

(a)\*fonte: www.artistisgarden.co.uk. (b)\*fonte: www.medicineroom.net

Algumas espécies pertencentes à família Rosaceae possuem a cianidina (**38**) que quando complexadas a copigmentos e metais conferem pigmentações do vermelho até o magenta às suas flores (Gottlieb, 1982).

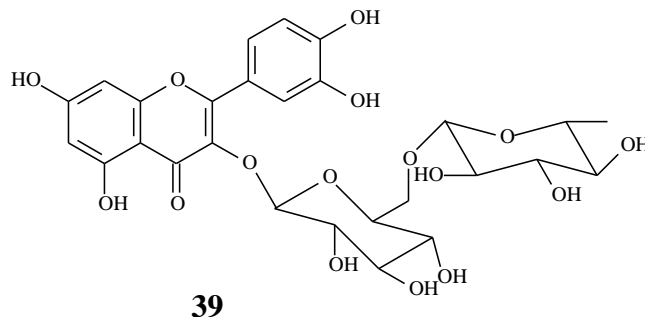
**38**

Proteção à radiação ultravioleta B (280-315 nm) também é associada, em partes, aos pigmentos formados pelos flavonoides que atuam como um filtro, evitando que a incidência de radiação provoque modificações nas estruturas celulares e portanto, gerando células defeituosas (Harborne, 1997).

Os flavonoides também se destacam como agentes antifúngicos, antibacterianos e antivirais, protegendo as plantas de ataques microbianos (Grayer & Harborne, 1994). Nestes compostos, a presença de hidroxilas fenólicas é parcialmente responsável pelas atividades apresentadas, pois inibem o crescimento de esporos, micelas e partículas virais. Além disso, tem sido observado que esses compostos também desempenham funções importantes de proteção dos vegetais a herbívoros (Picman *et al.*, 1995).

Estudos demonstram que alguns flavonoides presentes em *Oriza sativa* (arroz) inibiram a ingestão de seiva de insetos como *Nilaparvatta lugens*, uma das maiores

pragas do arroz (Grayer *et al.*, 1994). Benninger & Aboud-Zaid (1997) demonstraram que o flavonoide rutina (**39**), isolado da espécie *Pinnus banksiana*, promoveu o aumento da mortalidade e diminuição do crescimento de larvas.



Flavonoides glicosilados isolados de *Asclepias curassavica* são fundamentais para a indução da ovoposição em algumas espécies de borboletas como *Danaus plexippus* (Haribal & Renwick, 1996).

Além de serem utilizados pelos vegetais para adaptação e sobrevivência ao meio ambiente, os flavonoides também apresentam importantes propriedades biológicas. Esses compostos são conhecidos, principalmente pela capacidade de inibir a oxidação de tecidos, ou seja, são eficientes no combate da formação de radicais livres, os quais estão associados a doenças degenerativas como o câncer, o mal de Parkinson e Alzheimer (Trevisan *et al.*, 2006). Outras ações farmacológicas são reportadas para os flavonoides destacando-se as atividades antitumoral (Wei *et al.*, 1990), antioxidante (Duarte-Almeida *et al.*, 2011) e antiinflamatória (Coutinho *et al.*, 2009) entre outras, as quais lhes atribuem significativa importância biológica.

## 2 Objetivos

Tendo em vista a importância econômica da cultura cana-de-açúcar para o Brasil e especialmente para o Norte do Paraná e a busca por novos agentes químicos que podem aumentar a produtividade desta cultura sem causar danos ao ambiente, e, também considerando os resultados promissores obtidos de estudos químicos e farmacológicos realizados com espécies do gênero *Saccharum*, o presente trabalho tem como objetivos principais:

- Caracterizar as principais substâncias sinalizadoras da classe das acil-homosserina lactonas presentes nas folhas e colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum X officinarum*), através de CG-EM;
- Otimizar a síntese de novas acil-homosserinas não substituídas e substituídas visando obter melhor rendimento reacional e posterior caracterização destas moléculas através de técnicas de CG-EM e RMN;
- Avaliar os possíveis efeitos de ganho de produtividade ou ciclo de crescimento na administração das substâncias sintéticas em cultivos de cana-de-açúcar.
- Avaliar a toxicidade das substâncias testadas através de microscopia eletrônica de varredura.
- Isolar e identificar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum*;
- Realizar ensaios biológicos a fim de avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto acetato de etila, frações e compostos isolados.

### 3 Parte Experimental

#### 3.1 Material e Métodos

Os espectros de massas de baixa resolução foram adquiridos em cromatógrafo gasoso modelo Focus GC (Thermo Finnigan) acoplado a um espectrômetro de massas modelo DSQ II (Thermo Finnigan) equipado com fonte de ionização por impacto de elétrons (IE), analisador de massas do tipo quadrupolo e diodo como detector, amostrador automático com forno *headspace*, modelo Triplus e sistema de injeção *Split/Splitless*, trabalhando a 70 eV. A aquisição de dados foi realizada através do software Xcalibur que contém base de dados contidos nos espectros da biblioteca espectral NIST MS Search Version 2.0. Hélio de alta pureza (99,999%) (5.0) (White Martins) foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas com o injetor trabalhando a 250 °C e modo de injeção *Splitless*. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30 m x 0,25 milímetros x 0,25µm) (5% de fenil, 95% metilpolisiloxano) e o programa de temperatura do forno foi de 100 ° C a 290 ° C a 10 °

C min<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas a partir de 1 mg de cada uma das substâncias dissolvidas em 1 mL de acetato de etila (Grau HPLC).

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance III HD, operando a 300,06 e 500 MHz para <sup>1</sup>H e 75,45 e 125,5 MHz para <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS  $\delta = 0.0$  ppm). Os solventes utilizados nas análises foram: CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD e D<sub>2</sub>O, Aldrich ou Isotec.

Adicionalmente, foram obtidos os espectros pela técnica DEPT e as correlações bidimensionais foram confirmadas a partir dos espectros dos mapas de contornos obtidos pelas técnicas COSY, HSQC e HMBC.

Para o método de purificação dos constituintes químicos foram utilizadas cromatografias em coluna usando gel de sílica 60 (0,063-0,2 mm) da Merck ou Fluka e filtrações em Sephadex Lipofílica LH-20 da Sigma. Os diâmetros das colunas cromatográficas utilizadas variaram de acordo com a massa do material a ser tratado.

O acompanhamento das cromatografias e filtrações em coluna foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que as placas cromatográficas foram preparadas com fase estacionária de gel de sílica 60 G e gel de sílica 60 GF, com 0,25 mm de espessura.

Os solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) utilizados na fase móvel nas cromatografias e filtrações, apresentavam grau de pureza P.A ou foram destilados. O processo de evaporação de solventes foi realizado utilizando evaporador rotativo.

As substâncias separadas nas placas cromatográficas (CCD) que apresentaram fluorescência foram visualizadas sob luz UV no comprimento de onda de 366 nm e reveladas através do revelador universal (solução alcoólica de anisaldeído).

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas utilizando aparelho de ponto crítico Bal-Tec-CPD 030, metalizador de amostras da marca Shimadzu IC-50 e microscópio eletrônico de varredura da marca Shimadzu SS – 550 Super Scan. Pequenas sessões das raízes tratadas (5mm) foram imediatamente fixadas em eppendorfs com solução Karnovsky (2.5% glutaraldeído and 2% paraformaldeído em tampão cacodilato 0.05 M pH 7.2). Em seguida foi realizada a desidratação das amostras em propanona (70, 90 e 100%) seguida foram secas ao ponto crítico a temperatura de 9°C e 55 bar de CO<sub>2</sub>. Após a secagem em ponto as amostras

foram metalizadas utilizando ouro de alta pureza e em seguida analisadas no microscópio eletrônico de varredura.

A análise polarimétrica das substâncias (desvio da luz plano-polarizada –  $\alpha_{20D}$ ) foi realizada em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 343, a 20°C e 589 nm, com cela de caminho óptico de 10 mm. As amostras foram diluídas na proporção de 10 mg em 1 mL de acetato de etila ou clorofórmio. O  $\alpha_{20D}$  foi determinado através da **Equação 1**, onde  $[\alpha]$  é a leitura obtida pelo equipamento,  $b$  é o caminho óptico (0,1 dm) e  $c$  é a concentração.

$$\alpha_D^{20} = \frac{[\alpha]}{b \cdot c} \quad (\text{Eq. 1})$$

Para o isolamento dos sinalizadores químicos foram utilizados procedimentos de cromatografia em coluna usando gel de sílica 60 (0,063-0,2mm) fornecido pela Merck ou Fluka ou Sephadex LH 20. Os diâmetros das colunas utilizadas variaram de acordo com a massa do material a ser purificado. Os solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol) utilizados como fase móvel nas cromatografias e filtrações, apresentavam grau de pureza P.A ou foram destilados. O processo de evaporação de solventes foi realizado utilizando evaporador rotativo. A acetoneitrila grau HPLC de pureza foi adquirida da Sigma.

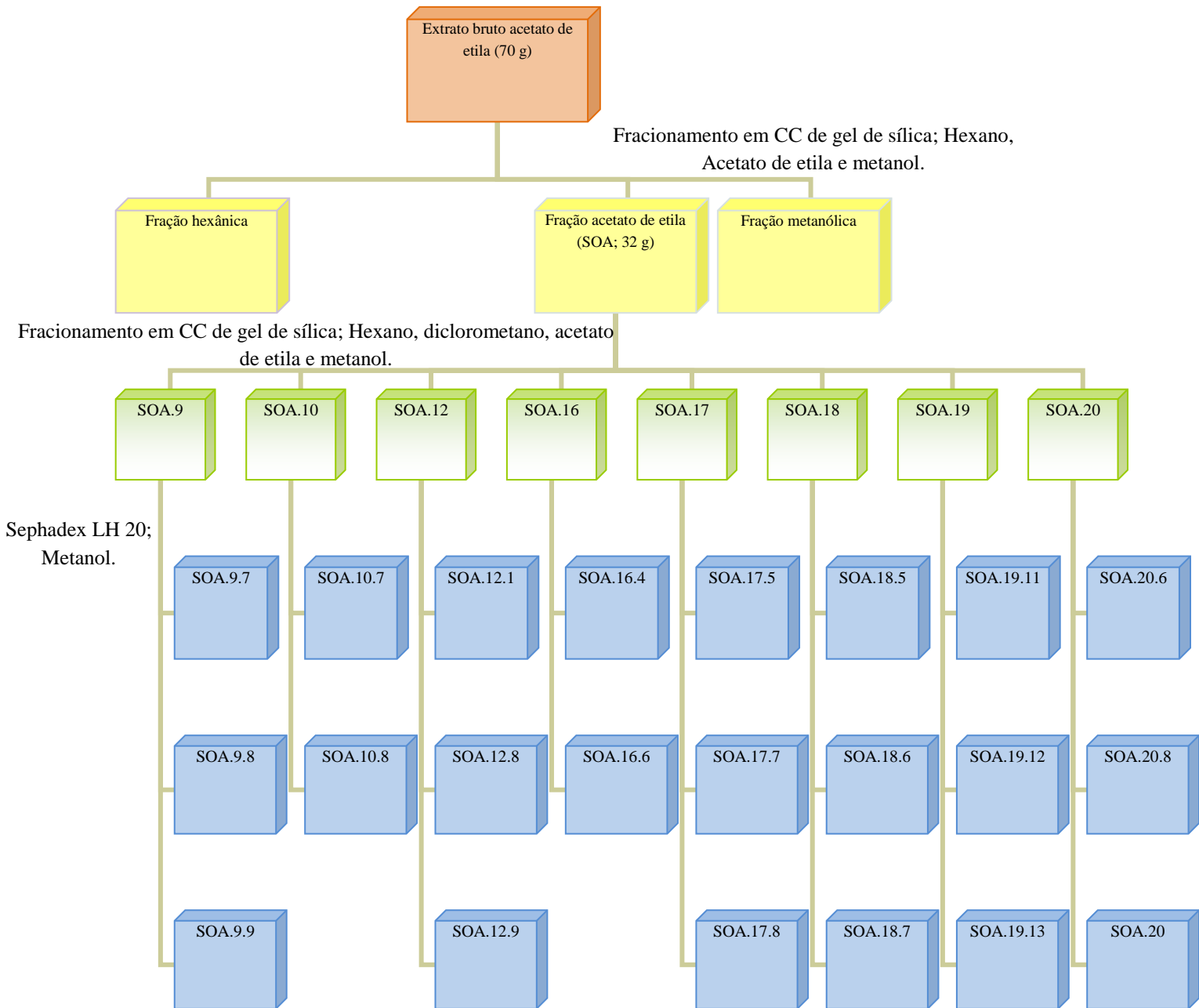
Na síntese das acil homosserina lactonas os reagentes bromidrato de (*S*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona, (*R*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona, *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida, 4-(dimetilamino)-piridina, ácido de Meldrum, cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico eram provenientes da Sigma. Todos os reagentes com exceção dos ácidos carboxílicos foram mantidos sob refrigeração à -10 °C. A trietilamina foi adquirida da Merck e os sais cloreto de cálcio anidro, sulfato de magnésio anidro, bissulfato de potássio e bicarbonato de sódio juntamente com o ácido clorídrico foram adquiridos da Nuclear. As análises de CG-EM das substâncias sintéticas foram realizadas sob mesmas condições experimentais descritas no capítulo 1. A síntese das acil-homosserinas lactonas foi confirmada mediante análises espectrais uni e bidimensionais descritas no capítulo 1.

### 3.1.1 Identificação de acil homosserinas lactonas presentes nas folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum*.

Algumas frações oriundas de filtrações de subfrações da fração acetato de etila (SOA) obtida do extrato bruto de *Saccharum X officinarum* descritas no capítulo anterior foram selecionadas para análise de CG-EM. Os requisitos para a seleção dessas frações foram: ausência de clorofila, ausência de ácidos graxos, menor complexidade por CCD e baixa polaridade, além de pertencerem a um grupo de frações eluídas sob condições de média polaridade, nas quais tipicamente são observadas as acil-HSLs (Pomini *et al.*, 2009). As frações selecionadas são mostradas no **Esquema 2**.

As frações foram analisadas por CG-EM à procura de picos cromatográficos com espectros de massas característicos de substâncias da classe das acil-HSLs

**Esquema 2:** Obtenção das frações selecionadas para análise em CG-EM





### 3.1.2 Síntese de acil-homosserina lactonas

#### 3.1.2.1 Síntese de acil-homosserinas lactonas com o grupo carbonila na posição 3' da cadeia lateral (1-5a).

- Síntese do derivado de Meldrum.

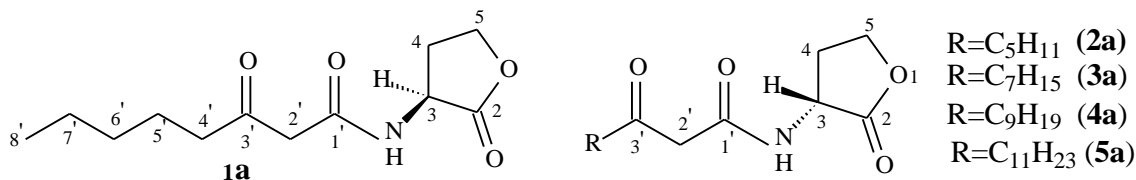
Em um balão de 50 mL adicionou-se 20 mL de diclorometano previamente seco. Em seguida, o balão foi vedado com rolha e agulha, tendo sido aspergido em sua atmosfera interior um fluxo de nitrogênio a partir de um reservatório de borracha. Logo após, adicionou-se 2,0 mmol de ácido hexanóico, octanóico, decanóico ou dodecanóico. Adicionou-se também 2,1 mmol de DMAP (4-dimetilaminopiridina, 256,2 mg), 2,2 mmol de dicitclohexilcarbodiimida (453,2 mg) e 2,0 mmol de ácido de Meldrum (288,0 mg). A solução permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 24 horas, havia no meio reacional um precipitado branco e a solução era amarela. O meio foi filtrado em algodão e a fase orgânica evaporada sob pressão reduzida a 38°C. Em seguida, o óleo amarelo obtido foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila e 5 mL de metanol e extraído com solução aquosa de HCl 2 M (3 x 10 mL) e água destilada (1 x 10 mL), e a solução foi seca sob sulfato de magnésio anidro. A fase orgânica foi então filtrada em algodão e evaporada sob pressão reduzida. O derivado de Meldrum foi conservado em freezer a -20°C e utilizado para a próxima etapa.

- Síntese de *N*-3-(oxo-acil)-homosserina lactonas.

À uma solução do derivado de Meldrum (0,75 mmol de hexanoil-Meldrum, octanoil-Meldrum, decanoil-Meldrum ou dodecanoil-Meldrum) em 22,5 mL de acetonitrila grau HPLC de pureza adicionou-se 0,75 mmol de bromidrato ou cloridrato de (*S*) ou (*R*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona e 1,2 mmol de trietilamina (126,44  $\mu$ L). A mistura permaneceu sob agitação magnética e refluxo durante 3 horas. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e o sólido branco obtido foi dissolvido com 20 mL de acetato de etila e 5 mL de metanol. A solução orgânica foi extraída com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL), KHSO<sub>4</sub> 1M (3 x 10 mL) e NaCl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi posteriormente seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada, rendendo um sólido amarelado. Os produtos das reações foram purificados por cromatografia em coluna de gel de sílica (12 g de sílica;  $\theta$ =2 cm), eluída com hexano, diclorometano e acetato de etila em polaridade crescente. Os produtos (**1-5a**), **Figura 10**, foram recolhidos como sólidos brancos, nas frações de polaridade

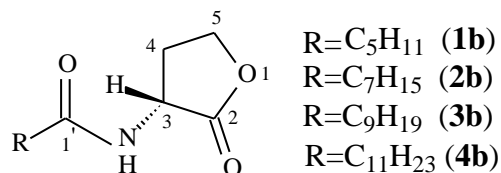
diclorometano/acetato de etila 7/3 com rendimentos de 45, 55, 40, 62 e 70%, respectivamente.

**Figura 10:** Acil-homosserinas lactonas com carbonila na posição 3' sintetizadas



### 3.1.2.2 Síntese de acil-homosserinas lactonas sem o grupo carbonila na posição 3' da cadeia lateral

Em um balão de 5 mL, adicionou-se trietilamina ( $1,05 \times 10^{-4}$  mol), bromidrato de (*R*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona ( $1,05 \times 10^{-4}$  mol) e solução de ácido hexanóico, octanóico, decanóico ou dodecanóico ( $1,57 \times 10^{-4}$  mol) em 2,5 mL de água ultra pura (Milli-Q). Em seguida, adicionou-se cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida ( $1,57 \times 10^{-3}$  mol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 24 horas, esta foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica foi extraída com solução de bicarbonato de sódio 5% (2 x 6 mL), bissulfato de sódio 1 M (1 x 6 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 6 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, formando um sólido branco. Em seguida, o material obtido foi purificado em coluna cromatográfica empacotada com de gel de sílica e um plug de gel de sílica/NaOH 5%. Os eluentes utilizados na purificação foram clorofórmio, acetato de etila e metanol. Este procedimento forneceu 12 frações, sendo que as frações eluídas com acetato de etila 100% forneceram cristais brancos, os quais foram encaminhados para análise de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, obtendo-se os produtos (**1-4b**), **Figura 11**, com rendimentos de 20, 48, 50 e 45% respectivamente.

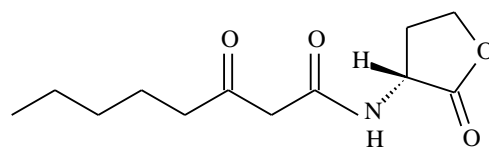
**Figura 11:** Acil-homosserinas lactonas sem carbonila na posição 3' sintetizadas

### 3.2 Bioensaio de atividade de promoção do crescimento em cana-de-açúcar

O bioensaio de promoção do crescimento em cana-de-açúcar foi realizado com as variedades SP80-3280 proveniente de cultivo próprio do laboratório de bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, e com a RB96-6928 cedida pela Usina Santa Terezinha alocada na cidade de Maringá.

Colmos de cana-de-açúcar ( $n=6$ ) com aproximadamente 3,0 cm de diâmetro foram esterelizados com etanol 70%, incubados em vermiculita e mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 30°C por 8 dias e ciclo fotoperíodo de 12:12 claro/escuro. Irrigações foram realizadas a cada dois dias com a solução controle (100  $\mu$ L de DMSO e 1000 L de H<sub>2</sub>O) ou com a solução das substâncias sintéticas dissolvidas em 100  $\mu$ L de DMSO e 1000 L de H<sub>2</sub>O. Após o período de incubação, os comprimentos das raízes e brotos foram medidos com auxílio de uma régua e a massa de raiz e broto secos foram estimados após secagem em estufa a 80°C. Todos os parâmetros foram ponderados pelo diâmetro dos colmos.

Primeiramente objetivou-se determinar o melhor procedimento para a realização deste bioensaio, para tal a variedade SP80-3280 e a substância (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona (**2a**) na concentração de 0,1 mg/L foram utilizadas. Neste ensaio, o procedimento A refere-se a colmos imersos inicialmente na solução controle seguido de irrigações com a mesma solução. No procedimento B colmos de cana-de-açúcar foram imersos na solução da substância (**2a**) e irrigados com a solução controle e no procedimento C colmos de cana-de-açúcar foram imersos inicialmente e irrigados com a solução contendo a substância (**2a**). A **Tabela 1** sintetiza esse procedimento.

**2a**

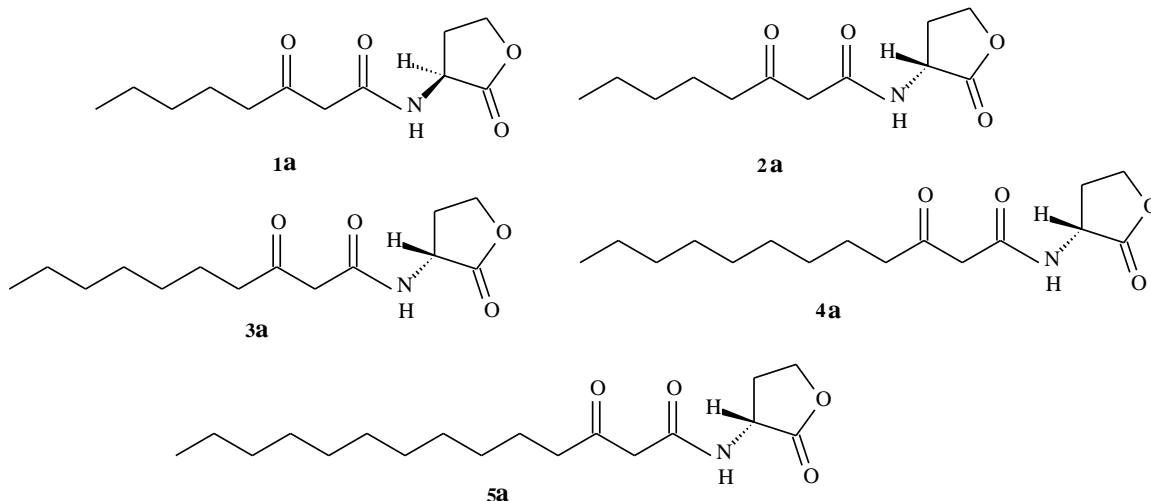
**Tabela 1:** Bioensaio para a determinação do melhor procedimento para o bioensaio de atividade de promoção de crescimento em cana-de-açúcar (SP80-3280)

	<b>Procedimento A</b>	<b>Procedimento B</b>	<b>Procedimento C</b>
<b>Imersão</b>	Solução branco/controle (100 µL DMSO em 1 L H <sub>2</sub> O)	Solução do princípio ativo (0,1 mg de <b>2a</b> , 100 µL de DMSO e 1 L de H <sub>2</sub> O)	Solução do princípio ativo (0,1 mg de <b>2a</b> , 100 µL de DMSO e 1 L de H <sub>2</sub> O)
<b>Irrigação</b>	Solução branco/controle (100 µL DMSO em 1 L H <sub>2</sub> O)	Solução branco/controle (100 µL DMSO em 1 L H <sub>2</sub> O)	Solução do princípio ativo (0,1 mg de <b>2a</b> , 100 µL de DMSO e 1 L de H <sub>2</sub> O)

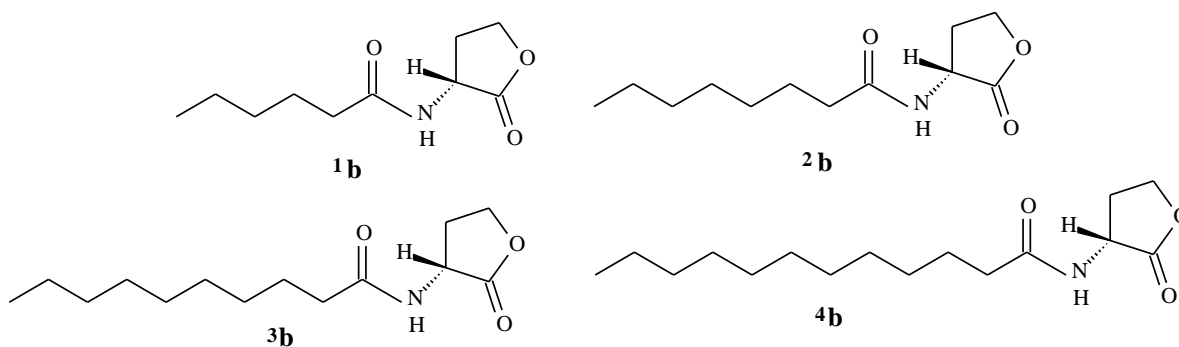
Com o objetivo de avaliar o fator dose-resposta e a toxicidade foi realizado um ensaio utilizando a substância (**2a**) nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L e a variedade SP80-3280 seguindo o procedimento C. Devido a importância que a estereoquímica apresenta diante de propriedades biológicas, outro ensaio foi realizado visando observar a ação da substância (**2a**) e seu enantiômero (*S*)-*N*-(3-oxooctanoyl)-homoserina lactona (**1a**) na atividade de promoção do crescimento. Neste ensaio os enantiômeros foram avaliados na concentração de 0,5 mg/L seguindo o procedimento C. Para a variedade RB96-6928 foram avaliadas as acil-homoserinas com carbonila na posição 3' (**1a**), (**2a**), (**3a**), (**4a**), (**5a**) e os derivados sem carbonila na posição 3' (**1b**),

(2b), (3b) e (4b) na concentração de 0,5 mg/L seguindo o procedimento C. As substâncias testadas neste ensaio estão dispostas na **Figura 12** e **13**.

**Figura 12:** Acil-homosserinas lactonas sintéticas com carbonila na posição 3' avaliadas no bioensaio de promoção de crescimento em cana-de-açúcar.



**Figura 13:** Acil-homosserinas lactonas sintéticas sem carbonila na posição 3' avaliadas no bioensaio de promoção de crescimento em cana-de-açúcar.



### 3.3 Tratamento Estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada parcela representada por um recipiente de plástico contendo seis plantas. Os dados são expressos como a média de seis experimentos independentes  $\pm$  o erro padrão. A análise de variância One-way para testar a significância das diferenças observadas foi realizada

utilizando o programa estatístico Prisma<sup>®</sup>. A diferença entre os parâmetros foram avaliados pelo teste de Dunnett's e foram consideradas significativas as diferenças com  $P \leq 0,05$ .

### 3.4 Estudo Químico das folhas e colmos de *Saccharum X officinarum*.

#### 3.4.1 Coleta do Material Vegetal

As folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum* foram coletadas pelo Prof. Dr. Armando Mateus Pomini na cidade de Munhoz de Mello (Paraná) em setembro de 2011, na localidade "Fazenda Mão de Onça". Trata-se de um cultivo comercial voltado para a produção de etanol, em área cooperada à Usina Nova Produtiva. O material vegetal *in natura* (4,360 Kg) foi moído em moinho de facas e submetido à extração exaustiva com acetato de etila (40 L) à temperatura ambiente, por um período de 3 meses. Após a evaporação do solvente em rotaevaporador (38 °C), foram obtidos 72 g de extrato bruto acetato de etila.

#### 3.4.2 Obtenção do extrato bruto acetato de etila de *Saccharum X officinarum*

Parte do extrato bruto AcOEt (70,0 g) foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (80 g, Ø= 5 cm) com os eluentes hexano, acetato de etila e metanol, resultando nas frações hexânica, acetato de etila e metanólica. Os dados da filtração são mostrados na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Dados obtidos do fracionamento em gel de sílica do extrato bruto acetato de etila

Eluente	Volume (L)	Massa das frações (g)	Código
Hexano	2	7,64	SOH
Acetato de etila	11	33,75	SOA
Metanol	2,7	7,72	SOM

Recuperou-se 70,2% da massa inicial

#### 3.4.3 Isolamento dos Principais Constituintes Químicos das folhas e colmos de *Saccharum x officinarum*

##### 3.4.3.1 Estudo da fração acetato de etila SOA

Parte da fração acetato de etila SOA (32,00 g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (158,00 g,  $\varnothing = 4,5$  cm), utilizando como eluentes  $C_6H_{14}$ ,  $C_6H_{14}:H_2CCl_2$ ,  $H_2CCl_2$ ,  $H_2CCl_2:AcOEt$ ,  $AcOEt$ ,  $AcOEt:MeOH$  e  $MeOH$  em gradiente crescente de polaridade, como mostra a **Tabela 3**. Obteve-se 548 frações que foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 4**.

**Tabela 3:** Dados obtidos do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração acetato de etila SOA

Eluente	Volume (mL)	Frações
$C_6H_{14}$ 100%	700	1
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 15%	100	2-4
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 30%	100	5-8
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 45%	100	9-12
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 60%	100	13-34
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 75%	100	35-40
$C_6H_{14}:H_2CCl_2$ 90%	100	41-46
$H_2CCl_2$ 100%	3190	47-52
$H_2CCl_2:AcOEt$ 5%	600	53-103
$H_2CCl_2:AcOEt$ 10%	500	104-149
$H_2CCl_2:AcOEt$ 15%	500	150-191
$H_2CCl_2:AcOEt$ 20 %	700	192-247
$H_2CCl_2:AcOEt$ 25%	700	248-280
$H_2CCl_2:AcOEt$ 30%	500	281-320
$H_2CCl_2:AcOEt$ 35%	500	321-362
$H_2CCl_2:AcOEt$ 40%	500	363-395
$H_2CCl_2:AcOEt$ 45%	500	396-408
$H_2CCl_2:AcOEt$ 55%	500	409-425
$H_2CCl_2:AcOEt$ 65%	300	426-431
$H_2CCl_2:AcOEt$ 75%	300	432-439

H <sub>2</sub> CCl <sub>2</sub> :AcOEt 85%	300	440-443
AcOEt 100%	400	444-461
AcOEt:MeOH 5%	400	462-486
AcOEt:MeOH 20%	200	487-505
AcOEt:MeOH 35%	200	506-526
AcOEt:MeOH 50%	200	527-545
AcOEt:MeOH 65%	200	546
AcOEt:MeOH 85%	200	547
MeOH 100%	300	548

**Tabela 4:** Dados das frações reunidas provenientes do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração acetato de etila SOA.

Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
1-11	SOA.1	25,7	
12-30	SOA.2	274,6	
31-38	SOA.3	104,6	
39-50	SOA.4	496,7	
51	SOA.5	508,0	<b>S1+S2+S3</b>
52	SOA.6	2000	
53-54	SOA.7	1004	
55-74	SOA.8	94,6	
75-120	SOA.9	1200	
121-145	SOA.10	487,8	
146-149	SOA.11	11,9	
150-197	SOA.12	171,3	<b>S4</b>
198-199	SOA.13	7,9	
200-224	SOA.14	376,9	
225-249	SOA.16	516,0	
250-270	SOA.17	600,0	
271-299	SOA.18	600,3	
300-320	SOA.19	633,4	



321-372	SOA.20	500,0	
373-399	SOA.21	650,5	<b>S5</b>
400-424	SOA.22	571,8	
425-449	SOA.23	894,9	
450-470	SOA.24	900,6	
471-524	SOA.25	514,00	
525-544	SOA.26	184,0	
545-548	SOA.27	31,9	

Recuperou-se 41,8 % da massa inicial

Na fração SOA.5 (508,0 mg) observou-se a presença de cristais brancos na forma de agulha. Os mesmos foram lavados com metanol e acetato de etila resultando no isolamento da mistura de substâncias (30 mg) codificadas como **S1+S2+S3**.

A fração SOA.12 (171,3 mg) foi submetida a uma recristalização com acetato de etila a frio resultando no isolamento da substância codificada com **S4** (55 mg). A fração SOA.21 apresentou um sólido branco, o qual foi lavado com acetona resultando no isolamento da substância codificada como **S5** (104,2 mg).

A fração SOA.6 (2000 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (50 g, Ø = 2,5 cm) com os eluentes C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:HCCl<sub>3</sub>, HCCl<sub>3</sub>, HCCl<sub>3</sub>:MeOH e MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando em 111 frações que foram agrupadas mediante semelhança observada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os dados do fracionamento são mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração SOA.6

Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> 100%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 10%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 20% e C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 30%	420	1-17	SOA.6.1	0,1	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 30%	100	18-19	SOA.6.2	0,8	

C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 40%,	300	20-28	SOA.6.3	0,6	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 50% e					
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 60%					
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 60%	100	29-30	SOA.6.4	2,2	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 60%	100	31-33	SOA.6.5	13,4	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 70%	100	34-38	SOA.6.6	1,0	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 70% e	100	39-42	SOA.6.7	11,8	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 80%					
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 80% e	100	43-46	SOA.6.8	0,2	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 90%					
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 90%	100	47-48	SOA.6.9	1,0	
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :HCCl <sub>3</sub> 90% e	100	49-54	SOA.6.10	3,6	<b>S6</b>
HCCL <sub>3</sub> 100%					
HCCL <sub>3</sub> 100% e	150	55-60	SOA.6.11	4,8	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 5%					
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 10%	100	61-63	SOA.6.12	1,7	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 15%	50	64-67	SOA.6.13	3,0	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 15% e	50	68-69	SOA.6.14	1,0	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 20%					
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 20%	150	70-72	SOA.6.15	937,6	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 20%	100	73-78	SOA.6.16	709,7	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 20% e	100	79-82	SOA.6.17	81,0	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 30%					
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 40%	50	83-87	SOA.6.18	4,2	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 50%	50	88-92	SOA.6.19	6,3	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 60% e	50	93-97	SOA.6.20	8,3	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 70%					
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 70% e	50	98-107	SOA.6.21	168,9	
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 80%					
HCCL <sub>3</sub> :MeOH 90% e	50	108-111	SOA.6.22	20,8	
MeOH 100%					

Recuperou-se 90,1% da massa inicial

A fração SOA.6.10 (3,6 mg) apresentou um sólido amarelo amorfo solúvel em clorofórmio, com característica de substância pura em CCD. O sólido foi codificado como **S6** e encaminhado para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . As demais frações de SOA.6 não demonstraram perfil de substância pura em CCD.

A fração SOA.6.16 (709,7 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (21 g,  $\varnothing = 2,0$  cm) com os eluentes  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ ,  $\text{AcOEt}$ ,  $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$  e  $\text{MeOH}$  em ordem crescente de polaridade, resultando em 188 frações que foram agrupadas mediante semelhança observada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os dados do fracionamento são mostrados na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração SOA.6.16

Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
$\text{C}_6\text{H}_{14}$ 100%, $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 10% e $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 20%	560	1-8	SOA.6.16.1	10,0	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 20%	50	9-13	SOA.6.16.2	7,0	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 20%	50	14-18	SOA.6.16.3	6,0	<b>S7</b>
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 20% e $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 30%	300	19-25	SOA.6.16.4	8,8	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 30% e $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 40%	200	26-37	SOA.6.16.5	20,7	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 40%	100	38-43	SOA.6.16.6	121,3	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 50% e $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 60%	100	44-54	SOA.6.16.7	51,9	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 70%	150	55-59	SOA.6.16.8	21,3	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 70%	100	60-64	SOA.6.16.9	14,0	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 80%	100	65-69	SOA.6.16.10	2,0	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 80%	100	70-74	SOA.6.16.11	3,9	
$\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ 80% e	100	75-84	SOA.6.16.12	10,9	

C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 90%					
AcOEt 100%	300	85-94	SOA.6.16.13	8,8	
AcOEt:MeOH 10%	100	95-96	SOA.6.16.14	1,0	
AcOEt:MeOH 10%	100	97-104	SOA.6.16.15	3,3	
AcOEt:MeOH 10% e	200	105-109	SOA.6.16.16	5,0	<b>S8</b>
AcOEt:MeOH 20%					
AcOEt:MeOH 20%	100	110-114	SOA.6.16.17	7,8	
AcOEt:MeOH 20%	100	115-119	SOA.6.16.18	2,0	
AcOEt:MeOH 20% e	200	120-125	SOA.6.16.19	33,1	
AcOEt:MeOH 30%					
AcOEt:MeOH 30%	100	126-129	SOA.6.16.20	60,9	
AcOEt:MeOH 30%	100	130-134	SOA.6.16.21	9,6	
AcOEt:MeOH 30%	100	135-139	SOA.6.16.22	7,0	
AcOEt:MeOH 40%	100	140-149	SOA.6.16.23	14,5	
AcOEt:MeOH 50%	100	150-159	SOA.6.16.24	15,8	
AcOEt:MeOH 50% e	100	160-164	SOA.6.16.25	48,9	
AcOEt:MeOH 60%					
AcOEt:MeOH 60%	100	165-169	SOA.6.16.26	2,9	
AcOEt:MeOH 70%	100	170-174	SOA.6.16.27	4,9	
AcOEt:MeOH 70%	100	175-179	SOA.6.16.28	9,8	
AcOEt:MeOH 70%,	200	180-188	SOA.6.16.29	19,0	
AcOEt:MeOH 80% e					
MeOH 100%					

Recuperou-se 74,9 % da massa inicial

A fração SOA.6.16.3 (6,0 mg) resultou no isolamento da substância codificada **S7**, um sólido amarelo amorfo solúvel em metanol. A fração SOA.6.16.16 (5,0 mg) conduziu ao isolamento da substância codificada como **S8**.

Parte da fração SOA.9 (612,9 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 com metanol, resultando em 28 subfrações, que foram reunidas mediante as semelhanças observadas em CCD, **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.9

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-4	SOA.9.1	15,5
MeOH	5-6	SOA.9.2	19,4
MeOH	7-10	SOA.9.3	83,7
MeOH	11-13	SOA.9.4	90,8
MeOH	14-15	SOA.9.5	122,0
MeOH	16-20	SOA.9.6	196,7
MeOH	21-22	SOA.9.7	65,7
MeOH	23-24	SOA.9.8	57,5
MeOH	25-27	SOA.9.9	56,1
MeOH	28	SOA.9.10	57,6

Recuperou-se 125,0 % da massa inicial

A filtração da fração SOA.9 em Sephadex LH 20 não resultou no isolamento de substância pura.

A fração SOA.9.5 (122,0 mg) foi filtrada em Sephadex LH 20 com metanol, resultando em 13 frações que forma reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.9.5

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-2	SOA.9.5.1	22,5
MeOH	3-4	SOA.9.5.2	11,6
MeOH	5-6	SOA.9.5.3	15,4
MeOH	7	SOA.9.5.4	18,9
MeOH	8-9	SOA.9.5.5	9,8
MeOH	10	SOA.9.5.6	3,4
MeOH	11-13	SOA.9.5.7	1,0

Recuperou-se 67,7 % da massa inicial

A filtração da fração SOA.9.5 não resultou no isolamento de substância pura.

Parte da fração SOA.10 (305,5 mg) foi filtrada em Sephadex LH 20 utilizando metanol como eluente, resultando em 35 frações que foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 9**).

**Tabela 9:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.10

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH	1-5	SOA.10.1	4,4	
MeOH	6-10	SOA.10.2	22,5	
MeOH	11-12	SOA.10.3	44,9	
MeOH	13-17	SOA.10.4	103,3	
MeOH	18-22	SOA.10.5	46,5	<b>S9+S10</b>
MeOH	23-26	SOA.10.6	16,7	
MeOH	27-31	SOA.10.7	10,9	
MeOH	32-35	SOA.10.8	4,5	

Recuperou-se 74,5 % da massa inicial

A subfração SOA.10.5 apresentou cristais amarelos amorfo, os quais foram lavados com acetato de etila, conduzindo ao isolamento da mistura de substâncias codificadas como **S9+S10** (33,5 mg). As demais subfrações provenientes da filtração da fração SOA.10 não conduziram ao isolamento de substância pura.

Parte do sobrenadante da fração SOA.12 (73,3 mg) foi filtrada em Sephadex LH 20 com metanol. Obteve-se 36 frações que foram reunidas mediante as semelhanças observadas em CCD, conforme a **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.12

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-2	SOA.12.1	14,6
MeOH	3-5	SOA.12.2	10,0
MeOH	6-7	SOA.12.3	15,6
MeOH	8-10	SOA.12.4	4,8
MeOH	11-15	SOA.12.5	6,2
MeOH	16-20	SOA.12.6	14,9

MeOH	21-26	SOA.12.7	5,4
MeOH	27-30	SOA.12.8	3,2
MeOH	31-36	SOA.12.9	3,2

Recuperou-se 95,4 % da massa inicial

A filtração da fração SOA.12 não conduziu ao isolamento de substância pura.

A fração SOA.16 (516,0 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH 20 com metanol, resultando em 34 frações, as quais foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.16

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1	SOA.16.1	1,9
MeOH	2	SOA.16.2	17,0
MeOH	3-9	SOA.16.3	372,5
MeOH	10-15	SOA.16.4	20,3
MeOH	16-20	SOA.16.5	2,8
MeOH	21-27	SOA.16.6	0,5
MeOH	28-34	SOA.16.7	1,9

Recuperou-se 80,8 % da massa inicial

As subfrações obtidas da filtração de SOA.16 não demonstraram perfil de substância pura em CCD.

A fração SOA.17 (600 mg) foi filtrada em Sephadex LH 20 com metanol, resultando em 70 frações que foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.17

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-5	SOA.17.1	38,8
MeOH	6-11	SOA.17.2	289,9
MeOH	12-16	SOA.17.3	209,8
MeOH	17-26	SOA.17.4	39,8
MeOH	27-31	SOA.17.5	1,2

MeOH	32-41	SOA.17.6	1,9
MeOH	42-61	SOA.17.7	2,2
MeOH	62-70	SOA.17.8	0,3

Recuperou-se 97,3 % da massa inicial

As subfrações provenientes da filtração da fração SOA.17 apresentaram perfil químico complexo em CCD, e portanto não foi possível o isolamento de substâncias puras.

A fração SOA.18 (603,3 mg) foi submetida a filtração em Sephadex-LH 20 utilizando metanol como eluente. Obteve-se 42 frações, as quais foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 13**).

**Tabela 13:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.18

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-7	SOA.18.1	65,0
MeOH	8-14	SOA.18.2	148,7
MeOH	15-18	SOA.18.3	127,4
MeOH	19-26	SOA.18.4	202,0
MeOH	27-31	SOA.18.5	5,4
MeOH	32-37	SOA.18.6	5,5
MeOH	38-42	SOA.18.7	21,0

Recuperou-se 95,3 % da massa inicial

As frações provenientes da filtração de SOA.18 não apresentaram perfil de substância por CCD.

A fração SOA.19 (633,4 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 utilizando metanol como eluente, resultando em 55 frações, que foram agrupadas de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 14**).

**Tabela 14:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.19

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-7	SOA.19.1	27,0
MeOH	8-9	SOA.19.2	15,4
MeOH	10	SOA.19.3	13,9
MeOH	11-15	SOA.19.4	93,0



MeOH	16-20	SOA.19.5	84,8
MeOH	21-25	SOA.19.6	133,5
MeOH	26-30	SOA.19.7	69,9
MeOH	31-35	SOA.19.8	59,9
MeOH	36-45	SOA.19.9	77,3
MeOH	46-48	SOA.19.10	17,4
MeOH	49-50	SOA.19.11	10,2
MeOH	51-53	SOA.19.12	3,0
MeOH	54-55	SOA.19.13	0,2

Recuperou-se 95,6 % da massa inicial

A filtração de SOA.19 não resultou no isolamento de substância pura.

A junção, codificada em SOA.19.6 (133,5 mg), foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (4,00 g, Ø = 0,5 cm) com os eluentes C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH e MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando em 36 frações que foram agrupadas mediante semelhança observada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os dados do fracionamento são mostrados na **Tabela 15**.

**Tabela 15:** Dados da CC em gel de sílica da fração SOA.19.6

Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> 100% e C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 10%	80	1-4	SOA.19.6.1	0,2
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 20%	20	5	SOA.19.6.2	0,1
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 20%	20	6	SOA.19.6.3	31,1
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 30%	20	7-8	SOA.19.6.4	0,6
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 40%	20	9	SOA.19.6.5	4,4
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 50%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 60%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 70%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 80%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 90% e	160	10-20	SOA.19.6.6	38,8

AcOEt 100%				
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :AcOEt 90%, AcOEt 100%, AcOEt:MeOH 10% e AcOEt:MeOH 20%	120	21-29	SOA.19.6.7	0,7
AcOEt:MeOH 20% , AcOEt:MeOH 30%, AcOEt:MeOH 40%, AcOEt:MeOH 50% e AcOEt:MeOH 60%	140	30-36	SOA.19.6.8	0,2

Recuperou-se 57,0 % da massa inicial

O fracionamento da fração SOA.19.6 não resultou no isolamento de substâncias puras.

As frações SOA.19.9, SOA.19.10 e SOA.19.11 foram agrupadas. A junção, codificada como SOA.19.9-11 (104,9 mg), foi fracionada em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (3,12 g, Ø = 0,5 cm) com os eluentes C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:HCCl<sub>3</sub>, HCCl<sub>3</sub>, HCCl<sub>3</sub>:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH e MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando em 60 frações que foram agrupadas mediante semelhança observada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os dados do fracionamento são mostrados na **Tabela 16**.

**Tabela 16:** Dados da CC em gel de sílica da fração SOA.19.9-11

Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> 100%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 10%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 20% e C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 30%	150	1-7	SOA.19.9-11.1	2,8
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 40%, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 60% e C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 80%	60	8-13	SOA.19.9-11.2	0,9

C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : HCCl <sub>3</sub> 90%, HCCl <sub>3</sub> 100% e HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 10%	60	14-19	SOA.19.9-11.3	1,4
HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 10%, HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 20%, HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 40% e HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 50%	80	20-26	SOA.19.9-11.4	3,5
HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 50% e HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 60%	60	27-28	SOA.19.9-11.5	33,8
HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 60% e HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 70%	60	29-31	SOA.19.9-11.6	29,5
HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 80%, HCCl <sub>3</sub> :AcOEt 90% e AcOEt 100%	100	32-39	SOA.19.9-11.7	10,9
AcOEt 100% e AcOEt:MeOH 10%		40-42	SOA.19.9-11.8	0,7
AcOEt:MeOH 10%, AcOEt:MeOH 20% e AcOEt:MeOH 30%	80	43-49	SOA.19.9-11.9	0,1
		50-60	SOA.19.9-11.10	2,0

Recuperou-se 83,8 % da massa inicial

Este procedimento não conduziu ao isolamento de substância pura.

A fração SOA.20 (500 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH 20 utilizando metanol com eluente, resultando em 40 frações, que foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 17**.

**Tabela 17:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.20

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-4	SOA.20.1	32,5
MeOH	5-6	SOA.20.2	54,9
MeOH	7-8	SOA.20.3	67,2

MeOH	9	SOA.20.4	44,4
MeOH	10-15	SOA.20.5	180,0
MeOH	16-20	SOA.20.6	53,2
MeOH	21-25	SOA.20.7	21,2
MeOH	26-30	SOA.20.8	5,7
MeOH	31-35	SOA.20.9	3,6
MeOH	36-40	SOA.20.10	2,6

Recuperou-se 93,1 % da massa inicial

A filtração da fração SOA.20 não conduziu ao isolamento de substância pura.

A fração SOA.23 (894,9 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 com metanol, resuntando em 51 subfrações, que foram reunidas mediante as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 18**).

**Tabela 18:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.23

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-8	SOA.23.1	26,1
MeOH	9-14	SOA.23.2	16,3
MeOH	15-21	SOA.23.3	68,8
MeOH	22-23	SOA.23.4	9,8
MeOH	24-26	SOA.23.5	30,5
MeOH	27-31	SOA.23.6	33,2
MeOH	32-34	SOA.23.7	8,3
MeOH	35-36	SOA.23.8	7,6
MeOH	37-43	SOA.23.9	358,0
MeOH	44-49	SOA.23.10	125,5
MeOH	50-51	SOA.23.11	98,5

Recuperou-se 87,5 % da massa inicial

A filtração da fração SOA.23 não conduziu ao isolamento de substância pura.

A fração SOA.24 (900,6 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 com metanol, resuntando em 40 subfrações, que foram reunidas mediante as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 19**).

**Tabela 19:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.24

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-5	SOA.24.1	147,2
MeOH	6-10	SOA.24.2	220,0
MeOH	11-15	SOA.24.3	68,3
MeOH	16-24	SOA.24.4	62,5
MeOH	25-27	SOA.24.5	1,0
MeOH	28	SOA.24.6	2,2
MeOH	29-35	SOA.24.7	10,8
MeOH	36-37	SOA.24.8	23,5
MeOH	38-40	SOA.24.9	48,2

Recuperou-se 65,5% da massa inicial

O fracionamento da fração SOA.24 resultou em frações constituídas provavelmente de misturas de compostos fenólicos de difícil separação, devido aos coeficientes de retenção muito próximos observados em CCD.

A fração SOA.25 (514,0 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 com metanol, resultando em 29 subfrações, que foram reunidas mediante as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 20**).

**Tabela 20:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SOA.25

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
MeOH	1-6	SOA.25.1	246,7
MeOH	7-12	SOA.25.2	118,9
MeOH	13-18	SOA.25.3	78,9
MeOH	19-24	SOA.25.4	60,1
MeOH	25-27	SOA.25.5	2,0

Recuperou-se 98,6% da massa inicial

Este procedimento não resultou no isolamento de substância pura.

### 3.4.3.2 Estudo da fração hexânica SOH

Parte da fração SOH (1000 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de gel de sílica 60 (30 g,  $\varnothing = 1,5$  cm) com os eluentes  $C_6H_{14}$ ,  $C_6H_{14}:HCCl_3$ ,  $HCCl_3$ ,  $HCCl_3:MeOH$  e  $MeOH$  em ordem crescente de polaridade, resultando em 129 frações que foram agrupadas mediante semelhança observada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os dados do fracionamento são mostrados nas **Tabelas 21 e 22**.

**Tabela 21:** Dados do fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica da fração hexânica SOH

Eluente	Volume (mL)	Frações
$C_6H_{14}$ 100%	686	1-57
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 2%	60	58-60
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 5%	60	61-65
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 10%	60	66-70
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 20%	50	71-74
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 30%	100	75-80
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 40%	50	81-84
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 50%	100	85-90
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 60%	50	91-93
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 70%	50	94-96
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 80%	50	97-98
$C_6H_{14}:HCCl_3$ 90%	100	99-106
$HCCl_3$ 100%	50	107-109
$HCCl_3:MeOH$ 5%	100	110-120
$HCCl_3:MeOH$ 10%	50	121-123
$HCCl_3:MeOH$ 20%	50	124-127
$MeOH$ 100%	50	128-129

**Tabela 22:** Dados das junções das frações obtidas no fracionamento da fração hexânica SOH

Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
1-2	SOH.1	223,0	

---

3	SOH.2	50,8	
4	SOH.3	10,9	
5-6	SOH.4	3,9	<b>S11</b>
7	SOH.5	25,9	
8	SOH.6	35,6	
9	SOH.7	62,3	
10-12	SOH.8	78,5	
13-14	SOH.9	78,9	
15-17	SOH.10	108	
18-20	SOH.11	21,9	
21-23	SOH.12	18,7	
24	SOH.14	7,8	
25-29	SOH.15	30,6	
30	SOH.16	2,3	
31-32	SOH.17	10,7	
33	SOH.18	7,5	
34-40	SOH.19	2,0	
41-46	SOH.20	6,7	
47-52	SOH.21	12,3	
53-56	SOH.22	11,2	
57-74	SOH.23	4,5	
75-80	SOH.24	8,1	
81-87	SOH.25	9,0	
88-95	SOH.26	5,6	
96-106	SOH.27	9,8	
107-112	SOH.28	7,6	
113-115	SOH.29	9,7	
116-120	SOH.30	5,4	
121	SOH.31	2,3	
122-123	SOH.32	5,2	
124-129	SOH.33	3,8	

---

Recuperou-se 88,1% da massa inicial

A fração SOH.4 apresentou-se como um óleo vermelho solúvel em hexano, o qual mostrou característica de substância pura quando submetido à CCD e revelada com anisaldeído. Desta forma, a fração foi encaminhada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  resultando no isolamento da substância **S11**.

#### **4 Bioensaio para a avaliação da atividade antiproliferativa de extratos e frações de *Saccharum X officinarum* contra células cancerosas humanas**

A avaliação de atividade antiproliferativa foi realizada na Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, sob coordenação dos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Tasca Ruiz.

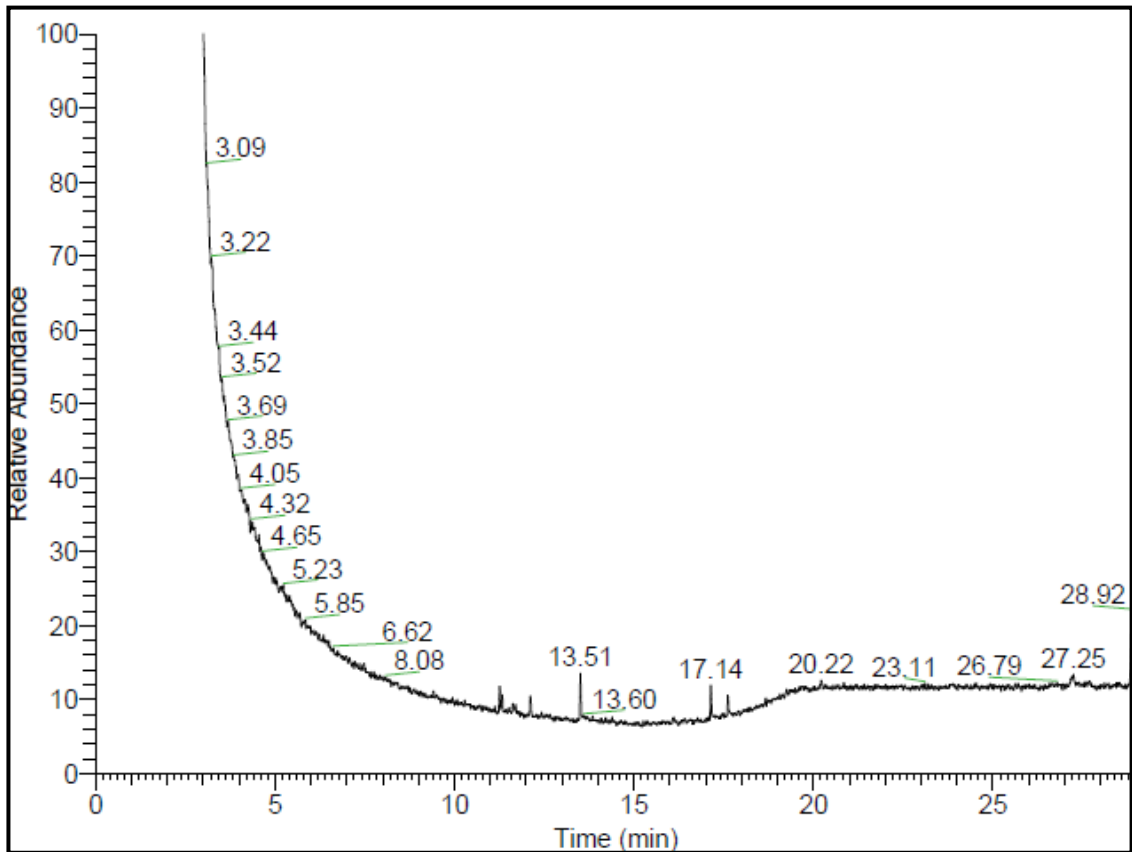
Os ensaios *in vitro* para a avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto acetato de etila, fração acetato de etila e o flavonoide tricín foram realizados conforme literatura (Monks *et al.*, 1991; Shoemaker, 2006; Skehan *et al.*, 1990). Oito linhagens de células tumorais humanas, U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão); PC-3 (prostata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colo) e HaCat (células não tumorais queratinócitos), foram gentilmente doadas pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP). As culturas de células foram cultivadas em meio contendo 5 mL de RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL) e uma mistura de penicilina e estreptomicina. As células foram adicionadas em placas de 96 poços ( $100 \mu\text{L} \cdot \text{poço}^{-1}$ ) e foram expostas a diferentes concentrações de extrato bruto AcOEt, fração AcOEt e o flavonoide tricín em DMSO/meio RPMI (0,25, 2,5, 25,0, 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), sendo posteriormente incubadas a  $37^\circ\text{C}$  sob 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 h. As células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% antes (placa  $T_0$ ) e após (placa  $T_1$ ) a adição das amostras. A proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular utilizando suforrodamina B. O  $\text{GI}_{50}$  (concentração que resulta na inibição de 50% do crescimento celular) foi determinado por meio da regressão não-linear utilizando o *software* ORIGIN 8.0 (OriginLab corporation).



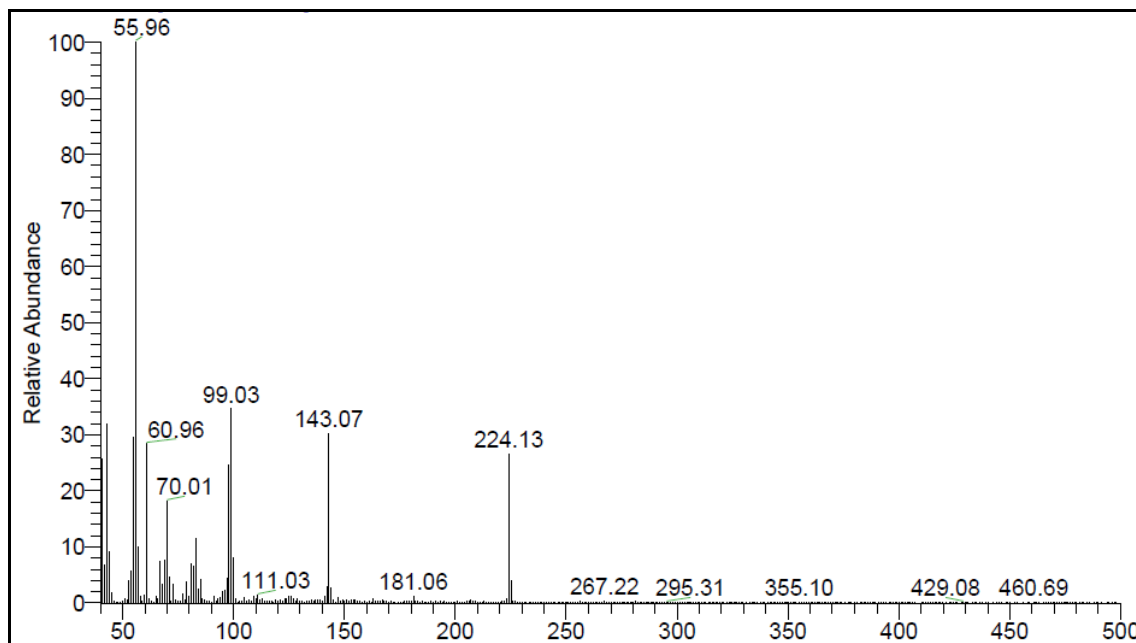
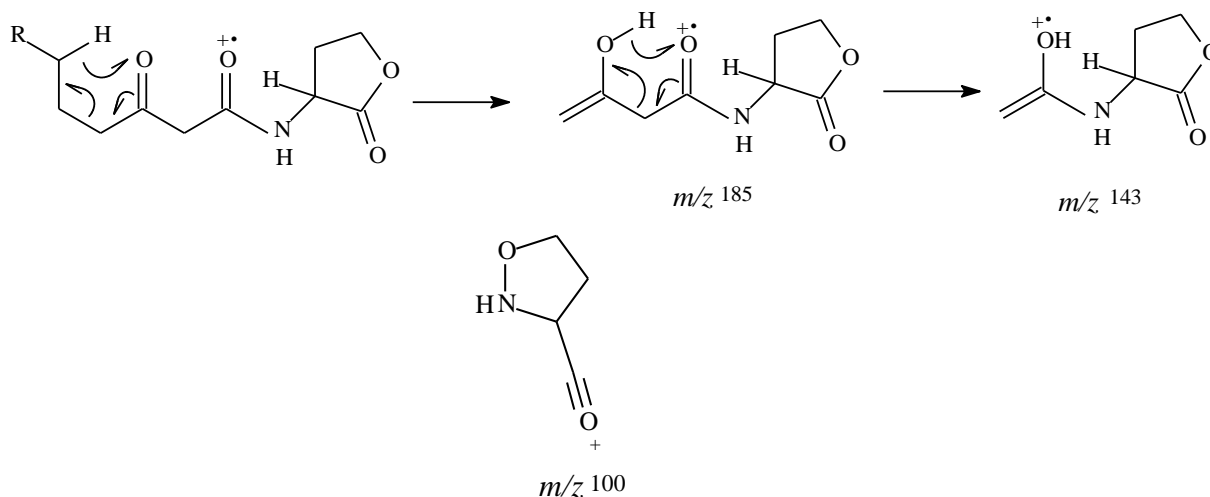
## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Identificação de acil homosserinas lactonas presentes nas folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum*.

O isolamento de AHLs a partir de tecidos vegetais pode ser considerado um árduo desafio. As AHLs são reconhecidamente produzidas por bactérias em pequenas concentrações, geralmente em níveis nanomolares. Por esta razão, foi utilizada uma grande quantidade de material vegetal hidratado para preparação do extrato bruto acetato de etila (Wang *et al.*, 2011). Considerando ainda, a média polaridade das acil-homosserina lactonas, a fração acetato de etila obtida a partir do extrato bruto acetato de etila foi o alvo da pesquisa na busca por caracterizar estas moléculas nos tecidos de *Saccharum X officinarum*. Diversas purificações em coluna cromatográfica de sílica gel e Sephadex LH 20 foram realizadas com o objetivo de obter frações com perfil cromatográfico simples, baixa polaridade, ausência de clorofila e ácidos graxos. Após estas purificações, 22 frações foram selecionadas para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, as quais foram monitorados os fragmentos típicos de substâncias pertencentes à classe das acil-homosserinas lactonas em  $m/z$  185, 143, 102, 100 e 85 (Chhabra *et al.*, 1993). Nestas análises, a fração SOA 17.7 apresentou no cromatograma (**Figura 14**) um pico em 13,51 minutos com padrão de fragmentação de interesse.

**Figura 14:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a fração SOA 17.7

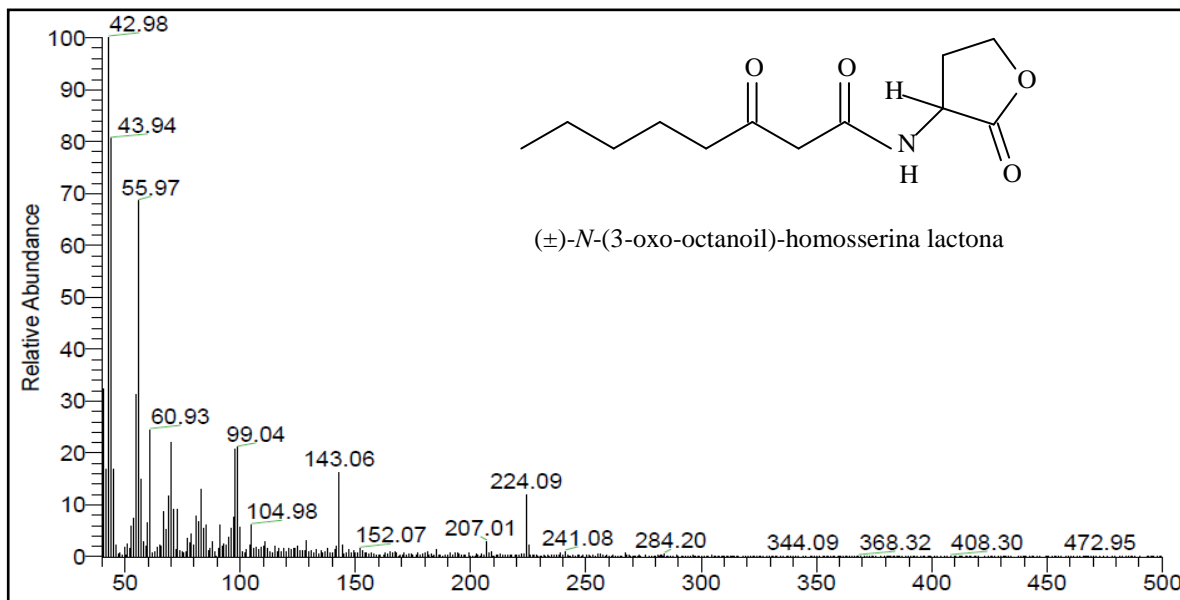
O pico apresentou um espectro de massas (**Figura 15**) com fragmentos característicos desta classe de substâncias, como o observado em  $m/z$  143,07 (20 %) resultante do rearranjo de McLafferty do grupo carbonila da cadeia lateral acila (**Figura 16**). Outro pico característico foi observado em  $m/z$  100,02 (24 %) referente ao fragmento homosserina lactona.

**Figura 15:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a fração SOA 17.7**Figura 16:** Proposta de fragmentos característicos de acil-homosserina lactonas por CG-EM (70 eV, IE)

Devido à ausência do pico do íon molecular, e com o objetivo de determinar a estrutura exata da possível acil-homosserina lactona identificada nos tecidos de *Saccharum X officinarum*, foi realizada a injeção em CG-EM do padrão ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona nas mesmas condições experimentais as quais a fração SOA 17.7 foi analisada. No espectro de massas para o padrão (**Figura 17**) foram observados os picos em  $m/z$  224,09, 143,06, 100,0 e 99,04, sendo que esses picos

também são observados no espectro de massas para a fração SOA 17.7. A comparação entre os espectros de massas da fração SOA 17.7 com o padrão permitiram inferir a ocorrência da substância *N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona na fração SOA 17.7

**Figura 17:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o padrão ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona.

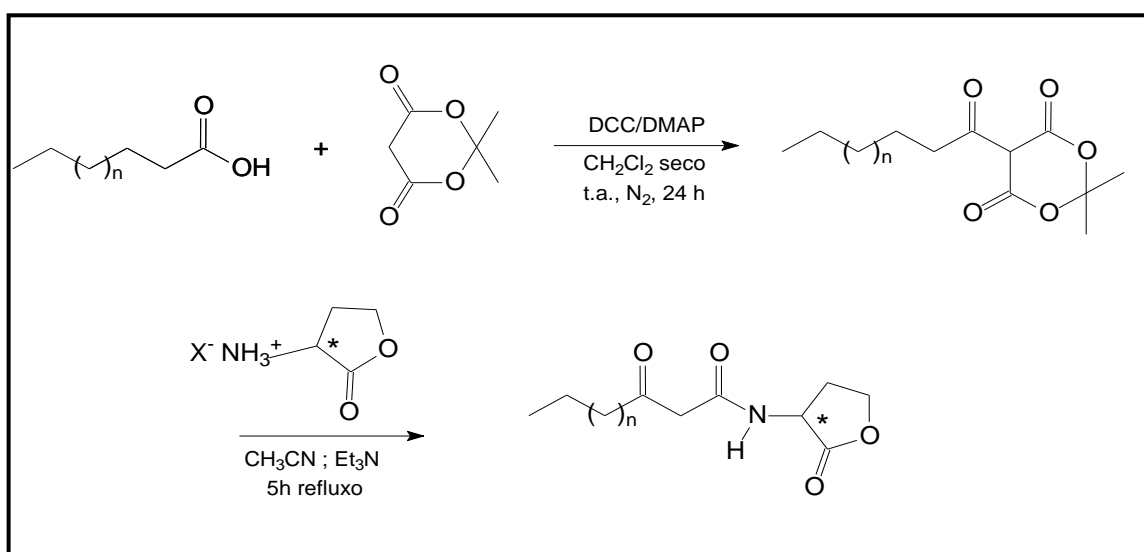


Acil-homosserina lactonas têm sido extensivamente estudadas devido a sua ampla participação no sistema de comunicação entre bactérias (QS) (Whitehead *et al.*, 2001). O conhecimento sobre a sua presença e seus efeitos fisiológicos na colônia bacteriana e na planta hospedeira é importante, pois a partir deste, pode-se manipular fatores fenotípicos benéficos à planta hospedeira impactando seu desenvolvimento e crescimento (Asis *et al.*, 2000; Boddey *et al.*, 1991; Boddey *et al.*, 1995). Na literatura, existem muitos trabalhos sobre a identificação e isolamento de acil-homosserina lactonas a partir de cultivos de bactérias, o que facilita sua identificação, uma vez que se trata de um semioquímico e, portanto produzido em baixas concentrações (Pomini *et al.*, 2005; Pomini *et al.*, 2007; Pomini *et al.*, 2009). A identificação da substância *N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona a partir do extrato bruto acetato de etila das folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum* é um resultado pioneiro na literatura e muito significativo que nos motiva a investigar efeitos biológicos que esta substância pode provocar nesta espécie no sentido de aumento de produtividade. Assim, a partir deste resultado, uma série de acil-homosserina lactonas foi sintetizada e posteriormente avaliada quanto aos seus potenciais biológicos em *Saccharum X officinarum*.

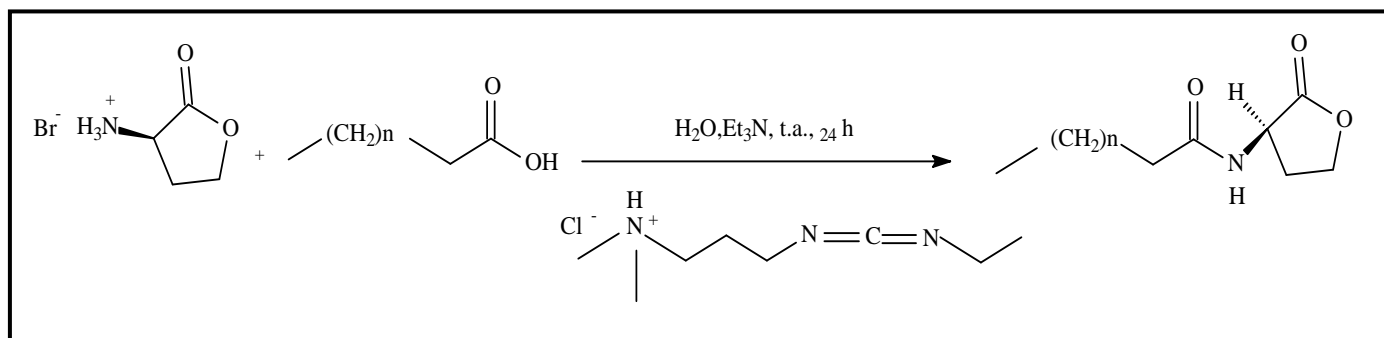
## 5.2 Síntese de acil-homosserina lactonas

Nove acil-HSLs, sendo cinco delas com a presença de um grupo carbonila na posição 3' e quatro sem o grupo carbonila, foram sintetizadas de acordo com as rotas sintéticas dos **Esquemas 3 e 4**, com o objetivo de submeter estas substâncias à bioensaios de crescimento de cana-de-açúcar.

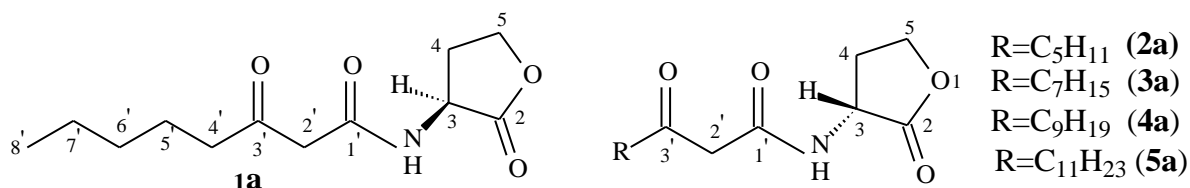
**Esquema 3:** Rota de síntese para a preparação de acil homosserinas com o grupo carbonila na posição 3' (Pomini *et al.*, 2009).



**Esquema 4:** Rota de síntese para a preparação de acil-homosserinas sem o grupo carbonila na posição 3' (Pomini *et al.*, 2009).

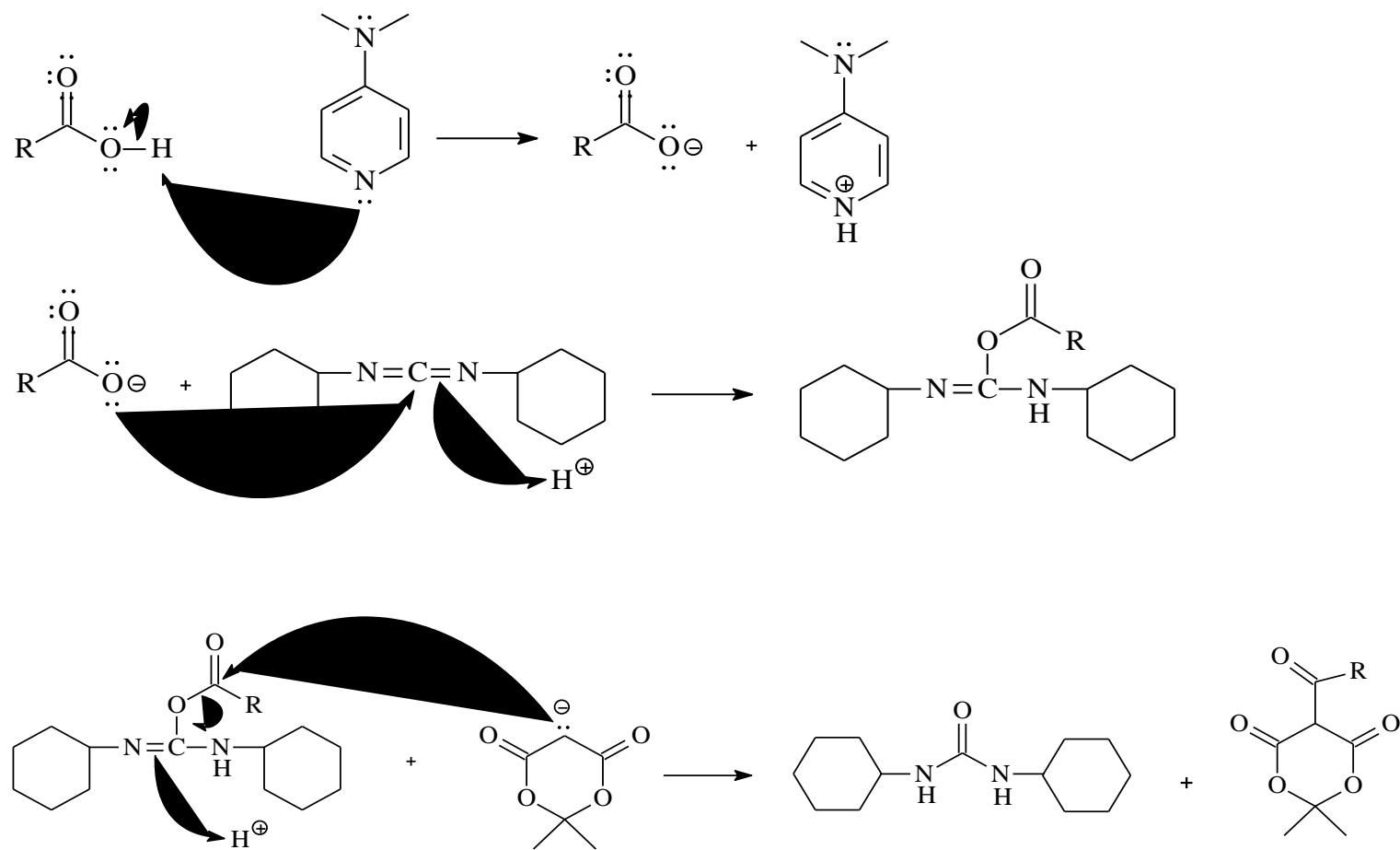


### 5.2.1 Síntese de acil-homosserina lactonas com grupo carbonila na posição 3'

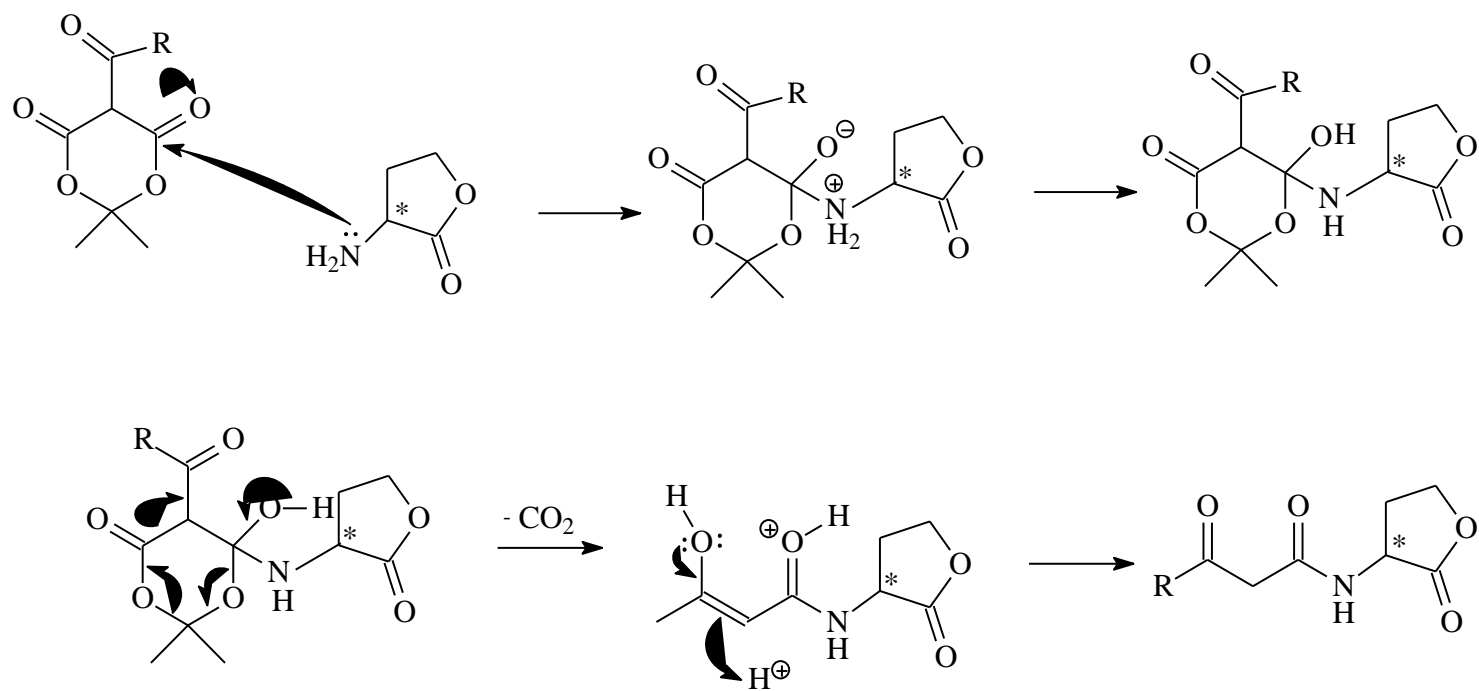


Os derivados com o grupo carbonila na posição 3' da cadeia lateral foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na literatura (Pomini *et al.*, 2009) com modificações. Na primeira etapa da rota sintética mostrada no **Esquema 3**, ocorre a reação de formação de ligação carbono-carbono pelo ataque nucleofílico do reagente de Meldrum ao anidrido de ácido gerado *in situ* pela reação entre o ácido carboxílico utilizado e pela dicitcloexilcarbodiimida (DCC) obtendo-se assim derivados de Meldrum. Na segunda etapa um ataque nucleofílico da porção amino de (*S*) ou (*R*)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona ao derivado de Meldrum ocorre simultaneamente à descarboxilação em temperatura de refluxo da acetonitrila, obtendo-se assim as substâncias (*S*)-*N*-(3-oxo-octanóil)-homosserina lactona (**1a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-octanóil)-homosserina lactona (**2a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-decanóil)-homosserina lactona (**3a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanóil)-homosserina lactona (**4a**) e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanóil)-homosserina lactona (**5a**) com rendimentos de 45, 55, 40, 62 e 70%, respectivamente. O mecanismo da rota sintética está representado nas **Figuras 18 e 19**. A otimização da síntese destas substâncias se deu pela substituição de fluxo contínuo de  $N_2$  ao longo do tempo reacional por apenas uma aspersão inicial na primeira etapa, minimizando a evaporação do solvente ao longo do processo. Na segunda etapa, a erradicação do uso de agitação inicial à temperatura ambiente e o uso de um maior tempo de refluxo foi realizada. Essas modificações aumentaram os rendimentos reacionais em comparação com a literatura (Pomini *et al.*, 2009), tendo sido observados com as otimizações metodológicas rendimentos médios globais de 55 %, superiores aos 28% encontrados na literatura (Pomini *et al.*, 2009).



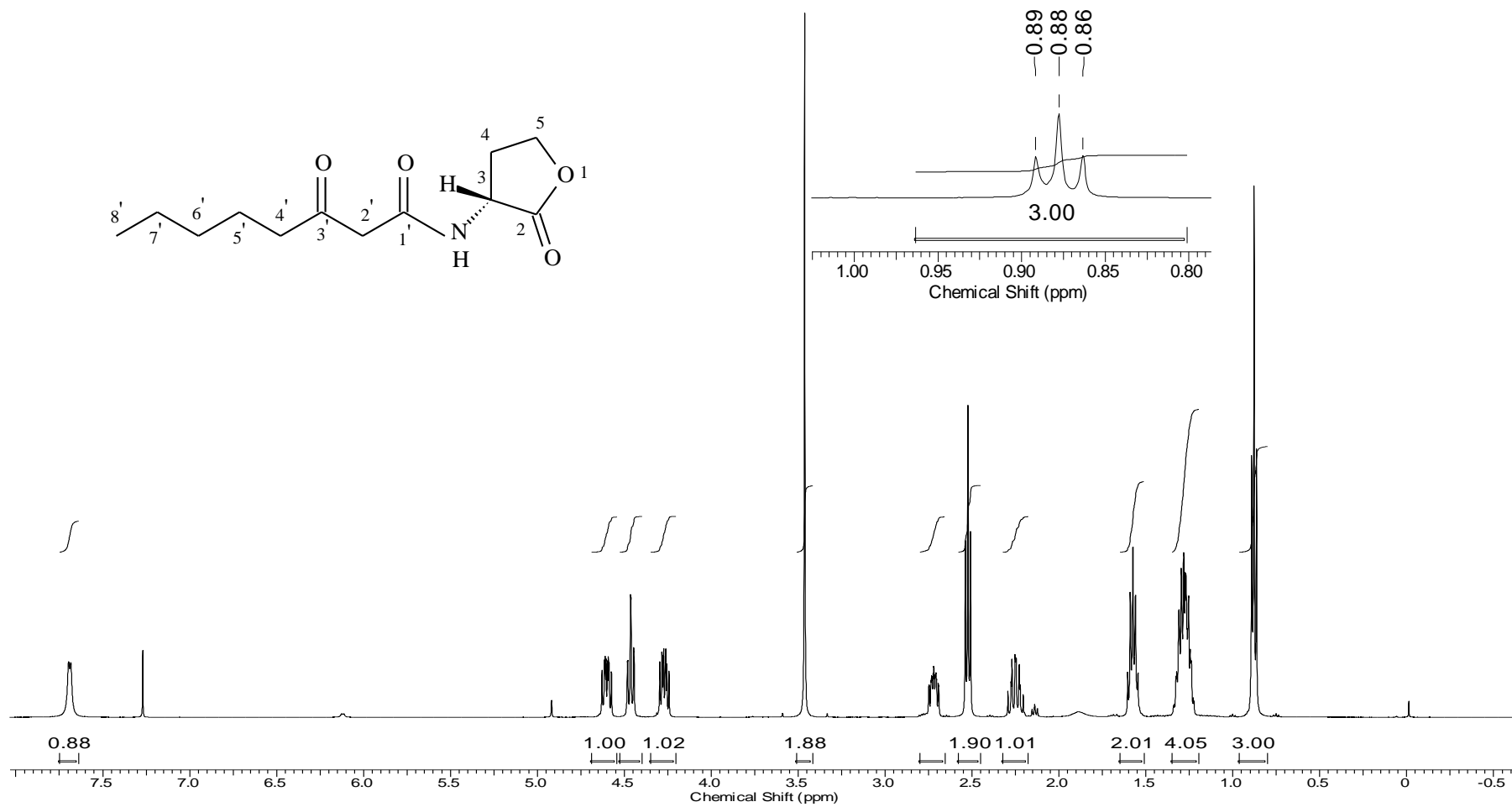
**Figura 18:** Mecanismo para a primeira etapa da síntese de acil-homosserinas substituídas na posição 3'.

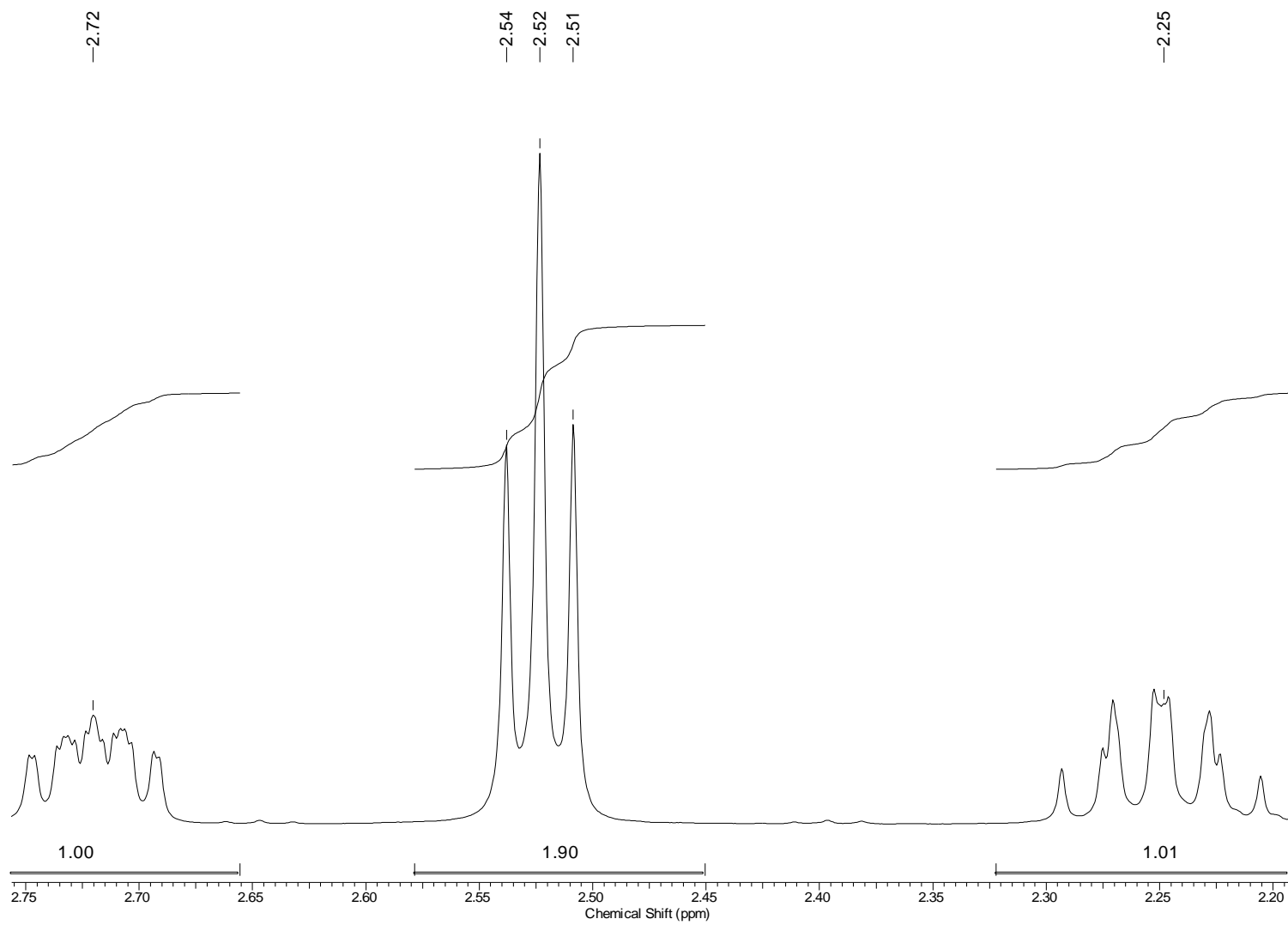


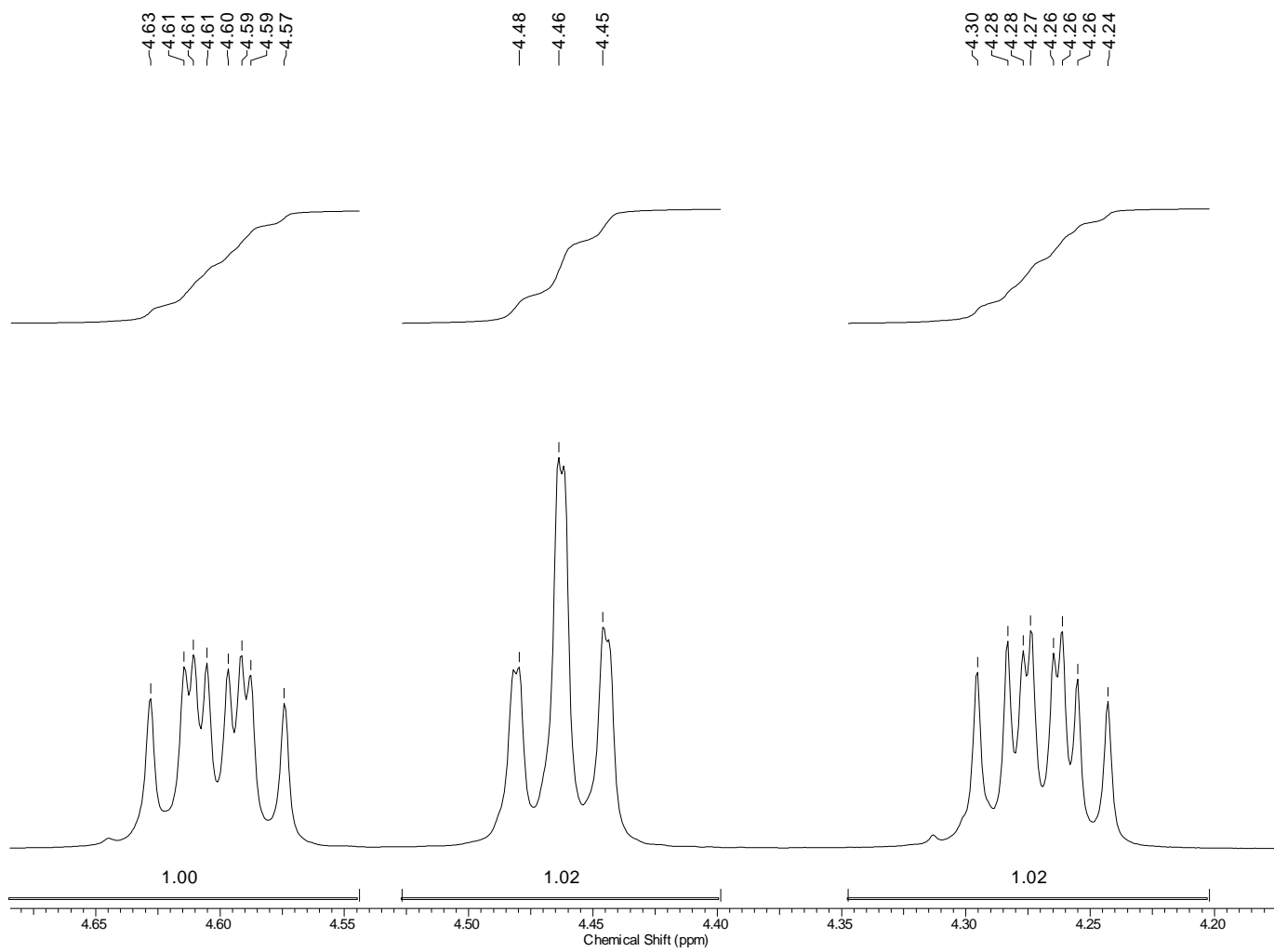
**Figura 19:** Mecanismo para a segunda etapa da síntese de acil-homosserinas substituídas na posição 3'.

Nos espectros de massas das substâncias sintetizadas (**1-5a**) (**Figuras 20-24, Anexo 1**) destacam-se os picos em  $m/z$  143 e 99 atribuídos ao fragmento oriundo do rearranjo de McLafferty do grupo carbonila da cadeia lateral e o fragmento acil-homosserina lactona. Para estas substâncias não foi possível observar os picos dos íons moleculares.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 25-27**) da substância sintetizada (**2a**) destacam-se duplo duplete em  $\delta$  4,60 ( $J$  9,0; 10,8 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3 e dois duplo duplo duplete na região de  $\delta$  4,44 ( $J$  9,0; 9,0; 1,8 Hz) e  $\delta$  4,30 ( $J$  10,8; 9,0; 6,6 Hz) atribuído aos hidrogênios H-5a e H-5b. Os hidrogênios diastereotópicos H-4a e H-4b apareceram como multipletos em  $\delta$  2,57 e 2,25, sendo estes sinais característicos da porção lactona. O sinal atribuído aos hidrogênios do sistema  $\beta$ -dicarbonílico H-2' foi observado em  $\delta$  3,47 como um singlete. Ainda foram observados o sinal dos hidrogênios H-4' em  $\delta$  2,53 como um tripleto e H-5' em  $\delta$  1,58 como um multiplete. Por fim, foram observados o multiplete em  $\delta$  1,30 referente aos hidrogênios dos grupos metilênicos H-6' e H-7' e o tripleto referente ao grupo metila terminal em  $\delta$  0,88.

**Figura 25:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2a**

**Figura 26:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2a**

**Figura 27:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500,13 MHz) de **2a**

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT para a substância **2a** (**Figuras 28-29**) foram evidenciados sinais característicos da porção lactona em  $\delta$  177,2 (C-2), 50,1 (C-3), 32,3 (C-4) e em  $\delta$  67,2 referente ao carbono C-5. Pode-se confirmar a estrutura do produto pela presença de sinais de carbonos carbonílicos da cadeia lateral em  $\delta$  169,4 (C-1') e 206,4 (C-3') além de sinais de carbonos metilênicos em  $\delta$  43,6, 34,3, 24,1 e 23,5 atribuídos aos carbonos C-4', C-5', C-6' e C-7', respectivamente. O sinal observado em  $\delta$  14,3 foi atribuído ao carbono do grupo metila C-8'. As correlações entre carbonos e hidrogênios foram observadas no mapa de contornos heteronuclear HSQC (**Figura 30**) e auxiliaram na determinação da estrutura. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão listados na **Tabela 23**.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **1a**, **3a**, **4a** e **5a** foram observados deslocamentos químicos similares aos observados para **2a** (**Figuras 31-34, Anexo 2**) e (**Figuras 35-38, Anexo 2**) e, portanto não serão discutidos. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **1a**, **3a**, **4a** e **5a** estão listados nas **Tabelas 24-27** do **Anexo 2**.

**Tabela 23:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HSQC para (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona **2a**

C-DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (multiplicidade, <i>J</i> Hz)
2-C	175,2	-
3-CH	49,2	4,61 (dd,9,3; 10,8)
4-CH <sub>2</sub>	29,8	2,25 (m) 2,72 (m)
5-CH <sub>2</sub>	66,1	4,28 (ddd, 9,0; 1,8) 4,46 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'-C	166,7	-
2'-CH <sub>2</sub>	48,5	3,46 (s)
3'-C	206,7	-
4'-CH <sub>2</sub>	43,9	2,52 (t, 7,5)
5'-CH <sub>2</sub>	23,2	1,57 (m)
6'-CH <sub>2</sub>	31,3	1,28 (m)
7'-CH <sub>2</sub>	22,5	1,28 (m)
8'-CH <sub>2</sub>	14,1	0,88 (t, 9,3)

( $\delta$ -ppm; 125 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 500 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

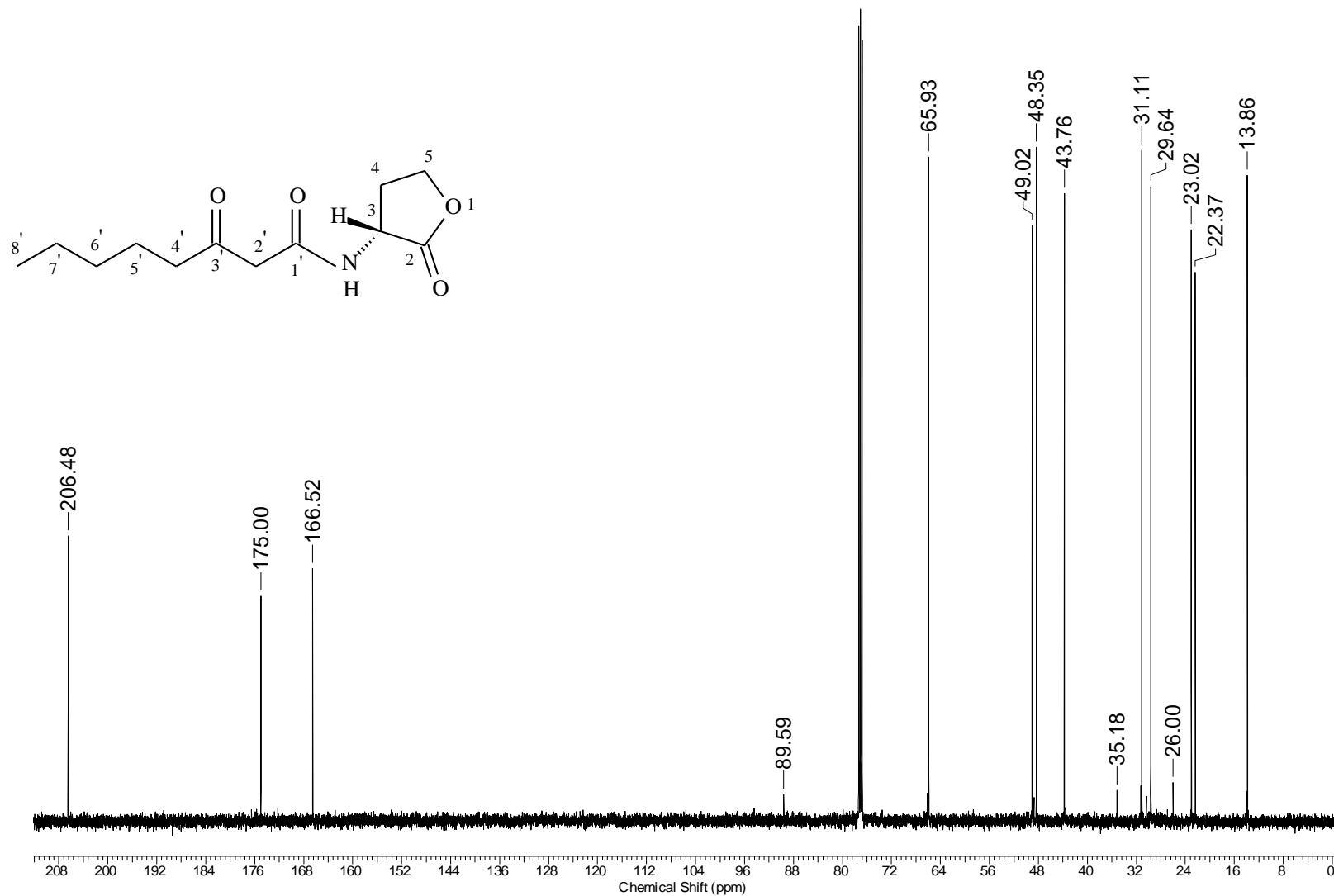
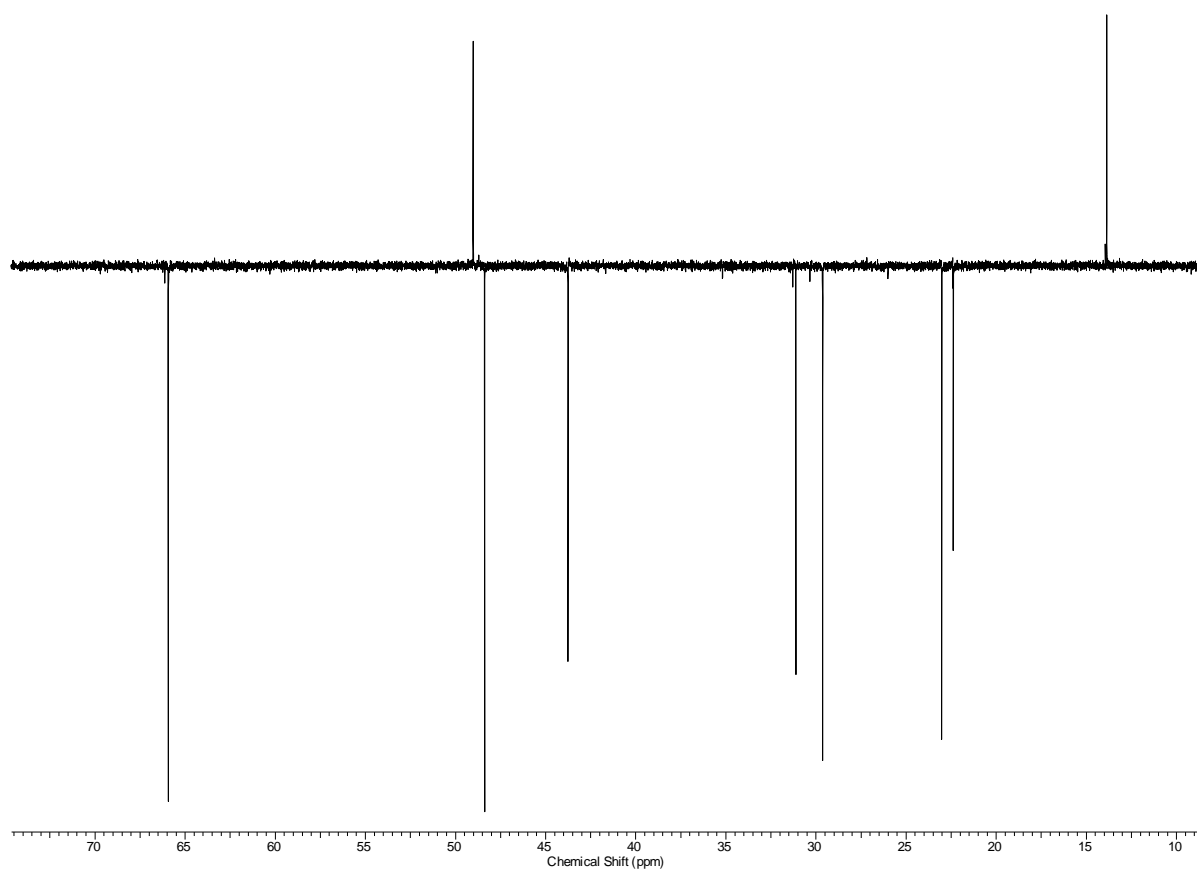
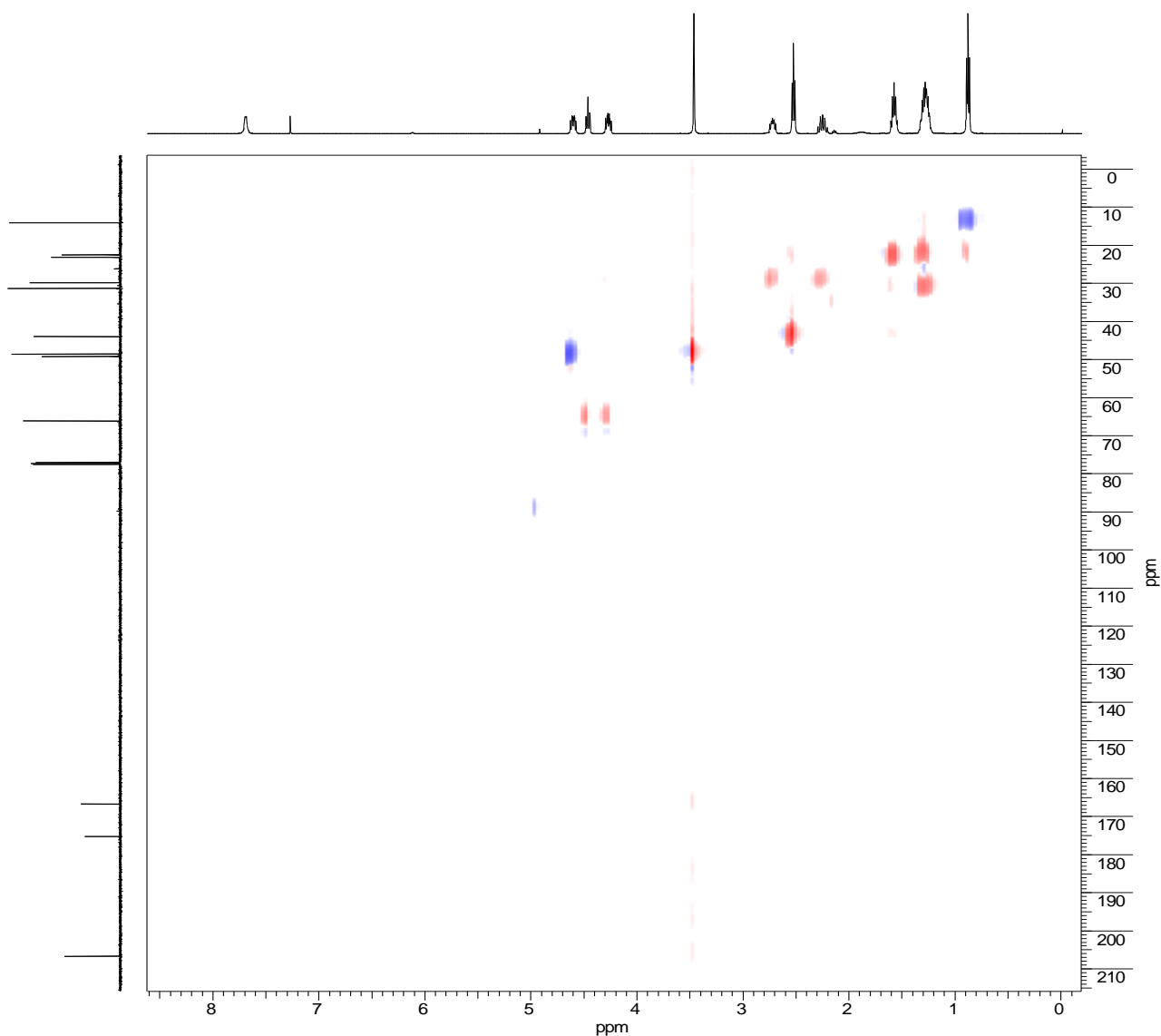
Figura 28: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125,5 MHz) de **2a**

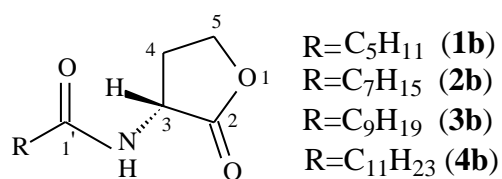
Figura 29: Espectro de DEPT 135° de 2a





**Figura 30:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para a **2a**

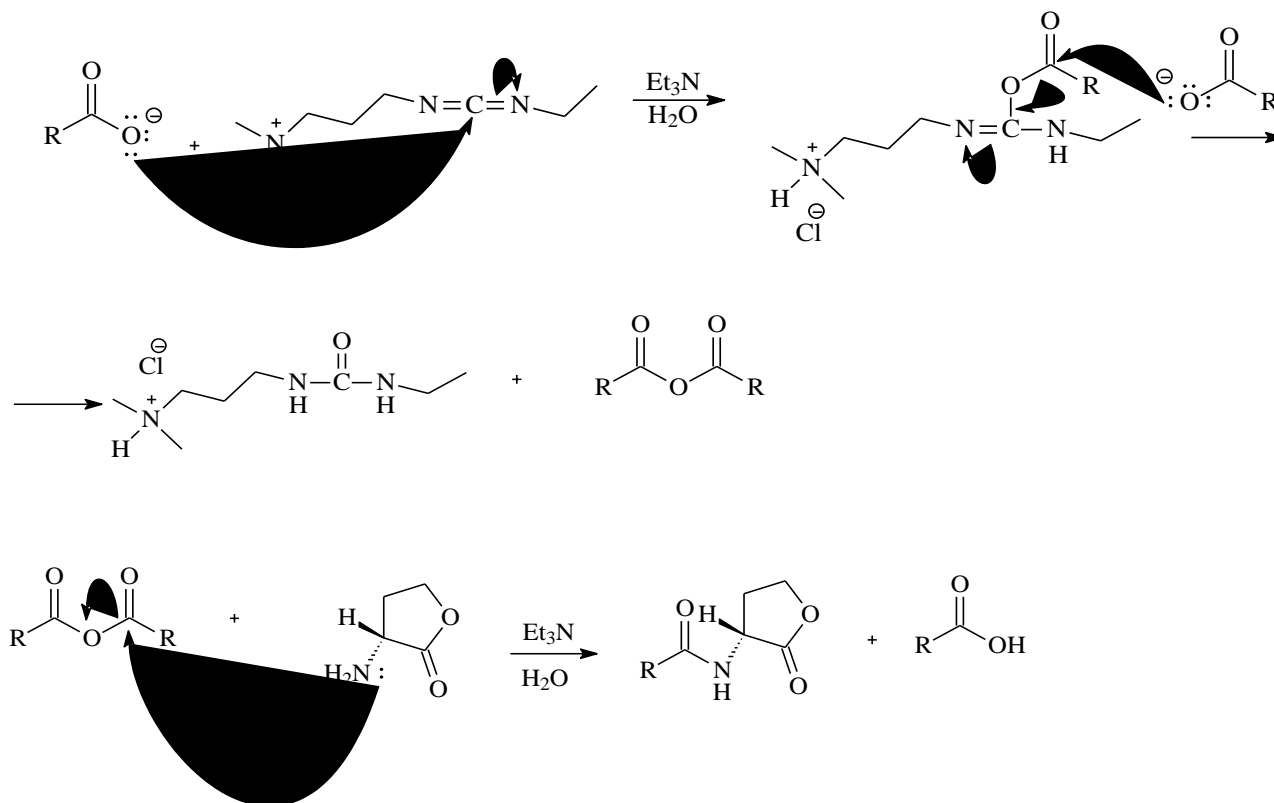
### 5.2.2 Síntese das acil-homosserinas lactonas de cadeia linear saturada



As acil-homosserina lactonas sem o grupo carbonila na posição 3' foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na literatura (Pomini *et al.*, 2009). A

formação dos produtos ocorre através da acilação do reagente  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona com os ácidos carboxílicos correspondentes na presença de um derivado carbodiimida, sendo que o mecanismo da reação está representado na **Figura 39** (March, 1965). As substâncias (*R*)-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona (**1b**), (*R*)-*N*-(octanoil)-homosserina lactona (**2b**), (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**3b**) e o enantiômero (*S*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**4b**) e (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona (**5b**) foram obtidas com rendimentos de 20, 48, 50 e 45%, respectivamente.

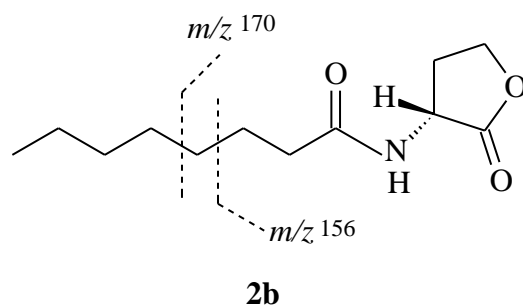
**Figura 39:** Mecanismo de síntese para acil-homosserinas sem substituintes na cadeia lateral



Nos espectros de massas de baixa resolução das substâncias (**1b-5b**) (**Figuras 40-43, Anexo 2**) foi possível determinar as massas moleculares através dos picos dos íons moleculares em  $m/z$  227,15 para a substância **2b**,  $m/z$  255,13 para a substância **3b** e  $m/z$  283,20 para a substância **4b** e  $m/z$  255,8 para **5b**. Destaca-se ainda o pico base em  $m/z$  143 característico desta classe de substâncias, bem como os picos em  $m/z$  156 e 170

referente aos fragmentos tipicamente observados em acil-homosserina lactonas de cadeia linear saturada, **Figura 44**.

**Figura 44:** Fragmentações típicas de acil-homosserina lactonas de cadeia linear saturada observadas para as substâncias **1b-4b**.



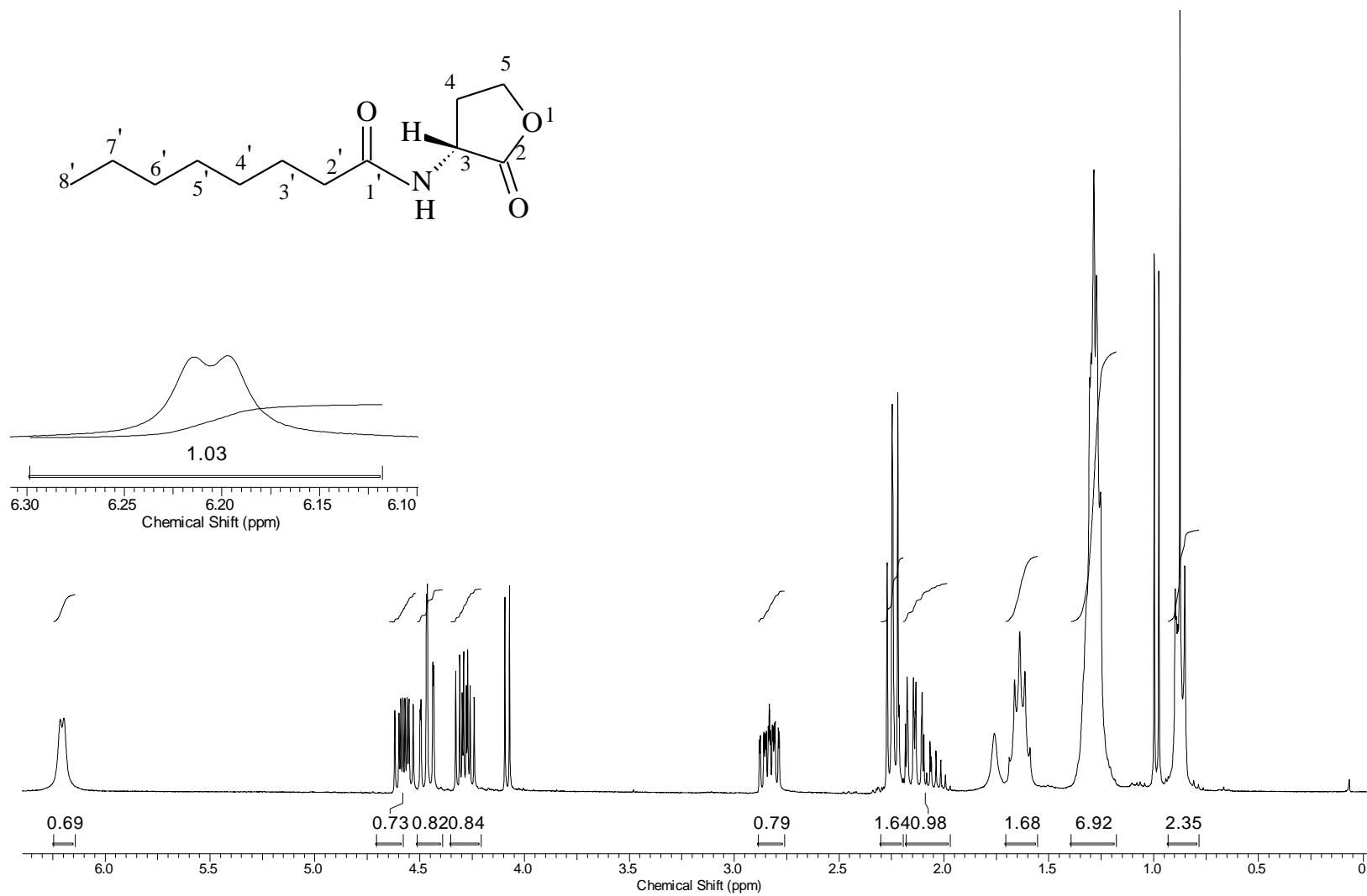
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **2b** (**Figuras 45-46**) foram observados duplo duplete em  $\delta$  4,48 referentes aos hidrogênios H-3 ( $J$  9,0; 10,8 Hz), bem como os duplo duplo dupletos em  $\delta$  4,40 e  $\delta$  4,28 referentes aos hidrogênios diastereotópicos H-5a e H-5b. Destacam-se ainda os multipletos em  $\delta$  2,14 e  $\delta$  2,48 atribuídos aos hidrogênios H-4a e H-4b da porção lactona. O sinal dos hidrogênios H-2' aparece na forma de triplete em  $\delta$  2,20. A principal diferença entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **1a-5a** e **1b-5b** é a ausência do sinal na região de  $\delta$  3,50 atribuído aos hidrogênios metilênicos entre as funções amida e cetona da cadeia lateral.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para **2b** (**Figuras 47**) observaram-se sinais de carbonos da porção lactona em  $\delta$  172,0 (C-2), 50,0 (C-3), 32,0 (C-4) e 67,2 (C-5). Os carbonos carbonílicos da cadeia lateral aparecem em  $\delta$  173,0 e os sinais dos carbonos metilênicos na faixa de  $\delta$  13,0-40,0. O grupo metila terminal da cadeia lateral aparece em  $\delta$  13,0. No mapa de contornos HMBC (**Figura 48**) para a substância **2b** foram observadas as correlações heteronucleares do hidrogênio H-5 em  $\delta$  4,57 com o carbono C-2 em  $\delta$  176,6 e C-3 em  $\delta$  49,1. Além disso, foram observadas as correlações do hidrogênio H-3' em  $\delta$  1,67 com o carbono C-5' em  $\delta$  29,1 e do hidrogênio H-8' em  $\delta$  0,88 com o carbono C-6' em  $\delta$  31,6. Os dados espectrais da substância **2b** estão descritos na **Tabela 28**.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **1b** e **3b**, **4b** e **5b** foram observados deslocamentos químicos similares aos observados para **2b**, (**Figuras 49-52**, **Anexo 2**) e (**Figuras 53-54 Anexo 2**). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **1b**, **3b**, **4b** e **5b** estão listados nas **Tabelas 29-32** no **Anexo 2**.

**Tabela 28:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(octanoil)-homoserina lactona **2b**

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, <i>J</i> Hz)
2	176,6	-
3	49,1	4,57 (dd,9,3; 10,8)
4	30,5	2,14 (m) 2,83 (m)
5	66,1	4,29 (ddd, 9,0; 1,8) 4,47 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	173,8	-
2'	36,1	2,24 (t )
3'	25,4	1,64 (m)
4'	28,9	1,29 (m)
5'	29,1	1,29 (m)
6'	31,6	1,29 (m)
7'	22,7	1,29 (m)
8'	14,0	0,88 (t, )

Figura 45: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **2b**

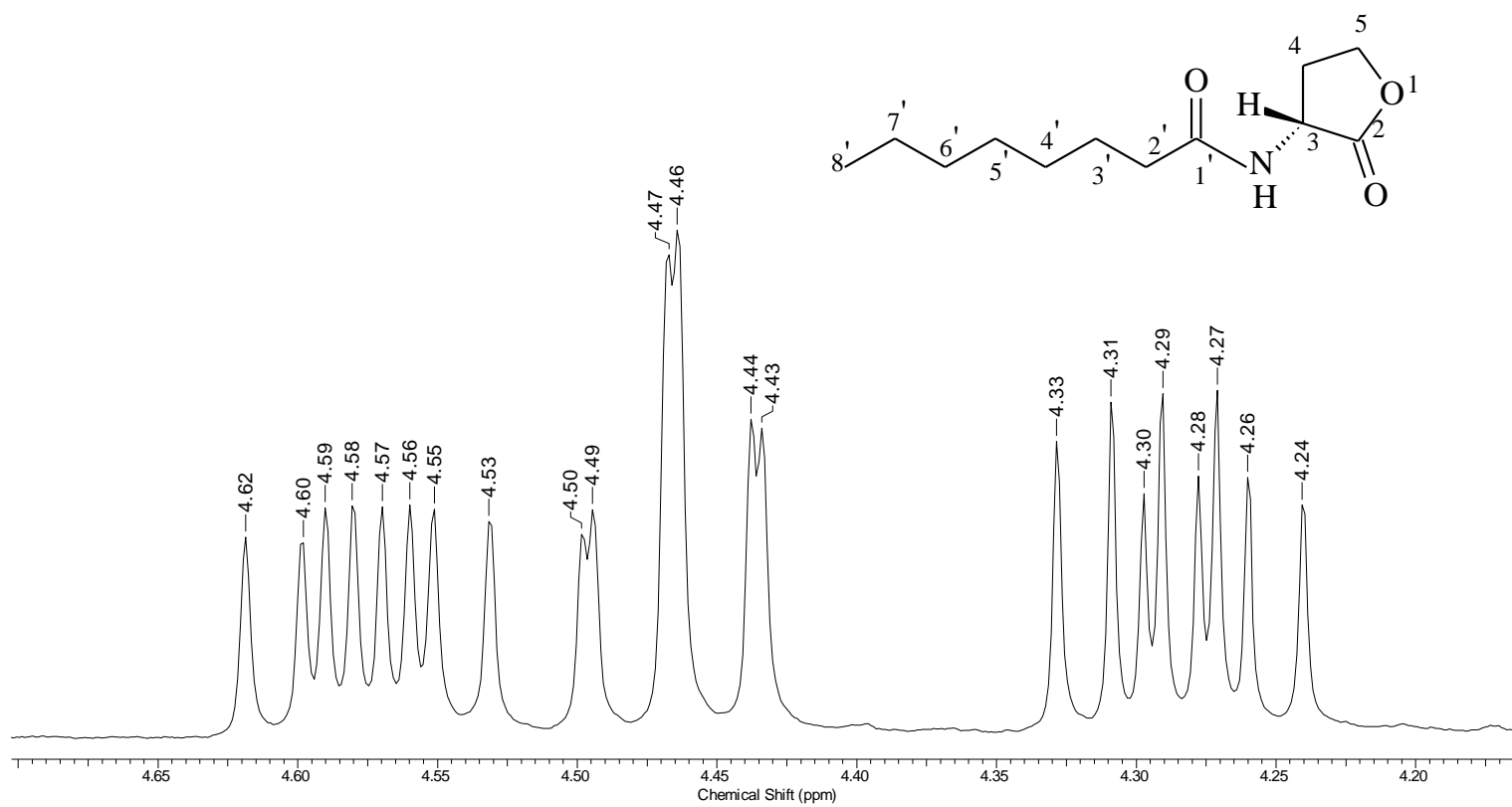
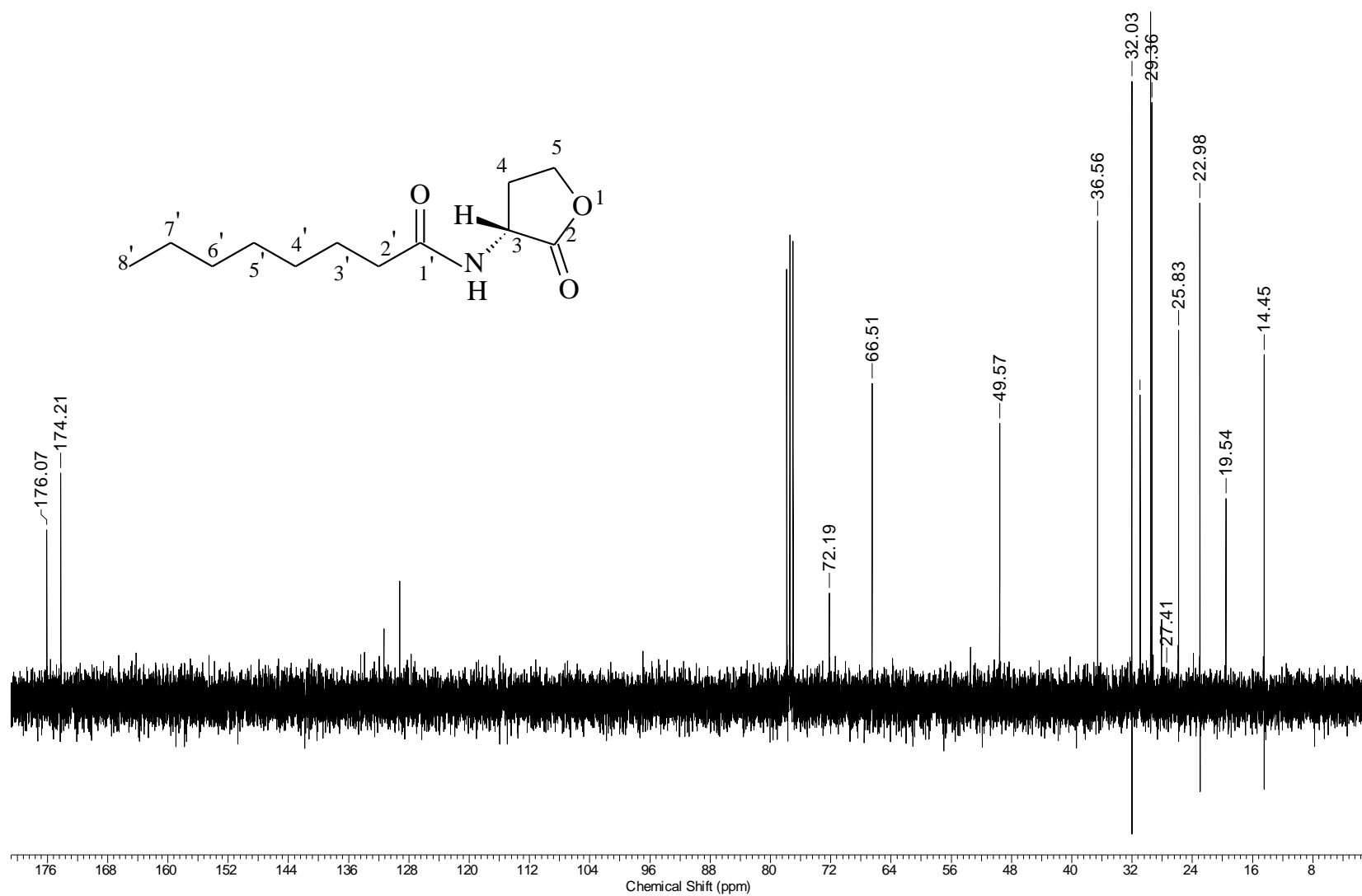
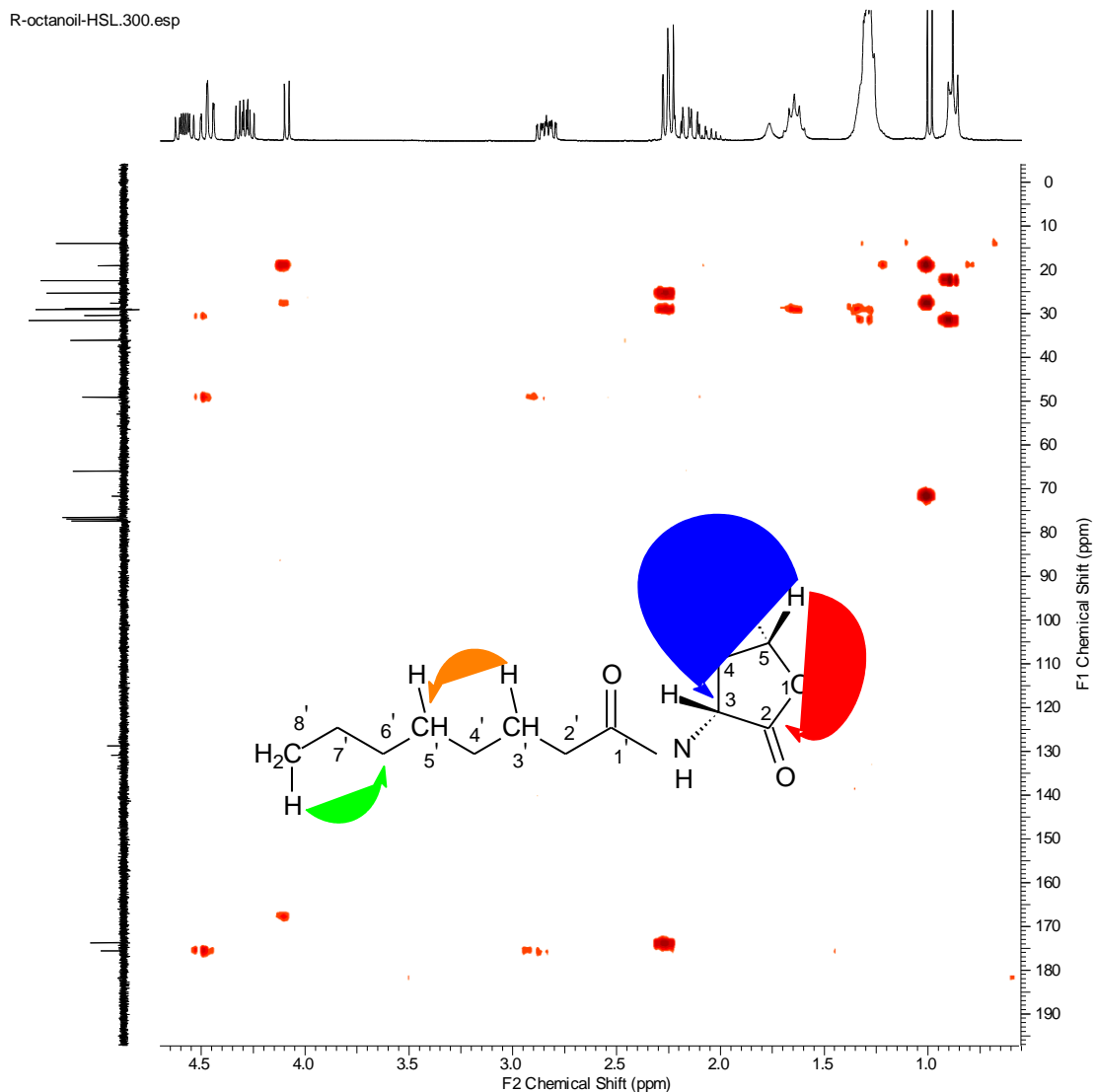
**Figura 46:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **2b**

Figura 47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **2b**

**Figura 48:** Mapa de correlações heteronucleares HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) de **2b**

### 5.3 Determinação da rotação óptica específica das acil-homosserina lactonas sintetizadas

A determinação da rotação óptica da luz plano polarizada foi estabelecida para as substâncias (**1a-5a**) e para as substâncias (**1b-5b**). Os valores com seus respectivos sinais (+) ou (-) de rotação específica ( $\alpha_{20}^D$ ) foram calculados através da Equação 1, e estão condizentes com a estereoquímica dos reagentes bromidrato de (*R*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona ou bromidrato de (*S*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona utilizados na síntese das



substâncias, evidenciando a ausência de racemização nas condições testadas. Os dados de  $\alpha_{20}^D$  encontram-se na **Tabela 33**.

**Tabela 33:** Rotação ótica específica ( $\alpha_{20}^D$ ) das acil-homosserina lactonas sintetizadas.

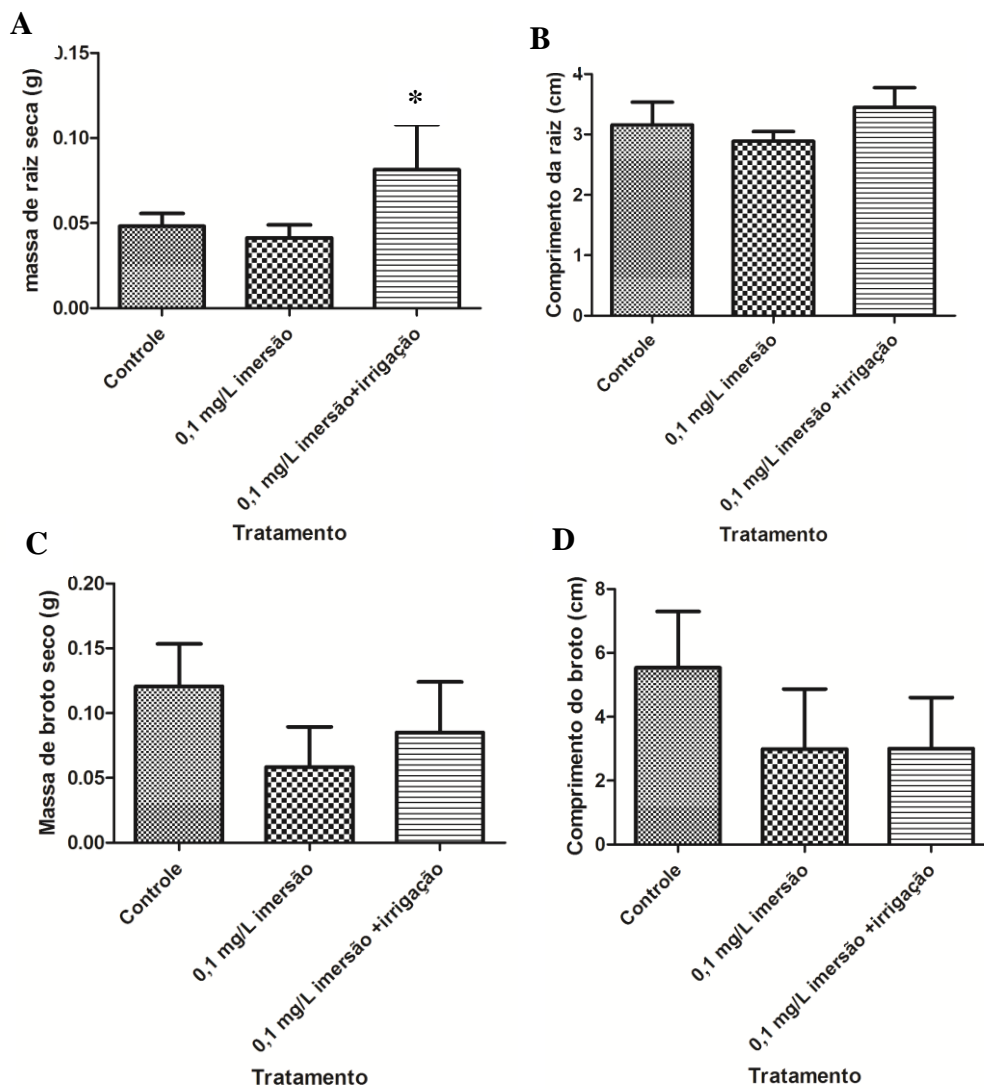
Substância	$\alpha_{20}^D$
( <i>S</i> )- <i>N</i> -(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona ( <b>1a</b> )	-10,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona ( <b>2a</b> )	+14,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(3-oxo-decanoil)- homosserina lactona ( <b>3a</b> )	+7,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(3-oxo-dodecanoil)- homosserina lactona ( <b>4a</b> )	+10,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(3-oxo-tetradecanoil)- homosserina lactona ( <b>5a</b> )	+10,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(hexanoil)-homosserina lactona ( <b>1b</b> )	+3,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(octanoil)-homosserina lactona ( <b>2b</b> )	+17,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(decanoil)-homosserina lactona ( <b>3b</b> )	+9,0
( <i>R</i> )- <i>N</i> -(dodecanoil)-homosserina lactona ( <b>4b</b> )	+3,0
( <i>S</i> )- <i>N</i> -(decanoil)-homosserina lactona ( <b>5b</b> )	-22,0

#### 5.4 Bioensaio de atividade de promoção do crescimento em cana-de-açúcar

Neste trabalho, foi necessário desenvolver um bioensaio capaz de mostrar os efeitos das acil-HSLs sintéticas em gemas de cana-de-açúcar. Experimentos de brotamento foram realizados a partir de secções do caule de duas variedades de cana. A variedade RB96-6928 é utilizada comercialmente em grandes plantações de cana devido a sua precocidade e alto teor de sacarose, enquanto que a variedade SP80-3280, uma cultivar tardia, é amplamente utilizada em ensaios experimentais por ser a variedade no Brasil com genoma totalmente sequenciado (Setta *et al.*, 2014). Em ambas variedades, foram avaliados os efeitos das Acil-HSLs, tanto para massa seca e comprimento de raízes e partes aéreas.

Experimentos iniciais foram realizados com o objetivo de estabelecer a melhor metodologia para os ensaios de avaliação da atividade promotora de crescimento de acil-HSLs em cana-de-açúcar. Os primeiros experimentos consistiram em variar as formas de tratamento dos toletes de cana-de-açúcar, utilizando-se apenas imersão inicial em solução do princípio ativo ou então imersão mais quatro irrigações com solução do princípio ativo durante o período de incubação. Neste teste utilizou-se solução aquosa de (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona na concentração de 0,1 mg/L e cana-de-açúcar da variedade SP80-3280. Ao término do período de oito dias de incubação avaliou-se o comprimento e a massa total de raízes secas por tolete, o comprimento e a massa seca de cada broto. Os resultados observados neste experimento estão representados na **Figura 55**.

**Figura 55:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando imersão e irrigações com a substância (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona na concentração de 0,1 mg/L, variedade SP80-3280. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm). \*Valores significativos em nível de  $P \leq 0,05$  quando comparado com o controle.



Os gráficos constantes na **Figura 55** mostram os efeitos dos tratamentos de imersão inicial dos toletes de cana-de-açúcar na solução contendo a substância **2a** (concentração de 0,1 mg/L) e de imersão seguida de irrigações durante o período de incubação. No gráfico **A** foi observado um aumento significativo de massa de raiz seca de 69 % para o tratamento de imersão seguida de irrigações, enquanto que para o tratamento de imersão foi observado uma diminuição de massa de raiz seca de 14,3 %. Para o comprimento das raízes (gráfico **B**) foi observado um pequeno estímulo no crescimento de 9,2 % para

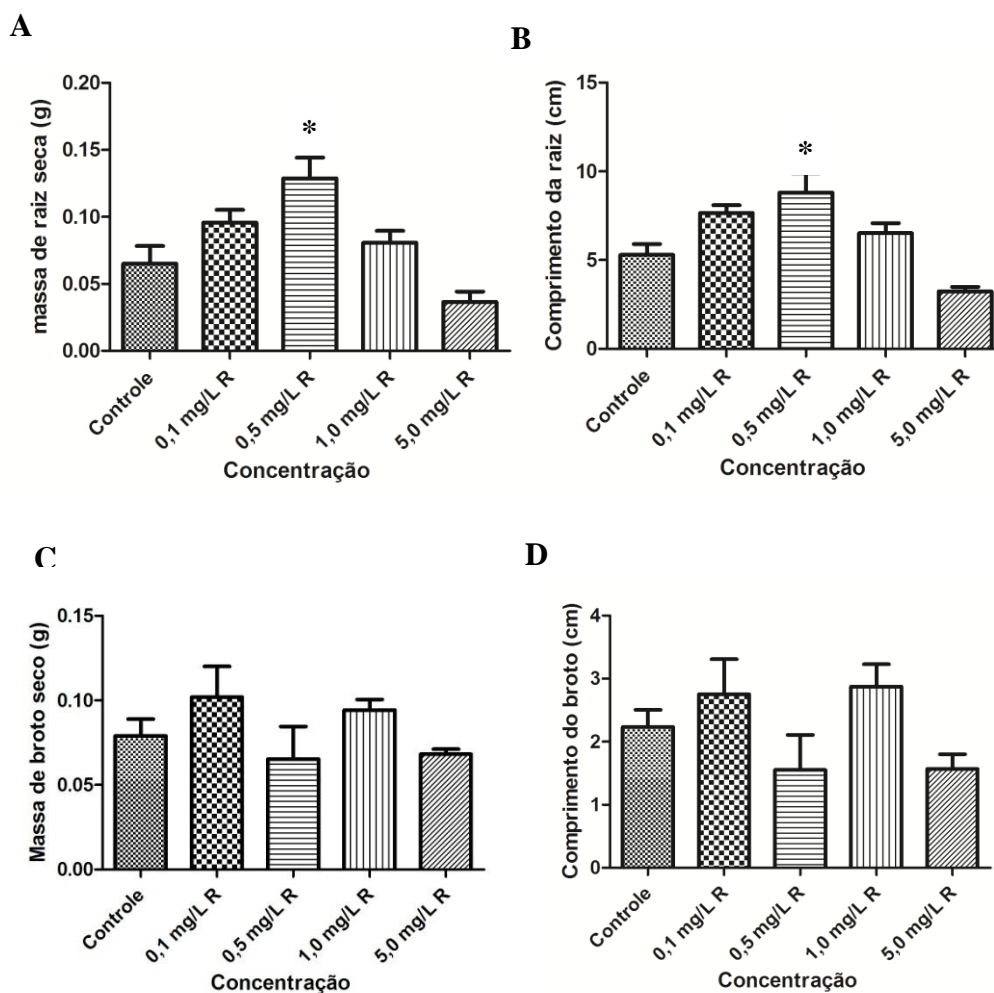
os colmos submetidos a imersão inicial e irrigações com a solução contendo a substância **2a** em relação ao controle, enquanto que a imersão inicial dos colmos provocou uma inibição no crescimento das raízes de 8,6 % em relação ao controle. Os gráficos **C** e **D** mostram que o crescimento dos brotos foi inibido em relação ao controle nos dois tratamentos avaliados. O aumento de massa de raiz seca no tratamento de imersão seguida de irrigações com a solução contendo a substância **2a** está relacionado ao crescimento de raízes secundárias, como mostra a **Figura 56**. Esse aumento de raízes secundárias é interessante para o desenvolvimento da planta, pois possibilita maior absorção de nutrientes e água do solo, além de promover maior fixação. Assim diante dos resultados obtidos a melhor forma de tratamento para o bioensaio de avaliação de promoção em cana-de-açúcar foi a imersão inicial dos colmos na solução contendo a acil-homosserina lactona, seguida de irrigações com a mesma solução.

**Figura 56:** Representações fotográficas de toletes de cana-de-açúcar (variedade SP803280) representativos para o controle (**A**), imersão com na solução de (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil) homosserina lactona (**2a**) (0,1 mg/L) e (**B**) imersão seguida de irrigações com a solução da substância **2a** (**C**).



Diante dos excelentes resultados obtidos nos ensaios de determinação de melhor metodologia, decidimos avaliar a melhor concentração de aplicação da substância **2a** para o estímulo do crescimento. Neste ensaio, as secções de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram tratadas com solução da substância **2a** nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L. A **Figura 57** mostra que, em concentrações baixas (0,1 e 0,5 mg /L) a substância **2a** foi capaz de estimular o crescimento da raiz em ambas concentrações, como visto para massa de raiz seca (47,2% e 97,6%, respectivamente) e comprimento e raiz (44,6% e 66,5 %, respectivamente). No entanto, concentrações mais elevadas, a substância **2a** (5,0 mg/L) suprimiu o desenvolvimento da planta, com uma redução na massa de raiz seca (-43,6%) e de comprimento (-38,9%) em comparação ao controle, gráficos **A** e **B**.

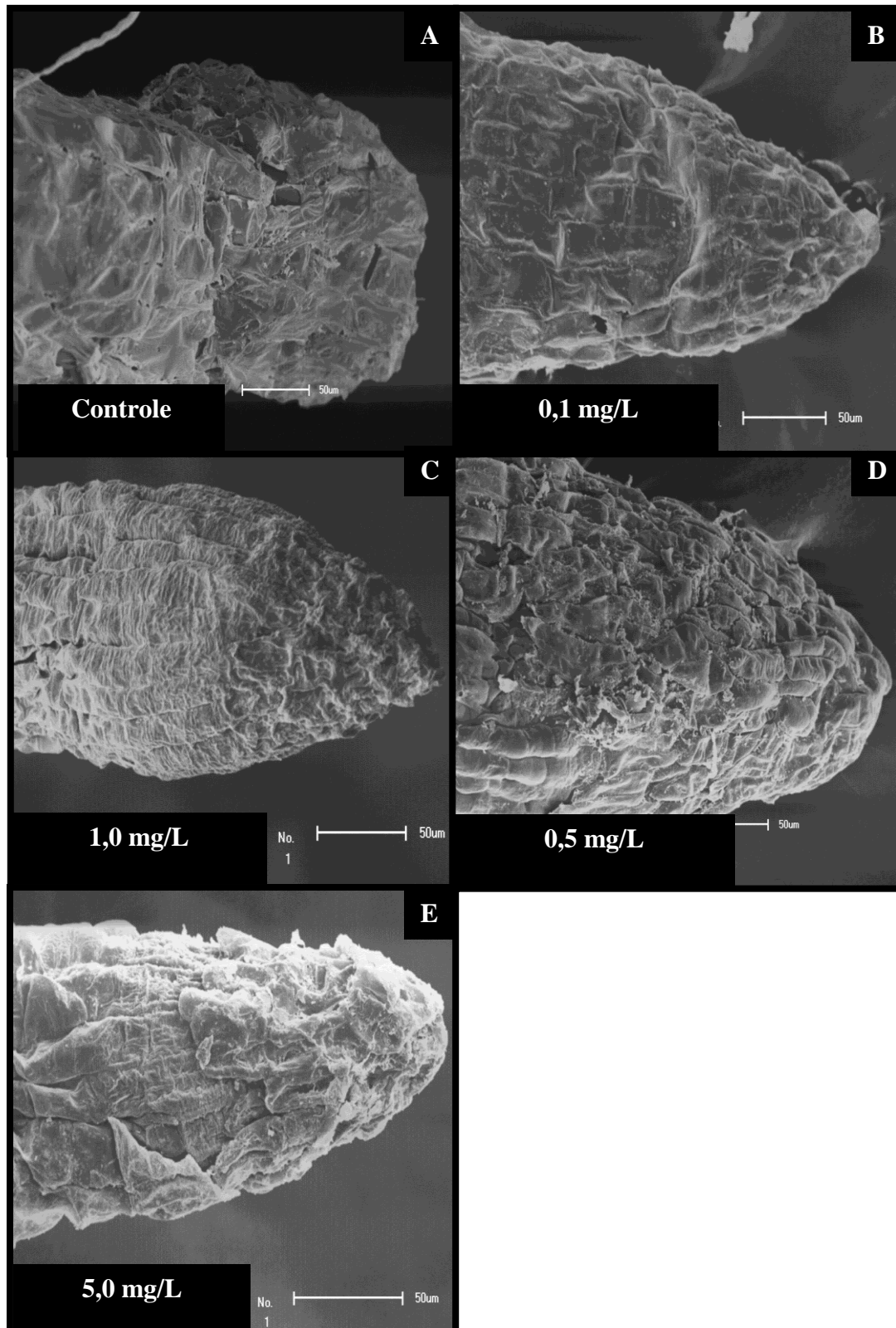
**Figura 57:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando a substância (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L, variedade SP80-3280. **(A)** massa de raiz seca (g), **(B)** comprimento da raiz (cm), **(C)** massa de broto seco (g) e **(D)** comprimento de broto (cm). \*Valores significativos em nível de  $P \leq 0,05$  quando comparado com o controle.



Para as partes aéreas foi observado uma diminuição de massa de broto seco e comprimento de broto de -17,5% e -30,6 % para a concentração de 0,5 mg/L e -13,8% e -29,8% para a concentração de 5,0 mg/L da substância **2a** (**Figura 57, gráficos C e D**). A pequena inibição no crescimento dos brotos quando a concentração de 0,5 mg/L foi avaliada pode estar correlacionada com a ação biológica das auxinas, onde a concentração efetiva para o desenvolvimento de raízes geralmente inibe o desenvolvimento dos meristemas primários (Castro-Ortiz *et al.*, 2008). As auxinas são hormônios vegetais responsáveis pelo crescimento, principalmente de meristemas primários. A literatura tem relatado um aumento nos níveis de auxinas em plantas tratadas com acil-homosserinas lactonas (Palmer *et al.*, 2014).

Secções de raízes tratadas com a substância **2a** nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L foram fixadas, secas ao ponto crítico, metalizadas e analisadas em microscópio eletrônico de varredura com o objetivo de analisar a morfologia dos tecidos, bem como a toxicidade das concentrações utilizadas no ensaio de avaliação de promoção de crescimento em cana-de-açúcar. A amostra controle branco revelou a presença de células com morfologia em aspecto quadrático (**Figura 58, A**), ao passo que a administração da homosserina **2a**, mesmo em pequenas concentrações (0,1 mg/L) foi suficiente para causar um alongamento das mesmas (**Figura 58, B**). Os tecidos permaneceram íntegros nas menores concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/L) (**Figuras 58, B, C e D**) e bastante danificados na concentração de 5,0 mg/L (**Figura 58, E**). Desta forma, determinou-se que a concentração ótima de utilização de homosserina varia entre 0,1 e 1,0 mg/L

**Figura 58:** Microscopia eletrônica de varredura para radículas não expostas a substância **2a** (Controle) (A); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,1 mg/L (B); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,5 mg/L (C); tratadas com a substância **2a** na concentração de 1,0 mg/L (D); tratadas com a substância **2a** na concentração de 5,0 mg/L (E); 50  $\mu$ m; Variedade SP80-3280.

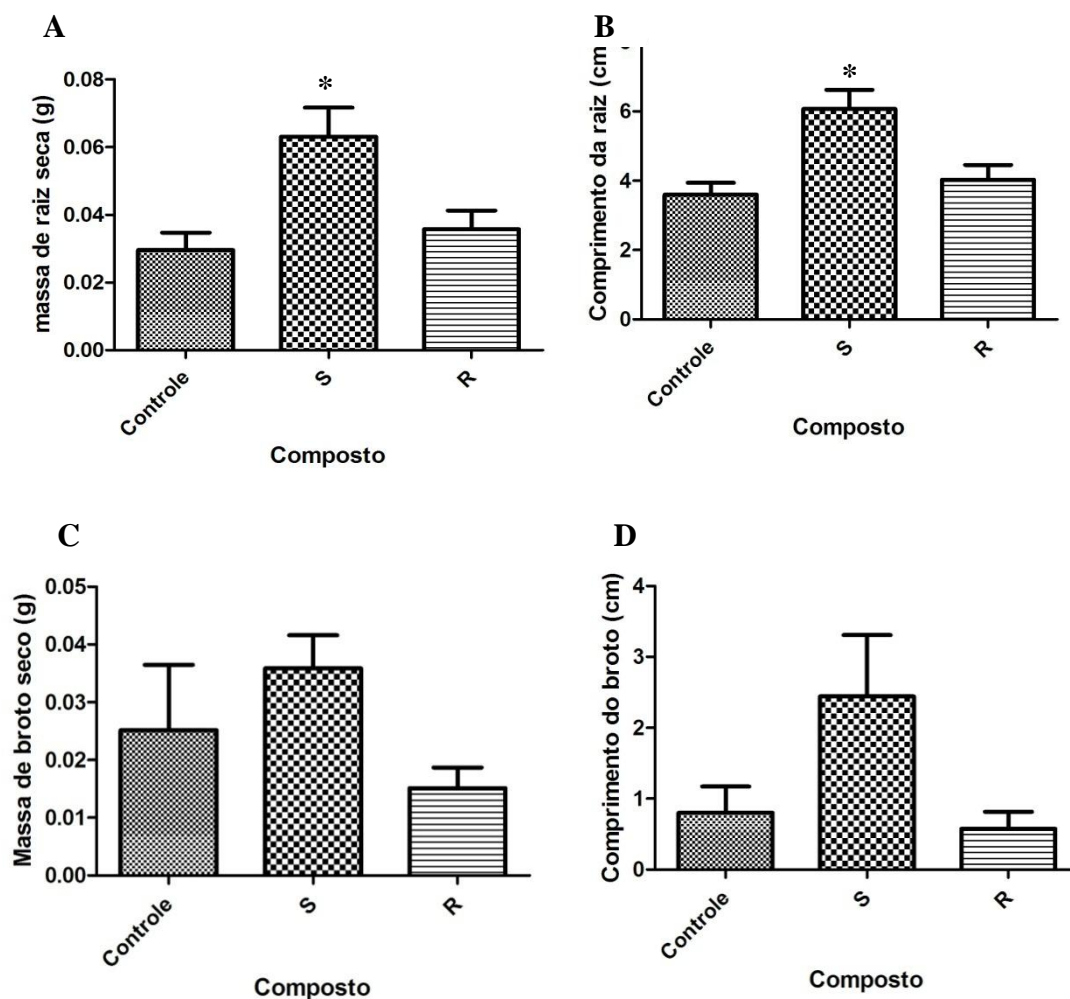


Os resultados obtidos nos bioensaios de promoção de crescimento para a determinação da concentração ativa e não tóxica aos tecidos de cana-de-açúcar, indicaram que a concentração de 0,5 mg/L tem maior potencial de estímulo do crescimento e menor toxicidade. Assim decidiu-se avaliar a importância da configuração absoluta da substância ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil) homosserina lactona para a atividade de promoção do crescimento. Para este ensaio foram utilizados colmos de cana-de-açúcar da variedade RB96-6928, amplamente utilizada comercialmente, e as substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil) homosserina lactona (**2a**) e seu enantiômero (*S*) (**1a**).

No experimento realizado com variedade RB96-6928, verificou-se que ambos os enantiômeros *R* e *S* (0,5 mg /L) são capazes de provocar um aumento de massa de raiz seca (113,2% para *S* e 20,8% para *R*) e comprimento total de raízes (68,6 % de *S* e de 11,9% para *R*), sendo o enantiômero *S* substancialmente mais ativo. A resposta biológica observada em brotos foi distinta; enquanto o enantiômero *S* continuaram a estimular o comprimento (20,5%) e a massa de raiz seca (42,5%) dos brotos, o enantiômero *R* inibiu inibição no crescimento dos brotos em relação ao controle, tanto em termos de massa seca (-39,9%) e de comprimento (-28,1 %), como pode ser observado na **Figura 59**.



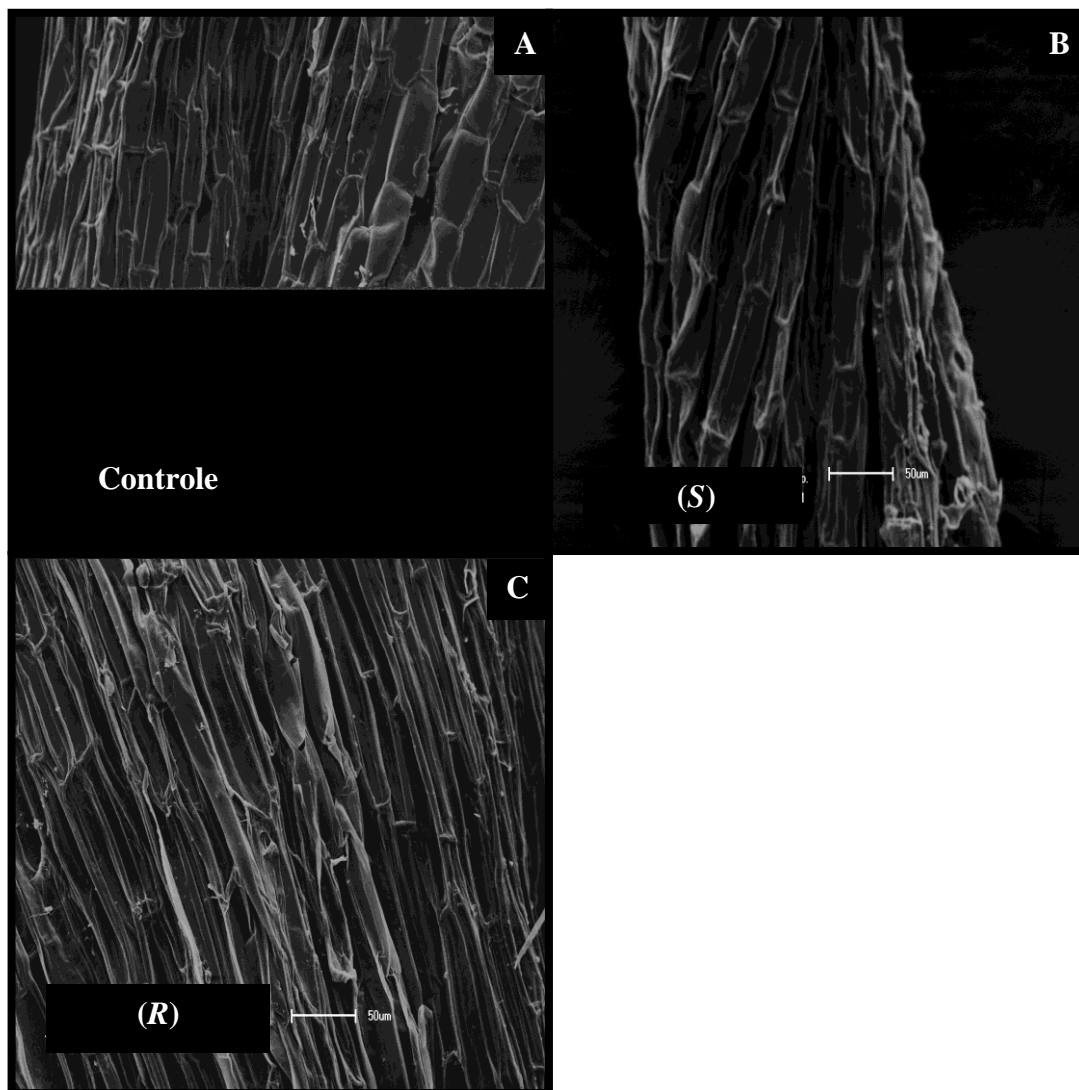
**Figura 59:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona (**2a**) e o enantiômero (*S*) (**1a**) na concentração de 0,5 mg/L, variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm). \*Valores significativos em nível de  $P \leq 0,05$  quando comparado com o controle.



As raízes não expostas às substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona (**2a**) e o enantiômero (*S*) (**1a**) (controle) bem como as tratadas com as referidas substâncias foram submetidas a análise em microscópio eletrônico de varredura. As imagens obtidas na análise mostraram um alongamento celular para ambos os enantiômeros testados em relação ao controle (**Figura 60**), demonstrando que o enantiômero *R* apesar

de apresentar pouco estímulo do crescimento em toletes de cana-de-açúcar também foi capaz de causar alterações morfológicas de alongamento das raízes.

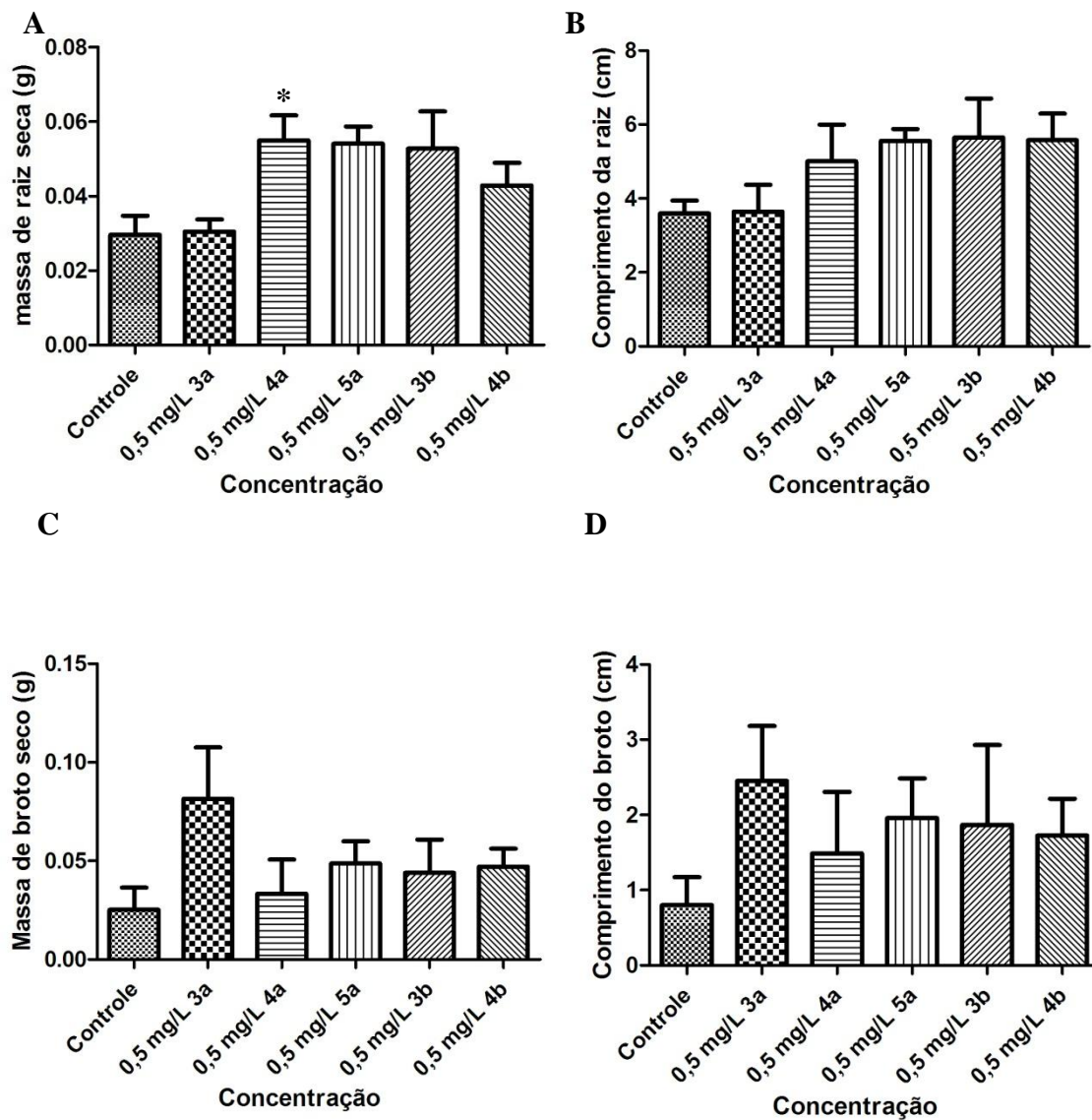
**Figura 60:** Microscopia eletrônica de varredura para radículas não expostas as substâncias **1a** e **2a** (Controle) (**A**); tratadas com a substância **1a** na concentração de 0,5 mg/L (**B**); tratadas com a substância **2a** na concentração de 0,5 mg/L (**C**); 50  $\mu\text{m}$ ; Variedade RB96-6928.



As substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homoserina lactona (**3a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona (**4a**) e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homoserina lactona (**5a**), bem como os derivados não oxidados na posição 3' (*R*)-*N*-(decanoil)-homoserina lactona (**3b**), (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homoserina lactona (**4b**) também foram avaliadas nos bioensaios de promoção de crescimento em cana-de-açúcar utilizando a

variedade RB96-6928, **Figura 61**. Os cálculos de porcentagem de aumento de massa média de raiz seca e massa seca média de broto, bem como, comprimento de raiz e broto encontram-se na **Tabela 34**.

**Figura 61:** Valores absolutos e inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homosserina lactona (**3a**), (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homosserina lactona (**4a**) e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona (**5a**), (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**3b**) e (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona (**4b**) na concentração de 0,5 mg/L, variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm). \*Valores significativos em nível de  $P \leq 0,05$  quando comparado com o controle.

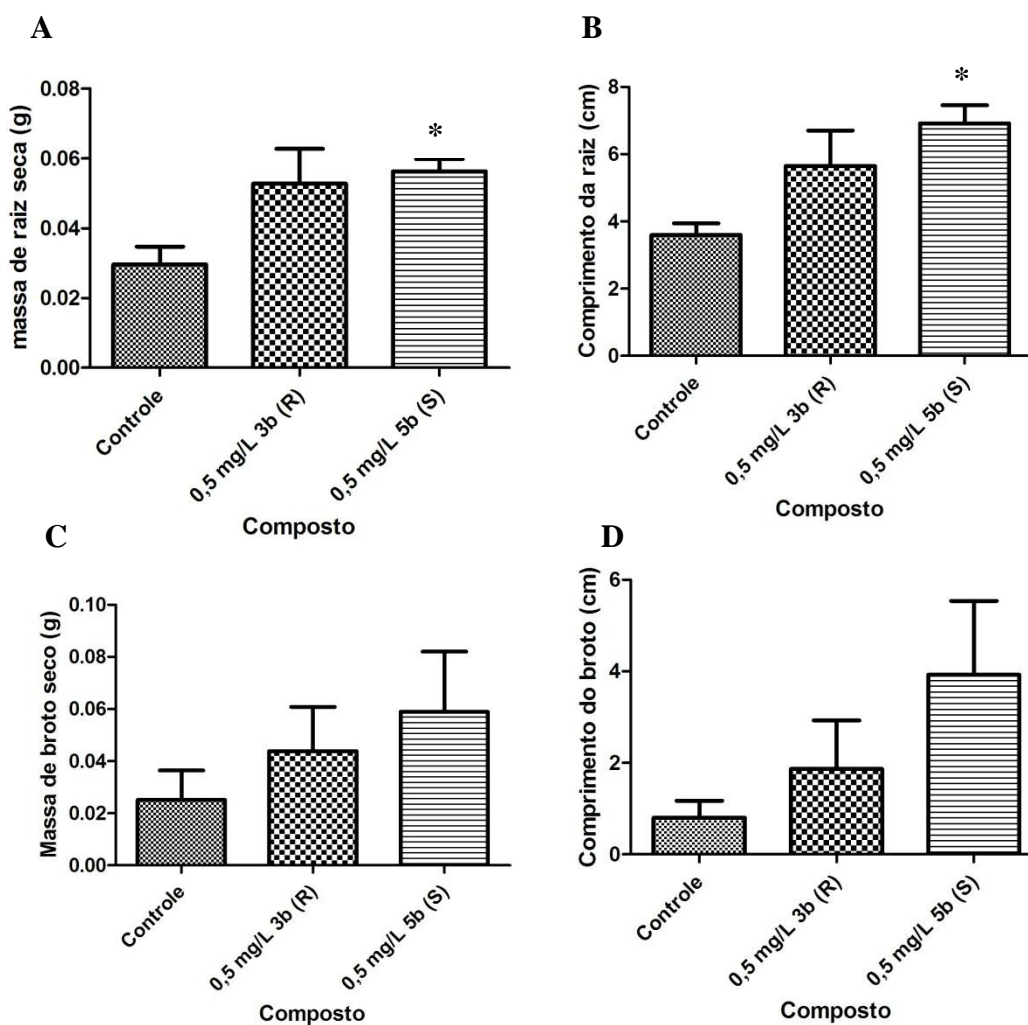


**Tabela 34:** Porcentagens de aumento ou inibição de crescimento de raiz e brotos na administração das substâncias **3a**, **4a**, **5a**, **3b**, **4b** na concentração de 0,5 mg/L.

Parâmetros	3a	4a	5a	3b	4b
Comprimento médio de raiz	-0,8 %	38,9 %	54,1 %	56,9 %	54,7 %
Massa seca média de raiz	3,0 %	97,8 %	83,1 %	78,4 %	45,0 %
Comprimento médio de brotos	206,2 %	85,0 %	181,2 %	132,5 %	115,0 %
Massa seca média de brotos	223,6 %	32,0 %	93,6 %	74,5 %	86,8 %

As substâncias testadas nesta variedade aumentaram o comprimento médio e a massa de raiz seca, especialmente a substância **4a**, a qual estimulou o crescimento das raízes em 97,8% comparado ao controle. Com relação ao comprimento médio e a massa seca de broto, todas as substâncias estimularam a brotação das gemas, especialmente as substâncias **3a** e **5a**. No entanto, a substância **3a** apresentou fraco estímulo de crescimento das raízes em relação ao controle. Destaca-se ainda a substância **5a**, a qual promoveu significativamente o crescimento de raízes e também de brotos. A substância ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona (**5a**) é naturalmente produzida pela bactéria fixadora de nitrogênio *Sinorhizobium meliloti*, presente em espécies de leguminosas. Recentemente esta substância foi avaliada quanto ao seu potencial de estímulo de crescimento em *A. thaliana* apresentando significativos resultados (Wagner *et al.*, 2006). Os derivados não oxidados na posição 3' **3b** e **4b** também foram significativamente ativos, os quais promoveram o crescimento de raízes e brotos em relação ao controle, no entanto destaca-se a substância **3b**, a qual demonstrou maior potencial de crescimento em colmos de cana-de-açúcar. Considerando a excelente atividade observada para a substância **3b**, decidiu-se investigar o potencial de promoção de crescimento do enantiômero (*S*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona **5b**, em comparação ao enantiômero (*R*). A **Figura 62** representa os valores absolutos de estímulo de crescimento de raízes e brotos observados.

**Figura 62:** Valores absolutos de inibição ou aumento de crescimento de raízes e brotos de toletes de cana-de-açúcar utilizando as substâncias (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserinalactona (**3b**) e o enantiômero (*S*) (**5b**) na concentração de 0,5 mg/L, variedade RB96-6928. (A) massa de raiz seca (g), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa de broto seco (g) e (D) comprimento de broto (cm). \*Valores significativos em nível de  $P \leq 0,05$  quando comparado com o controle.



As substâncias (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**3b**) e o enantiômero (*S*) (**5b**) demonstraram significativa promoção de crescimento de raízes e brotos em colmos de cana-de-açúcar em relação ao controle. No entanto destaca-se o enantiômero (*S*), o qual aumentou a massa seca média de raízes e o comprimento da raiz em 90,1 % e 92,1 %

respectivamente. Um aumento surpreendente de massa seca média de broto e comprimento dos brotos de 134,2% e 390,0 % quando os colmos de cana-de-açúcar foram tratados com a substância (*S*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona (**5b**). Assim, o enantiômero *S* demonstrou ser mais ativo em relação ao enantiômero *R* como foi observado para os enantiômeros (**1a**) e (**2a**) oxidados na posição 3'. Na literatura, estudos de determinação de configuração absoluta de acil-homosserinas lactonas naturais reportam uma configuração (*S*) predominante para essas substâncias (Pomini *et al.*, 2006; Baiton *et al.*, 1992). Adicionalmente, a literatura tem reportado que as formas naturais têm demonstrado maior eficiência na regulação da expressão gênica em relação aos enantiômeros (*R*) (Chhabra *et al.*, 1993).

Atualmente o mecanismo de quorum-sensing empregado pelas populações bacterianas, bem como, a atuação dos semioquímicos neste processo é bem esclarecido. No entanto, o efeito que estas substâncias podem causar aos organismos hospedeiros ainda não é bem estabelecido. Nos últimos anos evidências têm indicado que AHLs podem ser detectadas pelos hospedeiros, causando alterações importantes na sua fisiologia. Estes resultados mostram, portanto, a possibilidade de interação química entre reinos, como já foi observado, por exemplo, em certos casos de espécies vegetais (Hartmann *et al.*, 2014). O primeiro estudo sobre os efeitos de semioquímicos da classe as acil-homosserinas lactonas sobre hospedeiros foi publicado em 2002, por Joint e colaboradores, que demonstrou que zoosporos de algas são capazes de detectar AHLs na água do mar como um método de localização de biofilmes. Efeitos de resistência a microrganismos patogênicos têm sido observado em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) quando tratadas com (*S*)-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona, primeira espécie comercial investigada (Schuegger *et al.*, 2006). A colonização da superfície da raiz da espécie *S. lycopersicum* com *Serratia liquefaciens*, uma bactéria endofítica que produz C-4 e C-6 homosserinas lactonas, induziu a resistência sistêmica contra fungos da espécie *Alternaria alternata*. (Gantner *et al.*, 2006)

Além dos efeitos de resistência a organismos patogênicos, as AHLs são conhecidas na literatura por estimular o crescimento de raízes primárias e germinação da espécie *A. thaliana*, uma espécie daninha, sendo que um dos mecanismos de ação é o aumento na biossíntese de auxinas e citocininas (Rad *et al.*, 2008; Castro-Ortiz *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2014). Castro-Ortiz e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos de sete acil-homosserinas lactonas com diferentes comprimentos da cadeia lateral acila em *A. thaliana*. Neste estudo foi verificado que os efeitos de cada AHLs são dependentes da

estrutura e da concentração de cada substância. (C-4 e C-6) AHLs não apresentaram efeitos significativos de desenvolvimento de raízes em *A. thaliana*. Em contra partida, as AHLs de cadeia lateral média apresentaram melhor atividade, destacando a C10-AHL, que apresentou maior potencial de crescimento. Neste trabalho também foi verificado que altas concentrações da homoserina lactona mais ativa (C10-AHL) inibiu significativamente o crescimento das raízes secundárias em *A. thaliana*, como também foi observado neste trabalho.

Além disso, o fato de que os enantiômeros *R* e *S* apresentam diferentes níveis de atividade biológica, pode estar relacionado a diferenças de afinidade com as proteínas de receptor e enzimas relacionadas com o processo, principalmente a reação de hidrólise catalisada pela FAAH e a detecção dos produtos por proteínas reguladoras. Embora o mecanismo de ação esteja ligado a homoserina hidrolisada, é razoável assumir que no processo natural a cadeia de acila pode desempenhar um papel importante nos mecanismos de transporte destas moléculas. Os fenômenos de transporte que envolvem células vegetais e AHL é em grande parte desconhecido até agora.

O desenvolvimento de substâncias com capacidade para modular o crescimento de plantas, especialmente no início do desenvolvimento do meristema, pode constituir um meio importante para aperfeiçoar as culturas e aumentar a produtividade. Isso pode ser especialmente importante para modular o tempo de enraizamento e brotação, aumentando o grau de uniformidade das culturas, aumentar o número de raízes viáveis e brotos, reduzir a susceptibilidade de plantas ao ataque de agentes patogênicos. A este respeito, as auxinas e giberelinas são as substâncias mais estudadas e comercialmente empregadas na formulação de produtos usados no tratamento de cana-de-açúcar visando estimular meristemas. Recentemente também foi reportado que a substância ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona causou significativos incrementos no crescimento de espécies pertencente às gramíneas, como o milho (Dahmen *et al.*, 2013). Contudo, este é o primeiro relato sobre os efeitos de AHLs aplicadas a espécie *S. officinarum* (cana-de-açúcar).

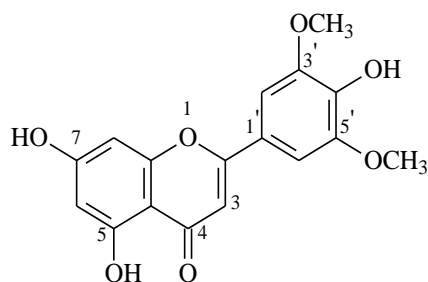
Assim, considerando os resultados promissores de aumento de crescimento que as AHL vêm apresentando em espécies da *A. thaliana* que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, as AHLs podem ser uma alternativa nesta área de pesquisa, que visa aumentar a produtividade de espécies comercialmente importantes preocupando-se com o meio ambiente e a integridade dos tecidos.

## 5.5 Determinação Estrutural dos Compostos Isolados

A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada com base nos dados espectrais de RMN uni e bidimensionais dos compostos e por comparação com os dados existentes na literatura. Os dados espectrais de RMN dos compostos isolados a partir do estudo químico das folhas e colmos de *Saccharum X officinarum*, serão discutidos por classe de metabólito secundário.

### 5.5.1 Compostos fenólicos

#### 5.5.1.1 Composto S4



**S4**

O composto **S4** (55,0 mg) foi isolado da fração acetato de etila como cristais agulhas de cor amarela solúveis em solução de  $\text{HCCl}_3$ :MeOH 1:1.

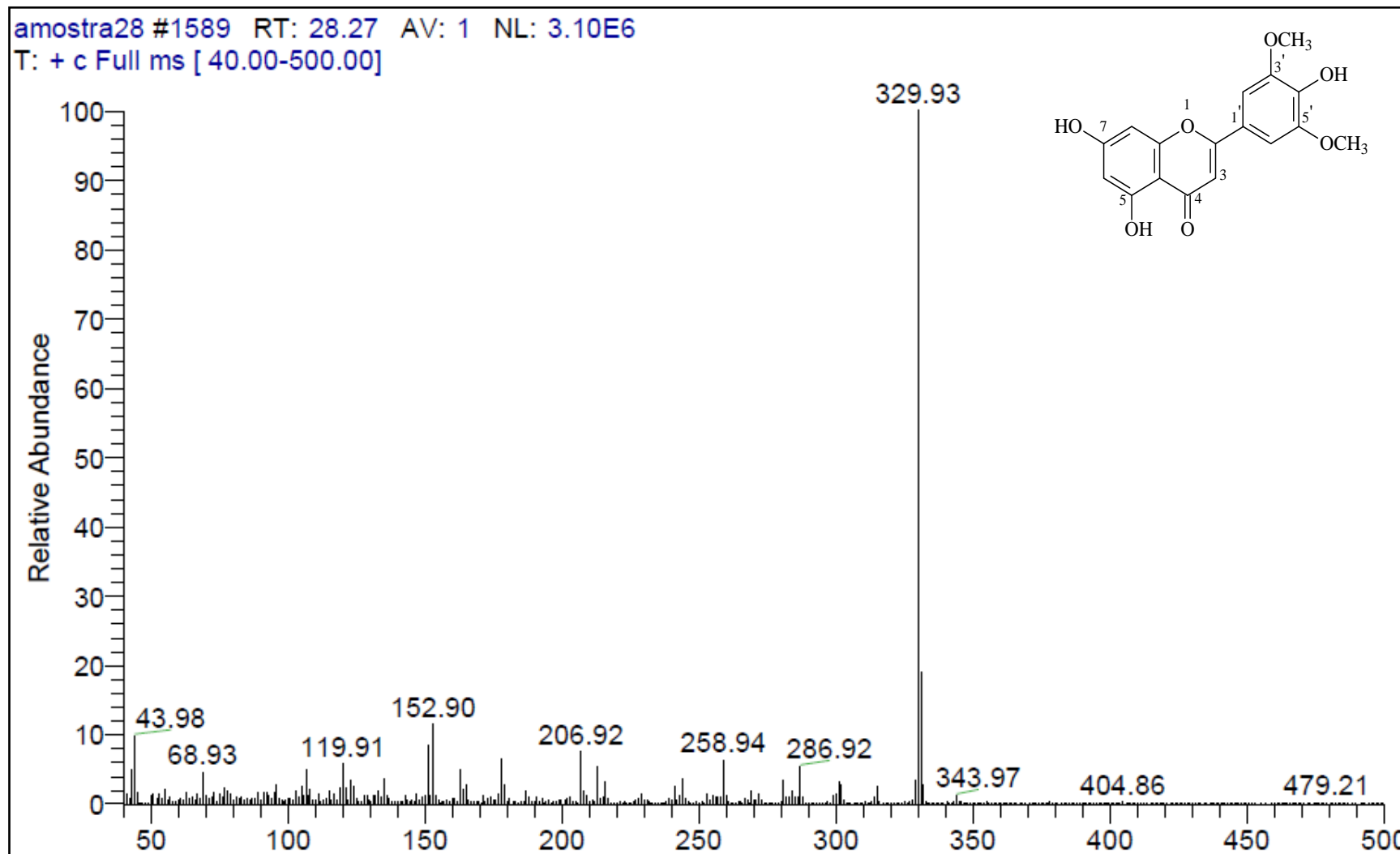
No espectro de massas de baixa resolução para **S4** (**Figura 63**) foi possível observar o íon molecular  $\text{M}^+$  em  $m/z$  329,9, sendo este o fragmento mais estável, e, portanto o pico base.

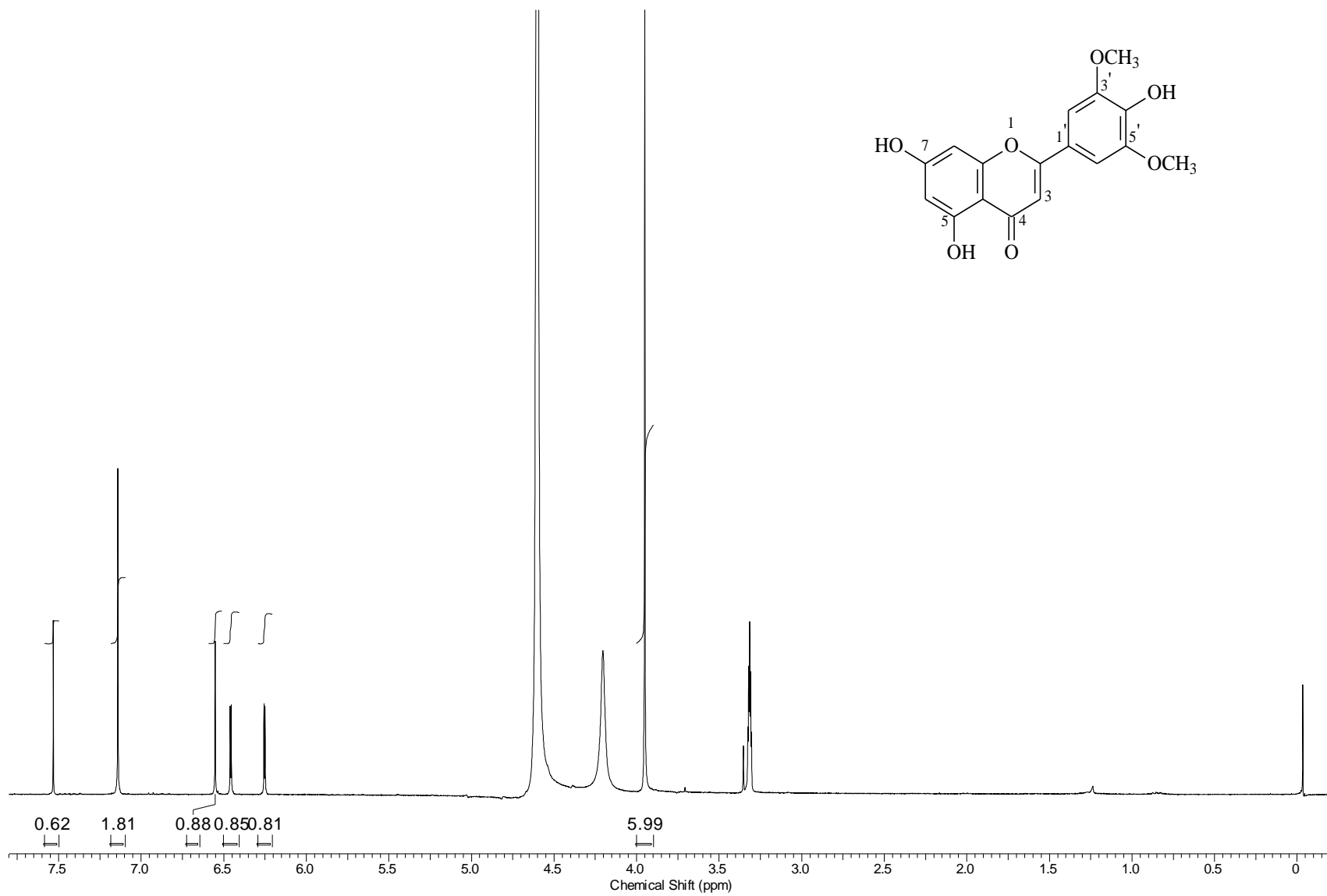
Os sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 64 e 65**) são característicos de substância pertencente à classe dos flavonoides, onde destacam-se o simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,19 referente aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B, e os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 ( $J= 2,1$  Hz) e 6,26 ( $J= 2,1$  Hz) correspondentes aos hidrogênios H-8 e H-6 do anel A, cuja a constante de acoplamento observada evidencia um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios. Ainda foi observado um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,55 atribuído ao H-3, indicando que a aglicona trata-se de uma flavona.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 66**) observam-se sinais na região de carbonos aromático em  $\delta_{\text{C}}$  158,5, 94,8, 164,8, 99,7, 162,0 e 104,3 atribuídos aos carbonos C-9, C-



8, C-7, C-6, C-5 e C-10 do anel A respectivamente. Destaca-se ainda o sinal em  $\delta_C$  183,0 típico de carbonila de sistema 1,4-pirona, além dos sinais na região de  $\delta_C$  122,0-165,1 atribuídos aos carbonos do anel B. Ainda foram observados sinais em  $\delta_C$  104,3 e 165,1 referentes aos carbonos C-3 e C-4 do anel C, confirmando a aglicona do tipo flavona.

**Figura 63:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **S4**

**Figura 64:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para **S4**

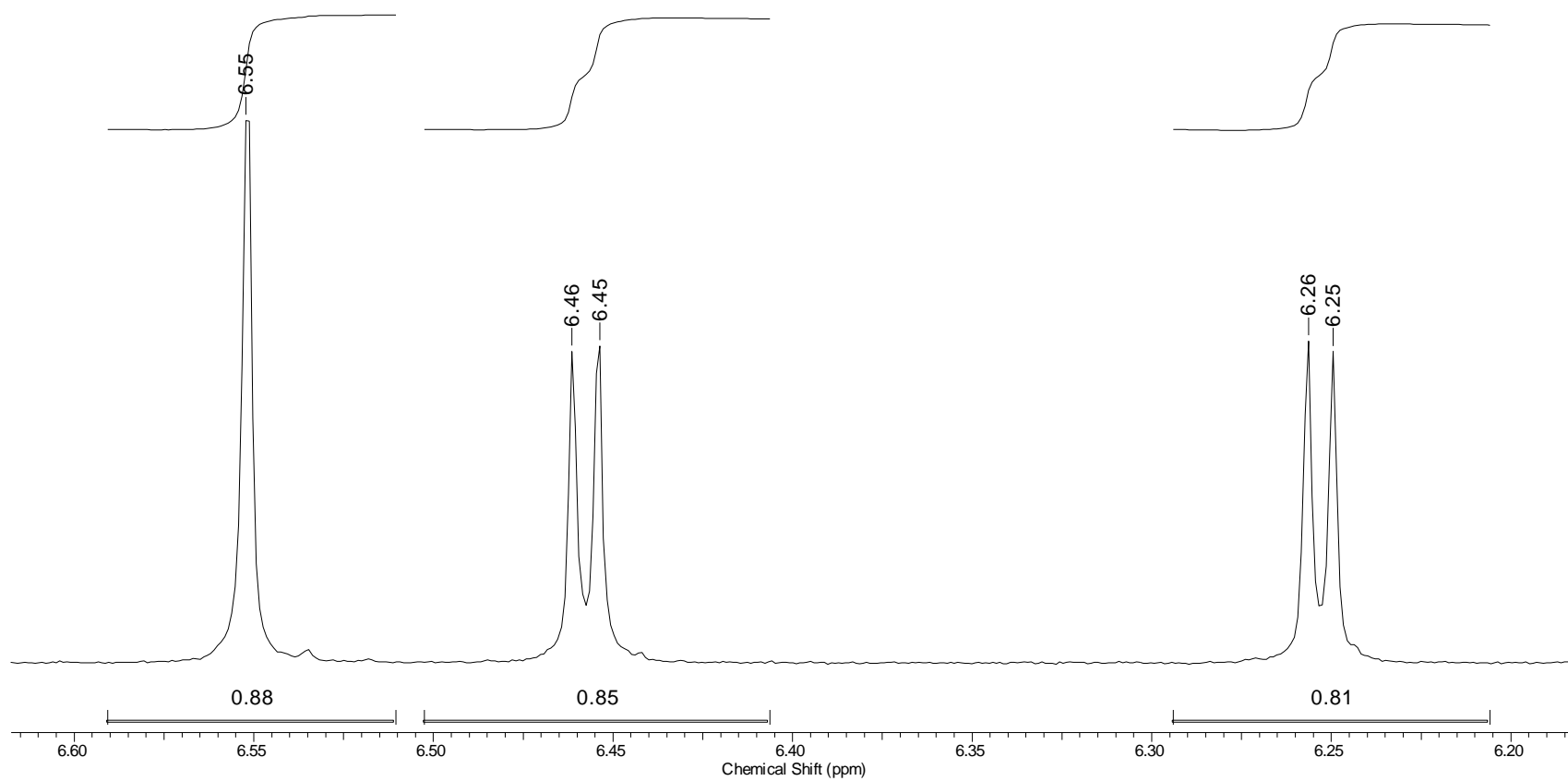
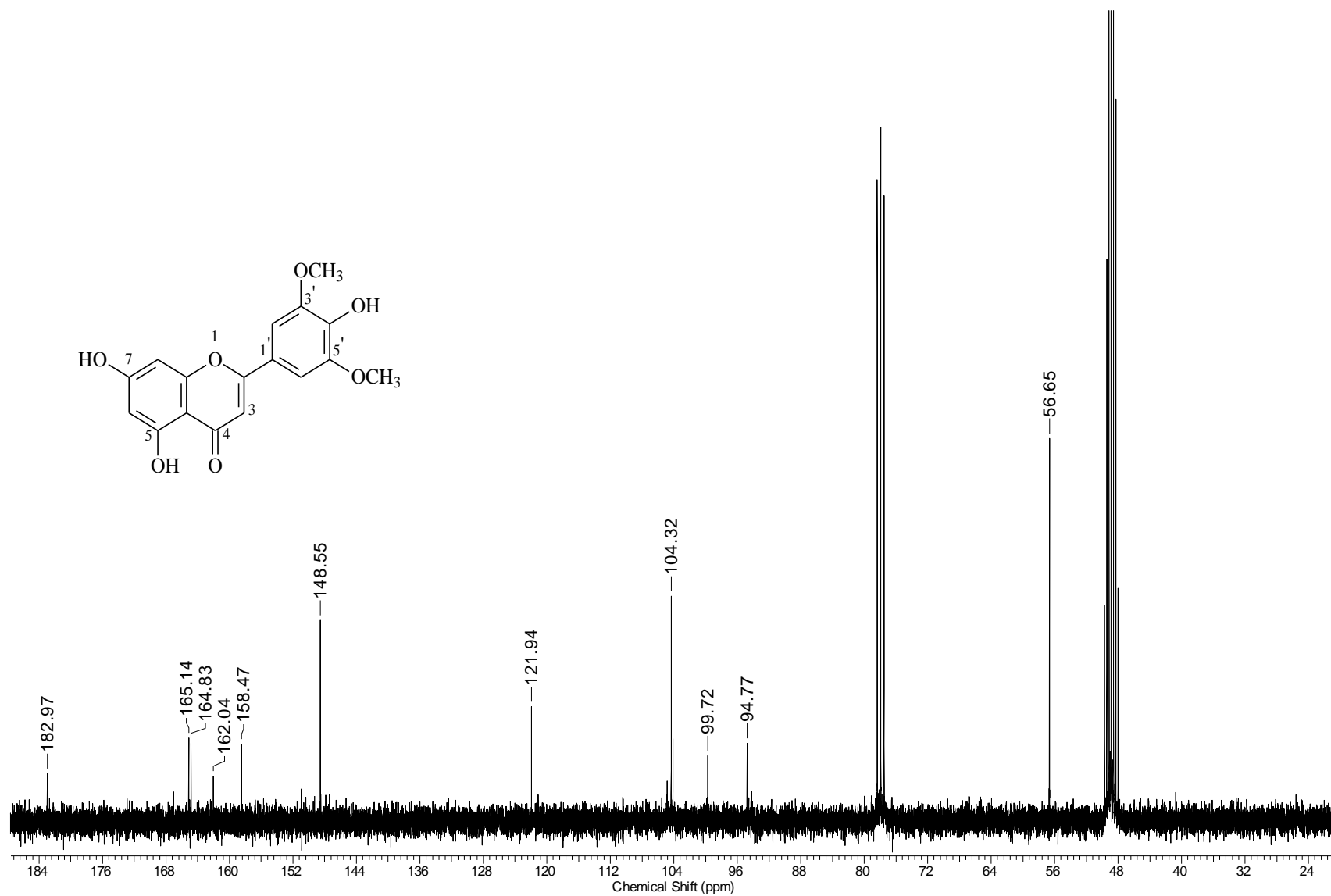
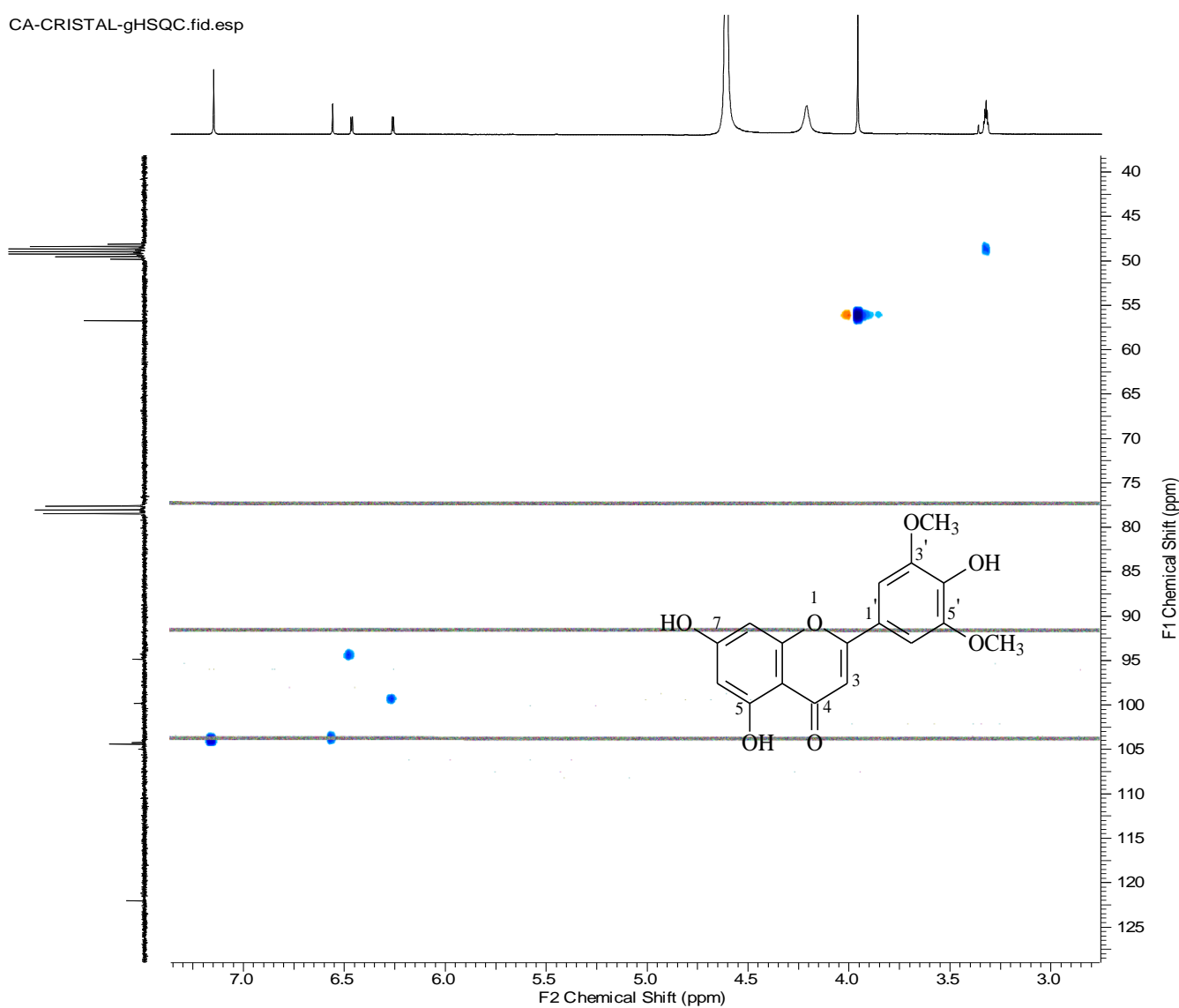
**Figura 65:** Expansão da região de  $\delta_H$  6,20 a 6,60 do espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$  e  $CD_3OD$ ; 300,06 MHz)

Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para S4

No mapa de contornos HSQC (**Figura 67**) foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que auxiliaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esse composto.

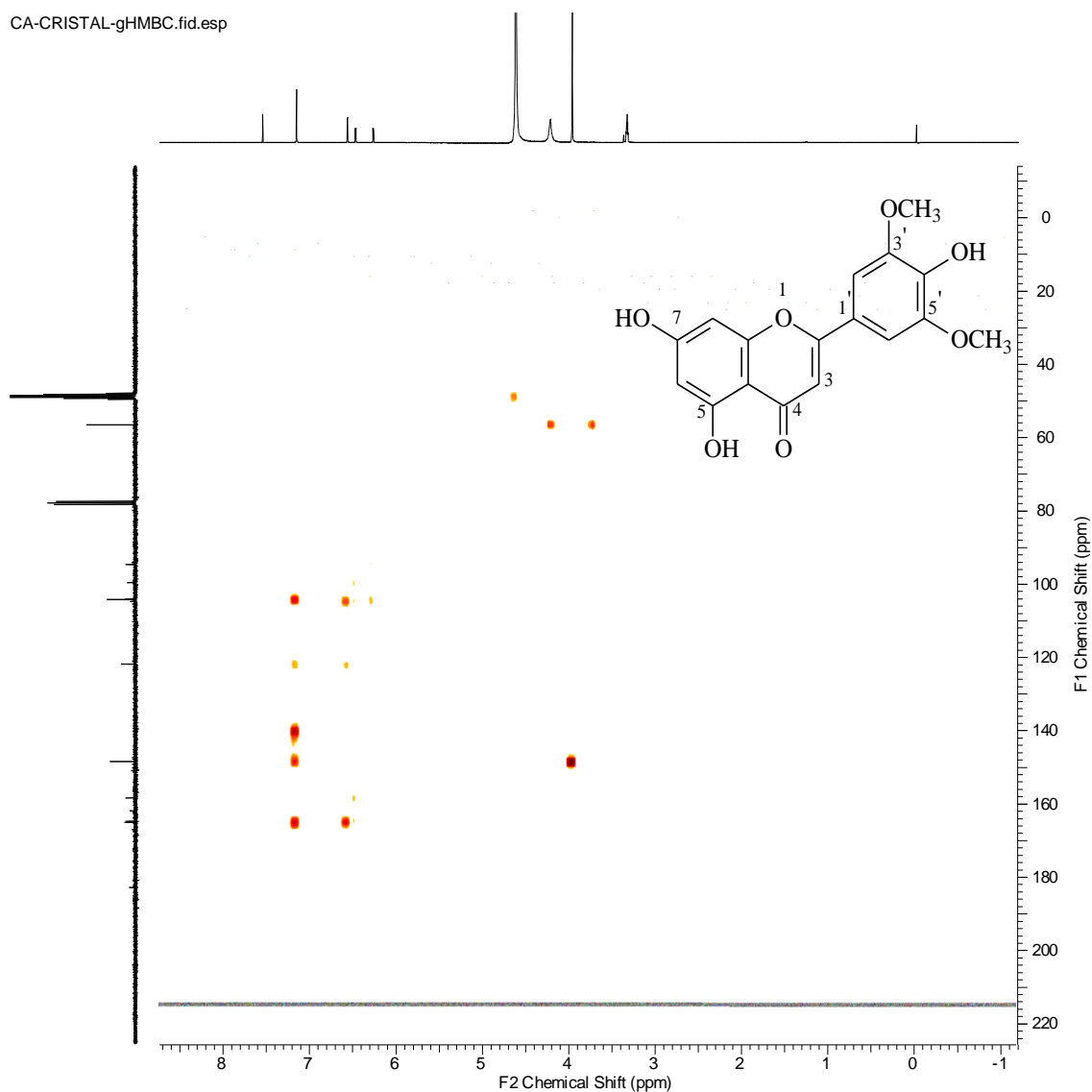
**Figura 67:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **S4**

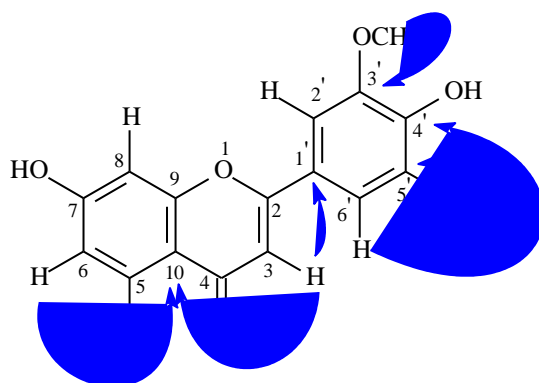


No mapa de contornos HMBC (**Figura 68**) destacam-se as correlações a longa distância ( $^3J$ ) entre os hidrogênios dos grupos metoxilas  $\text{OCH}_3$  em  $\delta_{\text{H}}$  3,95 com os

carbonos C-3' e C-5' em  $\delta_C$  148,5, confirmando a conexão dos grupos metoxilas com a aglicona. Destaca-se ainda as correlações dos hidrogênios H-2' e H-6' em  $\delta_H$  7,19 com o carbono C-4' em  $\delta_C$  140,2, e a correlação do hidrogênio H-3 em  $\delta_H$  6,55 com os carbonos C-2, C-1' e C-10 em  $\delta_C$  165,1, 121,9 e 104,3, respectivamente. Para o anel A, observa-se a correlação do hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  6,26 com o carbono C-10 em  $\delta_C$  104,3. As principais correlações heteronucleares observadas no mapa de contornos HMBC estão representadas na **Figura 69**.

**Figura 68:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para S4



**Figura 69:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S4**

Esses dados foram comparados com os dados constantes na literatura (Chung *et al.*, 2005) e foram concordantes para o *tricin*, isolado anteriormente da espécie *Saccharum officinarum* L. por Colombo e colaboradores (2006) **Tabela 35**. A presença deste flavonoide em *Oriza sativa*, uma gramínea, foi reportada por Mohanlal e colaboradores (2011).

**Tabela 35:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para *tricin* e para o composto **S4**

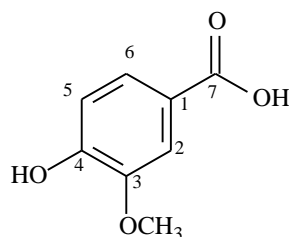
	Substância S4		Tricina*	
C	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		165,1		<b>164,2</b>
3	6,55 (s)	104,3	6,54 (s)	103,9
4		183,0		181,7
5		162,0		161,4
6	6,26 (d; 2,1)	99,7	6,16 (d; 2,1)	98,9
7		164,8		163,0
8	6,46 (d; 2,1)	94,8	6,62 (d; 2,1)	94,2
9		158,5		157,4
10		104,8		103,9
1'		121,9		125,0
2'	7,19 (s)	104,3	7,27 (s)	104,8
3'		148,7		153,2
4'		140,2		141,1
5'		148,5		153,2
6'	7,19 (s)	104,3	7,27 (s)	104,8
3'-OCH <sub>3</sub>	3,95 (s)	56,7	3,95 (s)	57,0
5'-OCH <sub>3</sub>	3,95 (s)	56,7	3,95 (s)	57,0

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD e CDCl<sub>3</sub>; CD<sub>3</sub>OD <sup>o</sup>)



O flavonoide tricín pode ser encontrado em baixas concentrações nos cereais, tal como trigo. Para este flavonoide tem sido reportado importantes propriedades farmacológicas, destacando-se as atividades anti-viral, antituberculose, antiulcerogênica, antimutagênica, quimiopreventiva, antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória (Havsteen, 1984; Zhou & Ibrahim, 2010; Cai *et al.*, 2005; Verschoyle *et al.*, 2006; Oyama *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010).

### 5.5.1.2 Composto S7



O composto **S7** (6,0 mg) foi isolado da fração acetato de etila como um sólido de cor amarela solúvel em MeOH.

O espectro de massas de baixa resolução para a substância **S7** (**Figura 70, Anexo I**) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  167,96 correspondente a fórmula molecular  $C_8H_8O_4$ .

No espectro de RMN de  $^1H$  para a substância **S7** (**Figura 71, Anexo I**) foram observados sinais na região de hidrogênios de sistema aromático 1,3,4-trissubstituído. Destaca-se o duplete em  $\delta_H$  6,88 ( $J= 8,1$ ) referente ao hidrogênio H-5, cuja constante de acoplamento indica um acoplamento *orto* para este hidrogênio. Destaca-se ainda, o duplete em  $\delta_H$  7,54 ( $J= 1,8$ ) atribuído ao hidrogênio H-2 e o duplo duplete em  $\delta_H$  7,58 (d;  $J= 8,1$  e 1,8 Hz) ao hidrogênio H-6. O singleto em  $\delta_H$  3,88 com integração para 3 hidrogênios indica a presença de um grupo metoxila na estrutura.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  para a substância **S7** (**Figura 72, Anexo I**) mostrou ressonâncias em  $\delta_C$  123,0, 113,7, 148,6, 152,6, 115,8 e 125,5 referentes aos carbonos do sistema aromático C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 respectivamente. Destaca-se ainda o sinal em  $\delta_C$  170,0 referente ao carbono carboxílico C-7, bem como, o sinal em  $\delta_C$  56,3 confirmando a presença do grupo metoxila na estrutura.

As correlações entre deslocamentos químicos de  $^{13}C$  e  $^1H$  observadas no mapa de contornos HSQC (**Figura 73, Anexo I**) contribuíram para as atribuições e para a confirmação da estrutura proposta para este composto.

Na análise das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 74, Anexo I**), evidenciou-se o acoplamento dos hidrogênios H-2 e H-5 em  $\delta_H$  7,61 e 7,58 com o carbono carboxílico em  $\delta_C$  170,0. Destaca-se ainda a correlação dos hidrogênios do grupo metoxila em  $\delta_H$  3,88 com o carbono C-3 em 148,6 confirmando a posição deste grupo na estrutura.

Foi possível confirmar a conectividade do grupo metoxila com a aglicona através do emprego da técnica de diferença de NOE (**Figura 75, Anexo I**), que mostrou um ganho na intensidade do sinal em  $\delta_H$  7,61 (H-2) quando o sinal em  $\delta_H$  3,88 dos hidrogênios do grupo metoxila foi irradiado.

Esses dados foram comparados com os dados constantes na literatura (Yu *et al.*, 2006) e foram concordantes para o ácido vanilínico, **Tabela 36**.

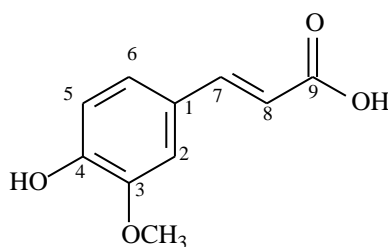
**Tabela 36:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o ácido vanilínico e para o composto **S7**

C	Substância S7		Ácido vanilínico*	
	$\delta_H$ (mult.; J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J em Hz)	$\delta_C$
1		123,0		121,7
2	7,61 (d; 8,1)	113,7	7,43 (s)	115,1
3		148,7		147,3
4		152,6		151,1
5	6,88 (d; 8,1)	115,8	6,84 (d;8,7)	112,8
6	7,58 (dd; 8,1, 1,8)	125,5	7,45 (d; 8,7)	123,5
7		170,0		167,3
3-OCH <sub>3</sub>	3,88	56,6	3,80 (s)	55,6

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD; DMSO-d<sub>6</sub><sup>\*</sup>)

O ácido vanilínico tem demonstrado importante potencial antiproliferativo.<sup>134</sup>

### 5.5.1.3 Composto S8



O composto **S8** (5,0 mg) foi isolado da fração acetato de etila como um sólido de cor amarela solúvel em MeOH.

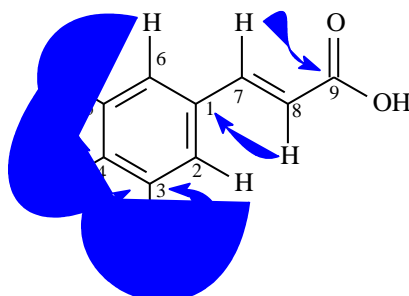
No espectro de massas de baixa resolução para a substância **S8** (**Figura 76, Anexo I**) foi possível observar o pico do íon molecular em  $m/z$  193,97 correspondente a fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_4$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  para a substância **S8** (**Figura 77, Anexo I**) mostrou sinais de hidrogênios característicos de sistema aromático 1,3,4-trissubstituído. Observou-se um duplete em  $\delta_H$  6,81 ( $J= 8,1$  Hz) referente ao hidrogênio H-6 e um duplo duplete em  $\delta_H$  7,06 ( $J= 8,1$  e  $2,1$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-6. Destaca-se ainda o duplete em  $\delta_H$  7,17 (d;  $J= 2,1$  Hz) referente ao hidrogênio H-2. Os dupletos em  $\delta_H$  6,34 (d;  $J=15,9$ Hz) e  $\delta_H$  7,58 (d;  $J= 15,9$ ) indicam a presença de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado *trans*. Adicionalmente foi observado um singlete com integração para 3 hidrogênios em  $\delta_H$  3,88 atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila presente na estrutura.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  para o composto **S8** (**Figura 78, Anexo I**) mostrou sinais em  $\delta_C$  128,6, 111,5, 149,3, 151,9, 116,4 e 123,8 atribuídos aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 respectivamente. Apresentou ainda sinais em  $\delta_C$  146,2 e 116,9 referentes aos carbonos C-7 e C-8 do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado e um sinal em  $\delta_C$  171,0 atribuído ao carbono carboxílico C-9. O sinal em  $\delta_C$  56,4 é referente ao carbono do grupo metoxila presente na estrutura.

No mapa de contornos HSQC (**Figura 79, Anexo I**) foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que auxiliaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esse composto.

Na análise das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 80, Anexo I**), observou-se o acoplamento dos H-6 e H-2 em  $\delta_H$  7,06 e 7,17 com o carbono C-4 em  $\delta_C$  151,9 e do hidrogênio H-5 em  $\delta_H$  6,80 com o carbono C-3 em  $\delta_C$  149,3. Destaca-se ainda as correlações do hidrogênio H-7 em  $\delta_H$  7,55 com o carbono carboxílico C-9 em  $\delta_C$  171,0 e do hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  6,33 com o carbono C-1 em  $\delta_C$  128,6. A **Figura 81** mostra as principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **S8**.

**Figura 81:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S8**

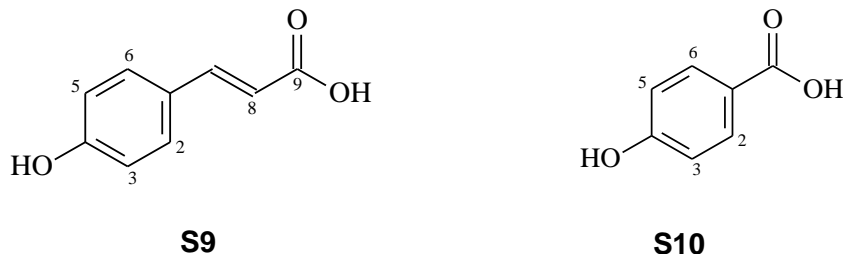
Os dados espectrais do composto **S8** foram comparados com os dados existentes na literatura para o ácido ferúlico (Sajjadi *et al.*, 2012) (**Tabela 37**), sendo concordantes. Este composto já foi isolado de *Saccharum officinarum* por Colombo e colaboradores (2006). Para o ácido ferúlico tem sido reportado significativo potencial antioxidante (Soobrattee *et al.*, 2005).

**Tabela 37:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o ácido ferúlico e para o composto **S8**

C	Substância S8		Ácido Ferúlico*	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		128,6		<b>126,7</b>
2	7,17 (d; 2,1)	111,5	7,09 (d;2,0)	109,5
3		149,3		147,1
4		151,9		148,4
5	6,81 (d; 8,1)	116,4	6,97 (d;9,0)	114,4
6	7,06 (dd;8,1, 2,1)	123,8	7,14 (d;8,0, 2,0)	123,6
7	7,58 (d; 15,9)	146,2	7,75 (d; 15,,0)	146,0
8	6,34 (d;15,9)	116,9	6,34 (d; 15,0)	114,8
9		171,0		171,4
3-OCH <sub>3</sub>	3,88 (s)	56,4	3,98 (s)	55,9

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75 ,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD; CDCl<sub>3</sub> \*)

## 5.5.1.4 Compostos S9+S10



A mistura de compostos **S9+S10** (46,5 mg) foi isolada da fração acetato de etila como um sólido amorfo amarelo solúvel em MeOH.

No cromatograma obtido pela análise de CG-EM da mistura de substâncias **S9+S10** (**Figura 82, Anexo I**) foram observados dois picos com tempos de retenção 7,34 e 10,53 minutos. No tempo de retenção 7,34 minutos o espectro de massas de baixa resolução (**Figura 83, Anexo I**) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  137,94, a qual foi atribuído a substância **S10** correspondente a fórmula molecular  $C_7H_6O_3$ . Ao passo que, no tempo de retenção 10,53 minutos o espectro de massas de baixa resolução (**Figura 84, Anexo I**) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  163,97 correspondente a substância **S9** correspondente a fórmula molecular  $C_9H_8O_3$ .

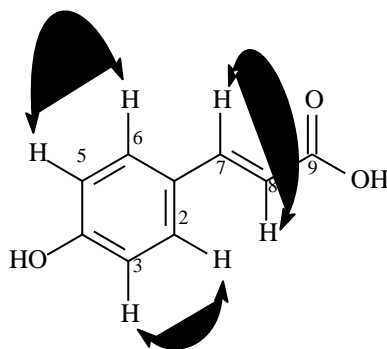
O espectro de RMN de  $^1H$  da mistura **S9+S10** (**Figuras 85 e 86, Anexo I**) apresentou sinais na região de hidrogênios de sistema aromático o sinal em  $\delta_H$  7,47 (dt;  $J= 8,4$  e  $4,8$  Hz) é referente aos hidrogênios H-2 e H-6 da substância majoritária, sendo que a constante de acoplamento observada evidencia acoplamentos *orto* e *meta* para esses hidrogênios. Destaca-se ainda, o sinal em  $\delta_H$  6,83 (dt;  $J= 8,4$  e  $4,8$  Hz) com integração para 4 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5 da substância majoritária. As multiplicidades e constantes de acoplamento são típicas de sistema aromático 1,4 dissustituído. Nota-se ainda, no espectro de RMN de  $^1H$ , sinais em  $\delta_H$  6,31 (d;  $J= 15$  Hz; H-8) e 7,63 (d;  $J= 15$  Hz; H-7) característicos de sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado *trans*.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Figura 87, Anexo I**) foram observados sinais na região de carbonos de sistema aromático em  $\delta_C$  127,4, 131,2, 116,2 e 161,3 atribuídos aos carbonos da substância majoritária, C-1, C-2 e C-6, C-3 e C-5, e C-4 respectivamente. Destaca-se ainda, os sinais em  $\delta_C$  146,8 e 115,8 referentes aos

carbonos C-7 e C-8 do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado e o sinal em  $\delta_C$  170,1 típico de carbono carboxílico conjugado.

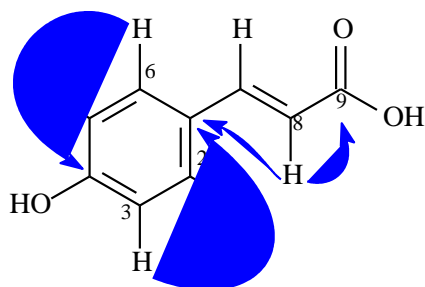
No mapa de contornos COSY (**Figura 88, Anexo I**) foi possível observar a correlação entre os hidrogênios H-7 e H-8 em  $\delta_H$  7,63 e 6,31 do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, bem como a correlação entre os hidrogênios H-2 e H-3 em  $\delta_H$  7,47 e 6,83, conforme **Figura 89**.

**Figura 89:** Principais correlações observadas no mapa de contornos COSY ( $^1H \times ^1H$ ) para **S9**



No mapa de contornos HSQC (**Figura 90, Anexo I**) foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que auxiliaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esse composto.

Na análise das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 91, Anexo I**), evidenciou-se o acoplamento dos hidrogênios do sistema aromático H-6 em  $\delta_H$  7,47 com o carbono C-4 em  $\delta_C$  161,3, hidrogênio H-3 em  $\delta_H$  6,83 com o carbono C-1 em  $\delta_C$  127,4. Destaca-se ainda, as correlações do hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  6,31 com o carbono carboxílico C-9 em  $\delta_C$  171,0 e com o carbono C-1 em  $\delta_C$  127,4. A **Figura 92** mostra as principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **S9**.

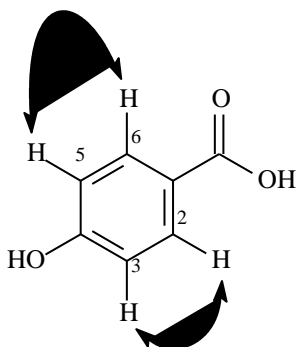
**Figura 92:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para **S9**

Esses dados foram comparados com os dados constantes na literatura (Silva *et al.*, 2001) e foram concordantes para o ácido *p*-hidroxicinâmico, **Tabela 25**.

Para a substância minoritária foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 85 e 86, Anexo I**) sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,90 (dt;  $J = 8,4$  e  $4,8$  Hz) referente aos hidrogênios equivalentes H-2 e H-6, e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (dt;  $J = 8,4$  e  $4,8$  Hz) com integração para 4 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5 da estrutura. De acordo com esses dados, a substância minoritária também se constitui de um anel aromático com padrão 1,4-dissubstituído.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 87, Anexo I**) apresentou sinais na região de carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  133,1, 116,9 e 163,5 atribuídos aos carbonos C-2 e C-6, C-3 e C-5, e C-4 respectivamente. Destaca-se ainda o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  171,2, referente ao carbono carboxílico presente na estrutura.

No mapa de contornos COSY (**Figura 88, Anexo I**) destaca-se as correlações entre os hidrogênios H-3 e H-2 em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 e 7,90 de acordo com a **Figura 93**.

**Figura 93:** Principais correlações observadas no mapa de contornos COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **S10**

No mapa de contornos HMBC (**Figura 91, Anexo I**) foram observadas as correlações do hidrogênio H-2 em  $\delta_H$  7,90 com o carbono C-4 em  $\delta_C$  163,5 e com o carbono C-1 em  $\delta_C$  131,2. Esses dados foram comparados com os da literatura (Scott, 1972) e mostraram-se concordantes para o ácido *p*-hidroxibenzóico. **Tabela 38.**

**Tabela 38:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a mistura **S9+S10** e para os compostos ácido *p*-hidroxicinâmico e *p*-hidroxibenzóico.

	Substância S9	Ac. <i>p</i> - hidroxicinâmico*	Substância S10	Ac. <i>p</i> - hidroxibenzóico**
C	$\delta_C$	$\delta_C$	$\delta_C$	$\delta_C$
1	127,4	125,3	131,2	130,8
2	131,2	130,2	133,1	130,2
3	116,2	115,8	116,9	129,1
4	161,3	159,7	163,5	133,7
5	116,9	115,8	116,9	129,1
6	131,2	130,2	133,1	130,2
7	146,8	144,3	-	168,0
8	115,8	115,4	-	
9	170,1	168,0	171,2	

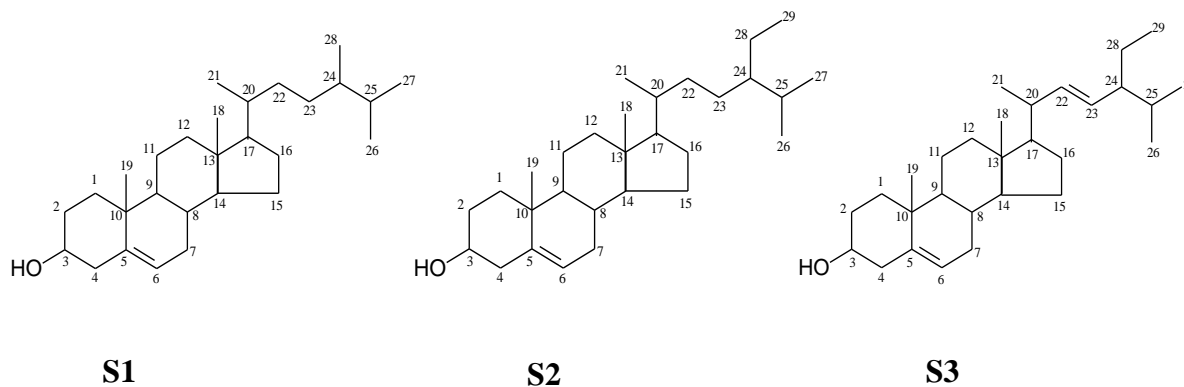
( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{CD}_3\text{OD}^*$ ;  $\text{DMSO}^{**}$ )

Os ácidos fenólicos são divididos em duas classes, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. A primeira classe constitui as complexas estruturas dos taninos hidrolizáveis e são menos abundantes nos vegetais que fazem parte da alimentação humana. No entanto, os ácidos hidroxicinâmicos são amplamente presentes em diversos alimentos de origem vegetal como o café, erva mate, cereais e frutas (Mira *et al.*, 2008). Para os ácidos *p*-hidroxibenzóico e *p*-hidroxicinâmico tem sido relatado na literatura significativo potencial antiproliferativo e antioxidante (Maillard & Berset, 1995).



## 5.5.2 Terpenoides e esteroides

### 5.5.2.1 Mistura de compostos S1+S2+S3



A mistura dos compostos **S1+S2+S3** (30,0 mg) foi obtida da fração acetato de etila na forma de um sólido branco cristalino solúvel em clorofórmio.

No cromatograma obtido pela análise de CG-EM da mistura (**Figura 94, Anexo I**) foi observado três picos principais com tempos de retenção em 23,98, 24,48 e 25,44 minutos, sendo que para esses tempos os espectros de massas de baixa resolução (**Figuras 95-97, Anexo I**) mostraram os picos dos íons moleculares em  $m/z$  400,28, 412,29 e 414,31 atribuídos as substâncias **S1**, **S3** e **S2** respectivamente.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura (**Figura 98, Anexo I**), observou-se um sinal na região de hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,36 (d;  $J=5,1$  Hz) correspondente ao H-6 e duplo dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  4,97 e 5,19 com constante de acoplamento de 8,4 Hz correspondentes aos hidrogênios H-22 e H-23. O multipletto centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,47 é referente ao hidrogênio carbinólico H-3 e os sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,67 a 1,03 são característicos de grupos metilas.

Entre os sinais observados no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 99, Anexo I**), destacam-se os sinais atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 C-6 em  $\delta_{\text{C}}$  140,9 e 121,9 e C-22 e C-23 em  $\delta_{\text{C}}$  138,5 e 129,4. Ainda foi observado um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,0 referente ao carbono carbinólico C-3. Os dados espectrais da mistura foram comparados com os dados já existentes na literatura para esteroides (Goulart *et al.*, 1993), sendo que a partir da análise dos dados obtidos foi possível concluir que a mistura isolada continha os esteróides: 24 $\alpha$ -metil- colest-5-enol (campesterol) **S1**, 24 $\alpha$ -etil-colest-5-enol (sitosterol) **S2** e 24 $\alpha$ -etil-colest-5,22-dienol (estigmasterol) **S3**. **Tabela 39**.

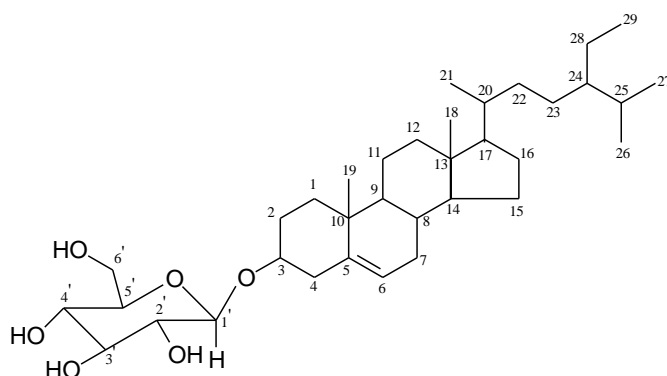
**Tabela 39:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a mistura **S1**, **S2** e **S3** e para os compostos sitosterol, estigmasterol e campesterol

	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S1</b>	<b>Sitosterol*</b>	<b>Estigmasterol*</b>	<b>Campesterol*</b>
<b>C</b>	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$ (DEPT)	$\delta_c$ (DEPT)	$\delta_c$ (DEPT)
<b>1</b>	37,4	37,4	37,4	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>2</b>	31,8	31,8	31,8	31,6 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )
<b>3</b>	72,0	72,0	72,0	71,9 (CH)	71,9 (CH)	71,8 (CH)
<b>4</b>	42,5	42,5	42,5	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3 (CH <sub>2</sub> )
<b>5</b>	140,9	140,9	140,9	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)
<b>6</b>	121,9	121,9	121,9	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)
<b>7</b>	31,8	31,8	31,8	31,8 (CH <sub>2</sub> )	31,8 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )
<b>8</b>	32,1	32,1	32,1	31,8 (CH)	31,8 (CH)	31,8 (CH)
<b>9</b>	50,3	50,3	50,3	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)
<b>10</b>	36,3	36,3	36,3	36,4 (C)	36,4 (C)	36,5 (C)
<b>11</b>	21,2	21,2	21,2	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )
<b>12</b>	39,8	39,8	39,9	39,7 (CH <sub>2</sub> )	39,6 (CH <sub>2</sub> )	39,8 (CH <sub>2</sub> )
<b>13</b>	42,5	42,5	42,5	42,3 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)
<b>14</b>	56,9	56,9	56,9	56,7 (CH)	56,8 (CH)	56,7 (CH)
<b>15</b>	24,5	24,5	24,5	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )
<b>16</b>	28,4	28,4	28,4	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>17</b>	56,2	56,1	56,2	56,0 (CH)	55,9 (CH)	56,0 (CH)
<b>18</b>	12,0	12,0	12,0	11,8 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )
<b>19</b>	19,6	19,6	19,6	19,3 (CH <sub>3</sub> )	19,3 (CH <sub>3</sub> )	19,3 (CH <sub>3</sub> )
<b>20</b>	36,1	40,7	36,1	36,1 (CH)	40,5 (CH)	36,1 (CH)
<b>21</b>	19,6	21,4	18,9	19,03 (CH <sub>3</sub> )	21,2 (CH <sub>3</sub> )	18,9 (CH <sub>3</sub> )
<b>22</b>	33,9	138,5	33,9	33,9 (CH <sub>2</sub> )	138,4 (CH)	33,6 (CH <sub>2</sub> )
<b>23</b>	39,2	129,4	29,1	39,1 (CH <sub>2</sub> )	129,2 (CH)	28,91(CH <sub>2</sub> )
<b>24</b>	46,0	51,4	56,1	45,8 (CH)	51,2 (CH)	56,08 (CH)
<b>25</b>	29,1	31,8	29,6	26,0 (CH)	31,8 (CH)	29,6 (CH)
<b>26</b>	18,9	19,2	18,9	18,7 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	18,7 (CH <sub>3</sub> )
<b>27</b>	19,6	19,2	19,6	19,8 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,8 (CH <sub>3</sub> )

<b>28</b>	23,2	25,6	18,9	23,0 (CH <sub>3</sub> )	25,4 (CH <sub>3</sub> )	18,2 (CH <sub>3</sub> )
<b>29</b>	12,2	12,4	-	11,9 (CH <sub>3</sub> )	12,2 (CH <sub>3</sub> )	-

( $\delta$ -ppm; 75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>, CDCl<sub>3</sub>\*)

### 5.5.2.2 Composto S5



A substância **S5** (104,2 mg) foi isolada da fração acetato de etila SOA como cristais amorfo solúveis em solução de metanol e clorofórmio.

No espectro de massas de baixa resolução para **S5** (**Figura 100, Anexo I**) foi observado o pico do íon molecular em  $m/z$  414,23 indicando que possivelmente **S5** possui mesma aglicona que **S1**.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da mistura (**Figura 101, Anexo I**) apresentou sinais análogos aos atribuídos anteriormente para a mistura **S1+S2+S3**. Entretanto, foram observados sinais adicionais em  $\delta_H$  4,4 (d;  $J = 8,1$  Hz), característico de hidrogênio anomérico e múltiplos sinais na região de  $\delta_H$  3,0 a 3,8, indicando a presença de uma unidade glicosídica na estrutura.

Além dos sinais correspondentes à aglicona dos esteróides estigmasterol, sitosterol e campesterol, o espectro de RMN de <sup>13</sup>C da mistura (**Figura 102, Anexo I**) apresentou um sinal em  $\delta_C$  102,0 atribuído ao carbono anomérico C-1', e sinais em  $\delta_C$  74,5, 78,7, 71,1, 77,1 e 62,5 atribuídos aos carbonos C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6' da glicose. Os dados espectrais da substância **S5** foram comparados com os da literatura para o daucosterol (Matida *et al.*, 1996) e mostraram-se concordantes, **Tabela 40**.

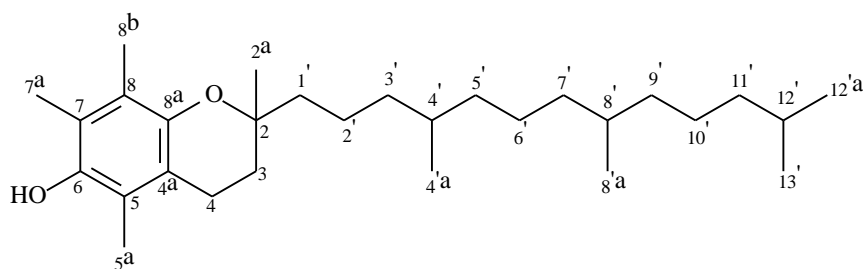
**Tabela 40:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S5** e para o daucosterol

	<b>S5</b>	<b>Daucosterol*</b>
<b>C</b>	<b><math>\delta_c</math></b>	<b><math>\delta_c</math></b>
<b>1</b>	37,5	37,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>2</b>	32,7	29,9 (CH <sub>2</sub> )
<b>3</b>	79,7	78,2 (CH)
<b>4</b>	43,0	39,0(CH <sub>2</sub> )
<b>5</b>	141,3	140,6 (C)
<b>6</b>	122,7	122,6 (CH)
<b>7</b>	32,7	31,9 CH <sub>2</sub> )
<b>8</b>	32,8	31,8 (CH)
<b>9</b>	51,1	50,0 (CH)
<b>10</b>	36,9	36,6 (C)
<b>11</b>	21,8	21,0 (CH <sub>2</sub> )
<b>12</b>	39,4	39,6 (CH <sub>2</sub> )
<b>13</b>	43,0	42,2 (C)
<b>14</b>	56,8	56,5 (CH)
<b>15</b>	25,0	24,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>16</b>	29,0	28,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>17</b>	57,6	55,9 (CH)
<b>18</b>	12,3	11,7 (CH <sub>3</sub> )
<b>19</b>	19,8	19,1 (CH <sub>3</sub> )
<b>20</b>	36,9	36,1 (CH)
<b>21</b>	20,5	18,9 (CH <sub>3</sub> )
<b>22</b>	34,7	33,9 (CH <sub>2</sub> )
<b>23</b>	40,6	39,1 (CH <sub>2</sub> )
<b>24</b>	46,7	45,7 (CH)
<b>25</b>	29,0	29,2 (CH)
<b>26</b>	19,8	18,7 (CH <sub>3</sub> )
<b>27</b>	21,8	19,7 (CH <sub>3</sub> )
<b>28</b>	23,8	23,1 (CH <sub>3</sub> )
<b>29</b>	12,7	11,9 (CH <sub>3</sub> )
<b>1'</b>	102,0	102,2 (CH)
<b>2'</b>	74,5	75,0 (CH)
<b>3'</b>	78,7	77,0 (CH)
<b>4'</b>	71,1	71,3 (CH)
<b>5'</b>	77,1	78,1 (CH)
<b>6'</b>	62,5	62,2 (CH <sub>2</sub> )

( $\delta$ -ppm; 75 ,5 MHz, CD<sub>3</sub>OD; \* $\delta$ -ppm; 75,5MHz, CDCl<sub>3</sub>)

De acordo com Gallota e Boaventura (2005) o daucosterol é significativamente citotóxico frente à *Artemia salina* apresentando uma DL<sub>50</sub>=67  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5.5.2.3 Composto S6



O composto **S6** (3,6 mg) foi isolado da fração acetato de etila como um óleo de cor amarela solúvel em clorofórmio.

No espectro de massas de baixa resolução para a substância **S6** (**Figura 103, Anexo I**) foi possível observar o pico do íon molecular em  $m/z$  430,28 correspondente a fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O_2$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  para a substância **S6** (**Figura 104, Anexo I**) mostrou três simpletos com integração para três hidrogênios em  $\delta_H$  1,59, 2,12 e 2,17, correspondentes aos hidrogênios dos grupos metila ligados ao anel aromático H-5a, H-7a e H-8b. Destaca-se ainda 4 singletos observados em  $\delta_H$  1,26, 0,88, 0,87 e 0,85 atribuídos aos hidrogênios dos grupos metila H-2a, H-4'a, H-8'a e H-12'a e H-13'. Apresentou ainda um tripleto em  $\delta_H$  2,61 ( $J= 6,9$  Hz) referente aos hidrogênios H-4 e o multipletto em  $\delta_H$  1,78 correspondente aos hidrogênios H-3.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  para o composto **S6** (**Figura 105, Anexo I**) apresentou sinais em  $\delta_C$  12,0 correspondentes aos grupos metila C-5a e C-7a e em  $\delta_C$  12,4 atribuído ao grupo metila 8b ligados ao anel aromático. Destacam-se ainda os sinais correspondentes aos grupos metila presentes na cadeia lateral em  $\delta_C$  19,9, 19,9, e 22,9 correspondentes a C-4'a, C-8'a, C-12'a e C-13' respectivamente. Apresentou ainda sinais na região de carbonos de sistema aromático em  $\delta_C$  117,6, 118,7, 121,9, 122,8, 144,7 e 145,7 atribuídos aos carbonos C-5, C-7, C-4a, C-8, C-6 e C-8a.

Os dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  do composto **S6** foram comparados com os dados constantes na literatura (Miranda *et al.*, 2012) para o  $\alpha$ -tocoferol (**Tabela 41**) e mostraram-se concordantes, sendo que se trata do primeiro relato de isolamento deste composto a partir de *Saccharum X officinarum*.

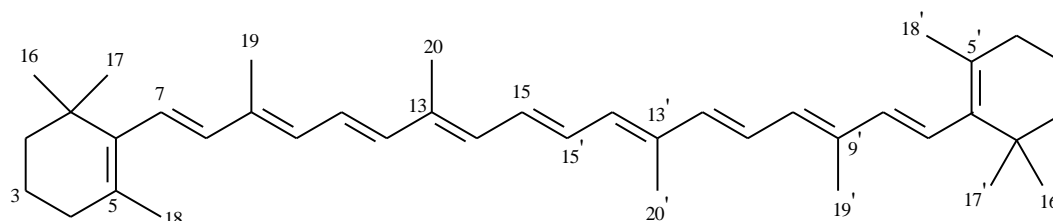
O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) está presente na maioria dos vegetais e constitui uma das mais importantes vitaminas lipossolúveis devido ao seu significativo potencial antioxidante (Jeteau *et al.*, 2002), que previne contra doenças degenerativas como o câncer, mal de Alzheimer (Tabet *et al.*, 2008)

**Tabela 41:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S6** e para o  $\alpha$ -tocoferol

	<b>S6</b>	<b><math>\alpha</math>-tocoferol*</b>
<b>C</b>	<b><math>\delta\text{c}</math></b>	<b><math>\delta\text{c}</math></b>
<b>2</b>	74,7	74,4
<b>2a</b>	24,0	23,7
<b>3</b>	31,7	32,7
<b>4</b>	24,7	24,7
<b>4a</b>	121,9	122,5
<b>5</b>	117,6	117,3
<b>5a</b>	12,0	11,4
<b>6</b>	144,7	144,6
<b>7</b>	118,7	118,5
<b>7a</b>	11,5	11,2
<b>8</b>	122,8	122,5
<b>8a</b>	145,7	145,5
<b>8b</b>	12,4	12,2
<b>1'</b>	39,6	39,3
<b>2'</b>	24,7	24,7
<b>3'</b>	37,3	37,3
<b>4'</b>	37,3	37,3
<b>4'a</b>	19,9	19,7
<b>5'</b>	37,3	37,3
<b>6'</b>	25,0	24,4
<b>7'</b>	37,3	37,3
<b>8'</b>	37,3	37,3
<b>8'a</b>	19,9	19,7
<b>9'</b>	37,3	37,3
<b>10'</b>	24,6	24,7
<b>11'</b>	39,9	39,3
<b>12'</b>	28,2	27,9
<b>12'a</b>	22,9	22,7
<b>13'</b>	22,9	22,7

( $\delta$ -ppm; 75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; \* $\delta$ -ppm; 75,5MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

## 5.5.2.4 Composto S11



O composto **S11** foi isolado da fração hexânica como um óleo de cor vermelho solúvel em clorofórmio.

No espectro de massas de baixa resolução para a substância **S11** (**Figura 106, Anexo I**) foi possível observar o pico do íon molecular em  $m/z$  536,97 correspondente a fórmula molecular  $C_{40}H_{56}$ .

No espectro de RMN de  $^1H$  para o composto **S11** (**Figura 107, Anexo I**) foram evidenciados singletos na região de  $\delta_H$  1,03 a 2,05 correspondentes aos hidrogênios dos 10 grupos metilas presentes na estrutura.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  para o composto **S11** (**Figura 108, Anexo I**) foram observados 40 ressonâncias evidenciando um esqueleto tetraterpênico. Entre os sinais, destacam-se as ressonâncias em  $\delta_C$  29,2 atribuída aos carbonos C-16/C-16' e C-17/C-17', em  $\delta_C$  22,7 referente aos carbonos C-18/C-18' e em  $\delta_C$  12,9 referente aos carbonos C-19/C-19' e C-20/C-20'.

Os dados espectrais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  do composto **S11** foram comparados com os da literatura (Miranda *et al.*, 2012) para o  $\beta$ -caroteno e mostraram-se concordantes, sendo este o primeiro relato sobre a presença de  $\beta$ -caroteno nas folhas e colmos de *Saccharum X officinarum*. **Tabela 42.**

**Tabela 42:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a **S11** e para o  $\beta$ -caroteno

	<b>S11</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno*</b>
<b>C</b>	<b><math>\delta\text{c}</math></b>	<b><math>\delta\text{c}</math></b>
<b>1/1'</b>	34,5	34,2
<b>2/2'</b>	39,9	39,6
<b>3/3'</b>	19,5	19,2
<b>4/4'</b>	33,3	33,1
<b>5/5'</b>	129,6	129,3
<b>6/6'</b>	137,9	137,9
<b>7/7'</b>	126,6	126,6
<b>8/8'</b>	137,5	137,7
<b>9/9'</b>	136,7	136,0
<b>10/10'</b>	131,1	130,8
<b>11/11'</b>	125,2	125,0
<b>12/12'</b>	137,2	137,2
<b>13/13'</b>	136,7	136,4
<b>14/14'</b>	132,6	132,4
<b>15/15'</b>	129,6	129,9
<b>16/16'</b>	29,2	28,9
<b>17/17'</b>	29,2	28,9
<b>18/18'</b>	22,7	21,7
<b>19/19'</b>	12,9	12,8
<b>20/20'</b>	12,9	12,7

( $\delta$ -ppm; 75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; \* $\delta$ -ppm; 75,5MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

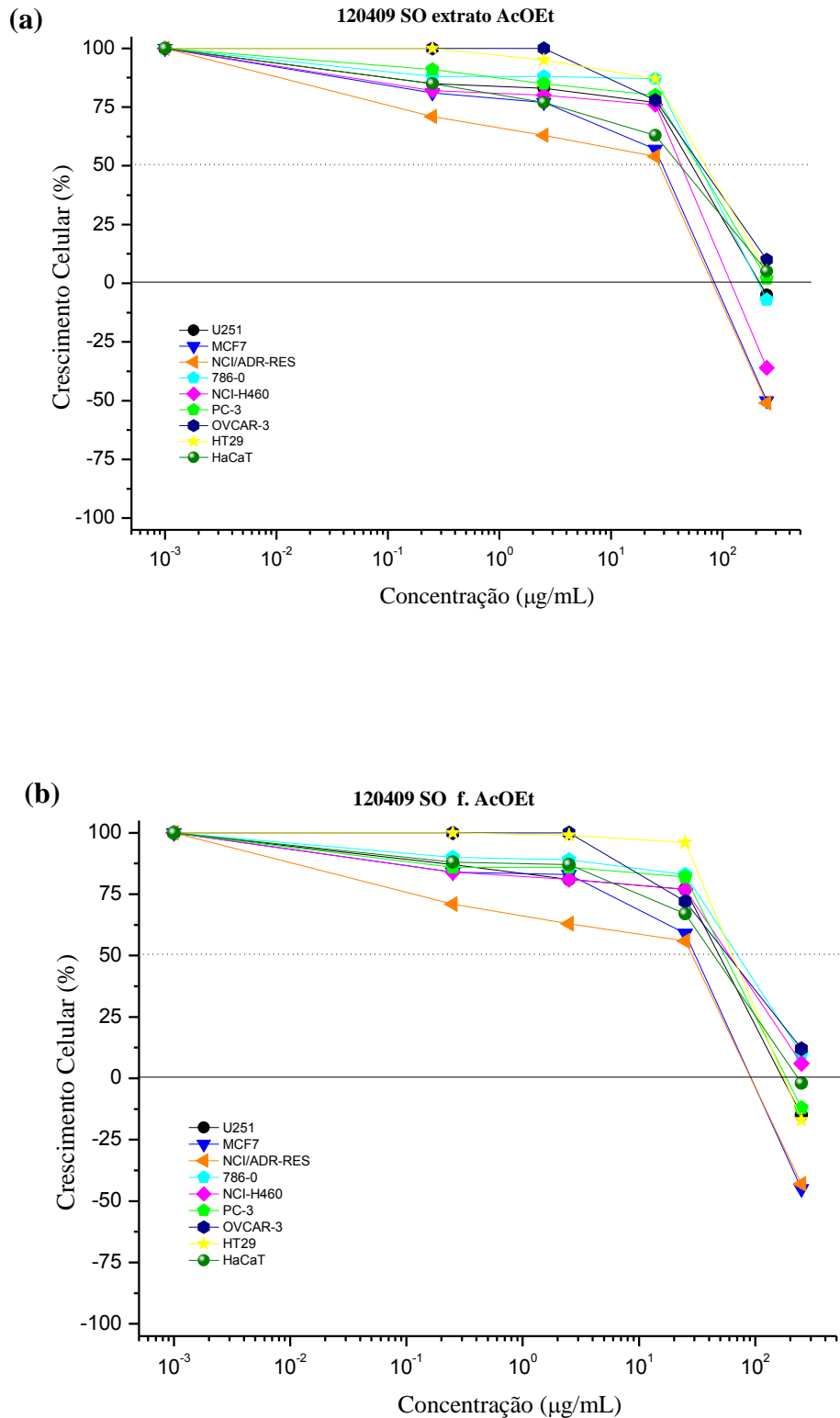
O  $\beta$ -caroteno é um pigmento natural presente nos vegetais e frutas amarelo-alaranjados e verdes-escuros. No organismo humano, o  $\beta$ -caroteno é convertido a duas moléculas de vitamina A, um micronutriente lipossolúvel (Mangels *et al.*, 1993). Além de sua eficiente capacidade antioxidante, muitos trabalhos tem discutido o potencial quimiopreventivo do  $\beta$ -caroteno, bem como sua ação antiproliferativa (Peto *et al.*, 1981).

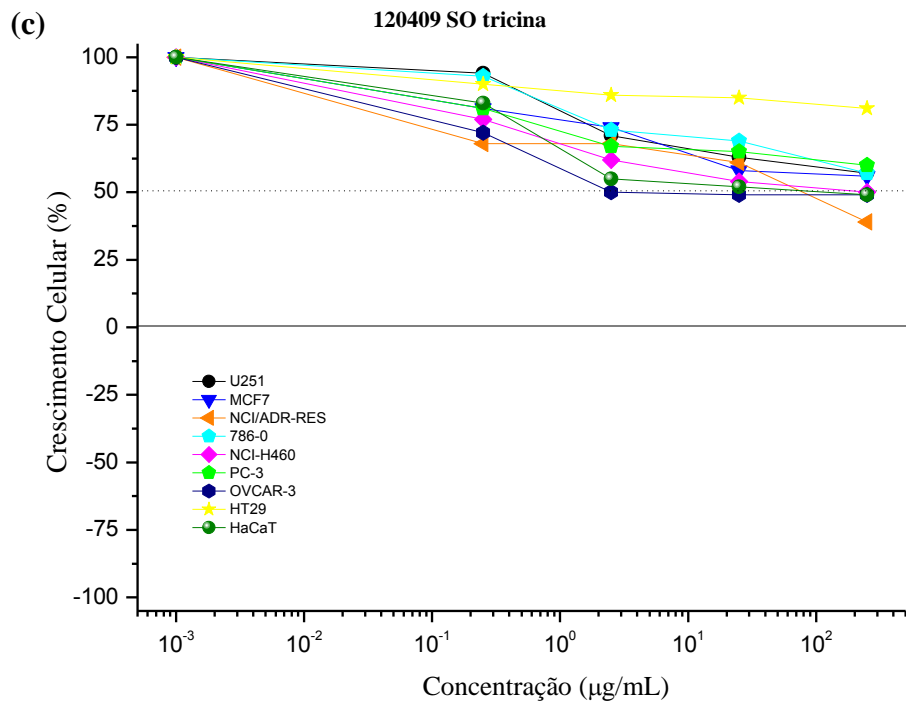


## 6 Atividade Antiproliferativa

O estudo químico da espécie *Saccharum X officinarum* conduziu ao isolamento de compostos fenólicos que apresentam propriedades farmacológicas significativas relatadas na literatura, especialmente a atividade antiproliferativa. Desta forma, a avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada com o extrato bruto acetato de etila, frações hexânica, acetato de etila, metanólica e o composto isolado tricín obtidos das folhas e colmos de *Saccharum X officinarum*. Oito linhagens de células tumorais humanas foram utilizadas no ensaio: [rim (786-0), mama (MCF-7), ovário (OVCAR-3), próstata (PC-3), cólon (HT29), pulmão (NCI-H460), glioma (U251) e ovário resistente (NCI-ADR/RES)] e uma linhagem de células normais humanas (HaCat, queratinócito) pelo método colorimétrico de avaliação de inibição do crescimento com sulforrodamina B. Doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os resultados estão representados nos gráficos (a), (b) e (c) da **Figura 109**, **Tabela 30** e **Figura 110** gráficos (d) e (e) em **Anexo I**. Os dados de  $GI_{50}$  obtidos no ensaio de avaliação da atividade antiproliferativa para as amostras testadas foram classificadas em moderada e/ou inativas de acordo com a literatura (Denny *et al.*, 2007; Fouche *et al.*, 2008)

**Figura 109:** Porcentagem de crescimento de células tumorais e não tumorais humanas versus a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio de avaliação de atividade antiproliferativa para (a) extrato bruto, (b) fração acetato de etila e (c) tricina.





**Tabela 43.** Valores de  $\text{GI}_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para o extrato bruto acetato de etila, frações hexânica, acetato de etila e metanólica e para o flavonoide *tricin*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	Q
Doxorrubicina *	< 0,025	< 0,025	0,025	0,20	< 0,025	0,082	0,28	0,12	0,025
Extrato acetato de etila	29,0	25,8	25,4	31,8	28,7	47,8	57,9	61,8	26,1
Fração hexânica	> 250	164,0	162,5	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Fração acetato de etila	29,1	26,1	5,9	65,4	51,7	30,3	52,4	35,0	34,2
Fração metanólica	> 250	67,2	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
<i>Tricin</i>	> 250	> 250	70,3	> 250	127,7	> 250	41,1	> 250	69,6

Linhagens de células tumorais humanas: A = U251 (glioma, SNC); B = MCF-7 (mama); C = NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas); D = 786-0 (rim); E = NCI-H460 (pulmão); F = PC-3 (prostata); G = OVCAR-3 (ovário); H = HT29 (colo); Q = HaCat (células não tumorais queratinócitos). \*Doxorrubicina: Quimioterápico de referência;  $\text{GI}_{50}$ : Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular.

A curva (b) demonstrou que a fração acetato de etila proveniente do extrato bruto acetato de etila das folhas e colmos de *Saccharum X officinarum* possui efeitos citostática e citocida além da atividade antiproliferativa sobre as linhagens de células tumorais testadas, destacando a significativa seletividade observada para células tumorais de ovário resistente a múltiplas drogas, com  $GI_{50}=5,9 \mu\text{g/mL}$ . Este resultado pode estar associado à presença dos ácidos fenólicos *p*-hidroxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, vanilínico e ferúlico, uma vez que estes compostos têm demonstrado expressivo potencial antiproliferativo contra células tumorais humanas de mama (Kampa *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004).

De acordo com curva (a) extrato bruto acetato de etila mostrou moderada atividade antiproliferativa, apresentando valores de  $GI_{50}$  de 25,4 a 61,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , de forma similar à fração acetato de etila. Os efeitos citocida e citostático também foram observados, porém o extrato bruto não demonstrou seletividade frente às linhagens de células tumorais avaliadas.

Para o flavonoide tricina, curva (c), isolado da fração acetato de etila, foi observado fraca atividade antiproliferativa e ausência de efeito citocida. Além disso, o flavonoide apresentou seletividade contra duas linhagens de células tumorais, ovário ( $GI_{50}=41,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e ovário resistente a múltiplas drogas ( $GI_{50}=70,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Na literatura foi reportado que o flavonoide tricina possui atividades antiproliferativas contra câncer de colo e mama (Cai *et al.*, 2004).

Por outro lado, as frações hexânica e metanólica foram inativas frente às linhagens de células testadas apresentando valores de  $GI_{50}$  superiores a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 43).

## 7 Conclusão

O estudo de substâncias sinalizadoras presentes nas folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum* conduziu ao isolamento e identificação da substância ( $\pm$ )-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona através de análise em CG-EM. Até o presente momento não há relatos na literatura sobre o isolamento de semioquímicos da classe das acil-homosserina lactonas a partir de cana-de-açúcar. A partir desse resultado, dez derivados foram sintetizados através de otimização de metodologia presente na literatura: (*R*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona e seu enantiômero (*S*), (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homosserina lactona e (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(hexanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(octanoil)-homosserina lactona, (*R*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona e seu enantiômero *S* e (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homosserina lactona. Os produtos obtidos foram purificados por coluna cromatográfica de gel de sílica e caracterizados por análise de dados espectrais de CG-EM, RMN. Todas as substâncias foram submetidas a ensaios de avaliação de estímulo do crescimento em colmos de *Saccharum X officinarum* desenvolvidos neste trabalho. No bioensaio de determinação de melhor procedimento foi concluído que a imersão inicial dos toletes seguida de irrigações com a substância sintética é o melhor procedimento para o bioensaio de atividade de promoção de crescimento, onde foi observado um aumento na massa de raiz seca de 69% em relação ao controle. No bioensaio de determinação da concentração ativa de AHLs e não tóxica aos tecidos vegetais da planta foi observado que a melhor concentração é de 0,5 mg/L de AHLs. Na avaliação da importância da configuração absoluta para atividade de promoção de crescimento utilizando a variedade RB96-6928 a homosserina (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homosserina lactona apresentou maiores incrementos no desenvolvimento de *S. x officinarum* comparado ao seu enantiômero *R*. O enantiômero (*S*)-*N*-(decanoil)-homosserina lactona também foi mais ativo em comparação ao seu enantiômero (*R*) nesta variedade. A análise por microscopia eletrônica de varredura das raízes de cana-de-açúcar tratadas com acil-HSLs mostraram evidente alongamento celular, indicando que estas moléculas podem se constituir como uma nova classe de reguladores de crescimento vegetal para cana-de-açúcar. Os resultados alcançados neste trabalho podem ter grandes impactos econômicos e ambientais para o nosso país, bem como, pode ser a base para diversas descobertas científicas que objetivam suprir as necessidades energéticas da sociedade aliadas a produção de cana-de-açúcar. Devido à

importância econômica dos resultados obtidos, os mesmos foram protegidos recentemente pelo grupo de pesquisas em um pedido de depósito de patente no INPI.

O estudo químico da fração acetato de etila proveniente do extrato bruto acetato de etila das folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum* conduziu ao isolamento do flavonóide *tricin*, dos ácidos fenólicos *p*-hidroxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, vanilínico e ferúlico, dos esteróides estigmasterol, sitosterol e campesterol e do esteróide glicosilado daucosterol e do  $\alpha$ -tocoferol, sendo que este é o primeiro relato da presença dos compostos ácido vanilínico, daucosterol e do  $\alpha$ -tocoferol em *Saccharum X officinarum*.

O estudo da fração hexânica obtida a partir do fracionamento do extrato bruto acetato de etila das folhas e colmos de *Saccharum X officinarum* resultou no isolamento do tetraterpeno  $\beta$ -caroteno, relatado pela primeira vez na espécie.

A avaliação da atividade antiproliferativa mostrou que o extrato bruto acetato de etila e fração acetato de etila foram pouco seletivos e moderadamente ativos frente às linhagens de células cancerígenas testadas. Este potencial antiproliferativo observado pode estar associado à presença dos compostos fenólicos, para os quais tem sido relatado na literatura significativo potencial anticâncer. O flavonoide tricina também exibiu atividade antiproliferativa moderada, no entanto pode-se observar maior seletividade para células tumorais de ovário e ovário resistente a multiplas drogas, com  $GI_{50}=41,1$  e  $70,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. A fração hexânica demonstrou baixo potencial antiproliferativo, enquanto que a fração metanólica foi seletivas para células tumorais humanas de mama, com  $GI_{50}=67,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$

O estudo químico das folhas e colmos da espécie *Saccharum X officinarum* enriquece o conhecimento sobre o perfil químico desta espécie nativa de regiões tropicais, que além de possuir metabólitos secundários que se destacam por apresentar significativos potenciais farmacológicos, é também, uma das maiores culturas agrícolas do mundo.

## 8 Referências

- ABDEL-WAHAB, S. M.; EL-TANBOULY, N. D.; KASSEM, H. A.; MOHAMED, E. A. Phytochemical and biochemical study of corn silk (styles and stigmas of *Zea mays* L.). **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, vol. 40, 93-102, 2002.
- ABEGAZ, B.; YOHANNES, P. G. Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* Stapf. **Journal of Natural Products**, vol. 46, 424-426, 1983.
- ALBERNAZ, L. C.; PAULA, J. E.; ROMERO, A. R. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plants extracts in traditional medicine of the brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 131, 116-121, 2010.
- ALMEIDA, J. M. D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; CARVALHO, J. E.; LAJOLO, F. M. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, vol. 68, 1165-1171, 2007.
- ALMEIDA, T. L.; MONTEIRO, J. A.; LOPES, G. K. P.; CHIAVELLI, L. U. R.; SANTIN, S. M. O.; SILVA, C. C.; KAPLUM, V.; SCARIOT, D. B.; NAKAMURA, C. V.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FARIA, R. T.; POMINI, A. M. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e antileishmanicida de *Maxxilaria picta*. **Quimica Nova**, vol. 37, 1151-1157, 2014.
- ARRUDA, A. L. A.; SOUZA, D. G.; VIEIRA, C. J. B.; OLIVEIRA, R. F.; PAVAN, F. R.; FUJIMURA, C. Q. L.; RESENDE, U. M.; CASTILHO, R. O. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 14, 276-281, 2012.
- ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Washington: USDA, 307, 1958 (Agriculture Handbook, 122).
- ASIS, C. A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; CHEBOTAR, V. K.; TSUCHIYA, K. I.; AKAO, S. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with Japanese sugarcane cultivar. **Soil Science & Plant Nutrition**, vol.46, 759-765, 2000.
- ANTINARELLI, L. M. R.; PINTO, N. C.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial activity of some brazilian plants with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 87, 733-742, 2015.

- BACCHI, O. O. S. Botânica da cana-de-açúcar. In: **ORLANDO FILHO, J. Coord Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 25-37, 1983.**
- BAINTON, N. J.; STEAD, P.; CHHABRA, S. R.; BYCROFT, B. W.; SALMOND, G. P.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. N. *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. **Biochemical Journal**, vol. 288, 997-1004, 1992.
- BALBOA, J. G.; LIM, C. Y. S. Effect of some medicinal plants on skin tumor promotion. **Phillipine Journal of Science**, vol. 124, 203-207, 1995.
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): A questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, vol. 26, 647-656, 1997.
- BENINGER, C. W.; ABOU-ZAID, M. M. Flavonol glycosides from four pine species that inhibit early instar gypsy moth development. **Biochemical, Systematics and Ecology**, vol. 25, 505-512, 1997.
- BERENBAUM, M. R. The chemistry of defense: theory and practice, 1-16. In: *Chemical Ecology: the chemistry of biotic interaction*. Washington: National Academy press, 1995.
- BLANCO, M. M.; COSTA, C. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, vol. 16, 265-270, 2007.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. **Plant Soil**, vol. 137, 111-117, 1991.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospect for improvement. **Plant Soil**, vol. 174, 195-209, 1995a.
- BUENAVENTURA, C. G.; ROSÁRIO, E. L. Effects of some chemical treatment on the tillering of sugarcane var. Phil. **Phylippine Journal of Crop Science**. Vol. 2, 115-120, 1978.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, vol. 25, 475-456, 2008.



- BRITO, A. M. G.; dos SANTOS, D.; RODRIGUES, S. A.; BRITO, R. G.; XAVIER-FILHO, L. Plants with anti-Leishmania activity: Integrate review from 2000 to 2011. **Pharmacological Reviews**, vol. 7, 34-41, 2013.
- CAI, H.; HUDSON, E. A.; MANN, P.; VERSCHOYLE, R. D.; GREAVES, P.; MANSON, M. M.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent triclinic in human-derived breast cancer cells *in vitro* and in nude mice *in vivo*. *British Journal of Cancer*, vol. 91, 1364-1371, 2004.
- CAI, H.; STEWARD, W. P. & GESCHER, A. J. Determination of the putative cancer chemopreventive flavone triclinic in plasma and tissues of mice by HPLC with UV-visible detection. **Biomedical Chromatography**, vol. 19, 518-522. 2005.
- CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOSO JÚNIOR, E. L. Plantas medicinais e alimentícias. Olinda: **Centro Nordestino de Medicina Popular**; Universidade Federal Rural de Pernambuco, vol.1, 45-47, 1996.
- CARVALHO, C. M.; COSTA, C. P. M.; SOUSA, J. S.; SILVA, R. H. D.; CYNTHIA, L. O.; PAIXÃO, F. J. R. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 5, 100-105, 2005.
- CASTRO, P. R. C.; SANGUINO, A.; VILELA, E.; SUDO, S.; MASUDA, Y. Ação de reguladores de crescimento no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar tratada termicamente. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro. Vol. 5, 350-358, 1975a.
- CASTRO-ORTÍZ, R.; TRUJILLO-MARTÍNEZ, M.; BUCIO-LÓPEZ, N. N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, vol. 31, 1497-1509, 2008.
- CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. Flavonoids: prospective drugs candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Vol 8, 1429-1440, 2008.
- CHANG, C. L.; WANG, G. I.; ZHANG, L. J.; TSAI, W. J.; CHEN, R. Y.; WU, Y. C. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quíquesettnerivus*. **Phytochemistry**, vol. 71, 271-279, 2010.
- CHHABRA, S. R.; STEAD, P.; BAINTON, N. J.; SALMOND, G. P.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P.; BYCROFT, B. W. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in

*Erwinia carotovora* by analogues of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. The Journal of Antibiotics. Vol. 46, 441-454, 1993.

CHERNG, J. M.; SHIEH, D. E.; CHIANG, W.; CHANG, M. Y. and CHIANG, L. C. Chemoprotective effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. Bioscience, **Biothecnology and Biochemistry**, vol. 71, 1500-1504, 2007.

CHOPRA, R. N.; NAYAR, S. L.; CHOPRA, I. C. Glossary of Indian medicinal plants. CSIR, New Delhi, 1-259, 1956.

CHUN, O. K. KIM, DAE-OK; SMITH, N.; SCHROEDER, D.; HAN, J. T. ANDLEE, C. Y. Daily consumption of phenolic and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 85, 1715-1724, 2005.

CHUNG, ILL-MIN; HAHN, SANG-JOON; AHAMAD, A. Confirmation of potential herbicidal agents in hulls of rice, *Oryza sativa*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 31, 1339-1352, 2005.

CLAYTON, W. D. & RENVOISE, S. A. Genera graminium: grasses of the world, Royal Botanic Gardens, 389, 1986.

COLOMBO, R.; YARINWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, vol. 1082, 51-59, 2005.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of futher flavones C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, vol. 17, 337-343, 2006

COLOMBO, R.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography**, vol. 1103, 118-124, 2006.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, Cana-de-açúcar, 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_08\\_09\\_39\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso: Dezembro, 2015.

- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, vol. 15, 183-205, 2001.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Contribuição dos produtos naturais como fontes de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório de nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, vol. 2, 47-58, 2010.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, vol. 1, 241-256, 2009.
- CROFT, S. L. and OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 17, 1478-1483, 2011.
- DAHMEN, P.; PORTZ, D.; KLAUS, T.; JEAN-PIERRE, V. **Acyl-homoserine lactone derivatives for improving plant yield**. WO 2013/034621 A1, 2013.
- DELATORRE, C. A.; SILVA, A. A. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 31, 58-67, 2008.
- de ALMEIDA, M.; ROCHELLE, L. A.; CROCOMO, O. J. Chave analítica para a determinação de dez variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Scientia Agricola*, vol. 52, 16-19, 1995.
- de BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. P.; HEIZMANN, B. M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 26, 652-662, 2007.
- DEMATOUSCHEK, B. V.; SATHLBISKUP, E. Phytochemical analysis of non volatile compounds from *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (Poaceae). **Pharmaceutica Acta Helveticae**, vol. 66, 242-245, 1991.
- D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. Toxic substances in crop plants. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 323, 1991.
- DAHMEN, P.; PORTZ, D.; KLAUS, T.; JEAN-PIERRE, V. **Acyl-homoserine lactone derivatives for improving plant yield**. WO 2013/034621 A1, 2013.
- DESHMANE, S. S.; DEV, S. Higher isoprenoids-II: Triterpenoids and steroids from *Saccharum officinarum* Linn. **Tetrahedron**, vol. 27, 1109-1118, 1971.
- DICKE, M.; SABELIS, W. M.; *Functional Ecology*, vol. 2, 131-139, 1988.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SALATINO, A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. **Food Chemistry**, vol. 125, 660-664, 2011.
- DURAN, N.; CONTI, R. D. E.; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: State of art. **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, vol. 45, 109-121, 2000.
- EBERHARD, A.; BURLINGAME, A. L.; EBERHARD, C.; KENYON, G. L.; NEALSON, K. H. OPPENHEMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase, **Biochemistry**, vol. 20, 2444-2449, 1981.
- EISNER, T.; MEINWALD, J. Preface *In: Chemical Ecology: the chemistry of biotic interaction*. Washington: National Academy Press, 1995.
- EJOBA, R.; UTU-BAKU, B. A.; UKPANUKPONG, R. U.; UGWU, M. N.; EKPO, B. O.; DOSOFUNJO, K.; PEKENE, D. J. B.; ABONG, A. A. The quantitative phytochemical constituents of *Saccharum barberi* power extracts. **Australian Journal of Basic and applied Sciences**, vol. 7, 863-867, 2013
- EL FATTAH, M.; EL ZAHWEY, A.; HARIDY, I. M.; EL DEEB, S. A. Effect of drying on the physicochemical properties and composition of lemon grass oil. **Menofilia Journal of Agricultural Research**, vol. 17, 1211-1230, 1992.
- EISNER, T.; MEINWALD, J. Preface *In: Chemical Ecology: the chemistry of biotic interaction*. Washington: National Academy Press, 1995.
- FAST, W. Molecular radio jamming: autoinducer analogs. **Chemical Biology**, vol. 10, 1-3, 2003.
- FEDERLE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **The Journal of Chemical Investigation**, vol. 112, 1291-1298, 2003.
- FENG, S.; LUO, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; LU, B. Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, vol. 151, 452-458, 2014.
- FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRODA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLAT, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, vol. 148, 483-487, 2000.
- FUQUA, W. C.; WINAMS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, vol. 176, 269-275, 1994.

- GALLOTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatória*, Mart., Arecaceae). **Química Nova**, vol. 28, 610-613, 2005.
- GANTNER, S.; SCHIMID, M.; DURR, C.; SCHUHEGGER, R.; STEIDLE, A.; HUTZLER, P.; LANGEBARTELS, C.; EBERL, L.; HARTMANN, A.; DAZZO, F. B. In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. **FEMS in Microbiology and Ecology**. Vol 56, 188-194, 2006.
- GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 100, 43-45, 2005.
- GIMENO- GARCIA, E.; ABREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticide to rice farming soils. **Environmental Pollution**. Vol. 92, 19-25, 1996.
- GOTTLIEB, O. R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 6, 227-238, 1982.
- GOULART, M.; SANT'ANA A.; LIMA R.; CALVACANTE, S. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elleptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolanos A e B. **Química Nova**, vol. 16, 95-100. 1993.
- GRAY, K. M.; GAREY, J. R. The evaluation of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. **Microbiology**, vol. 147, 2379-2387, 2001.
- GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. B. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. **Phytochemistry**, vol. 37, 19-42, 1994.
- GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. B.; KIMMINS, E. M.; STEVENSON, F. C.; WIJAYAGUNASEKERA, H. N. P. Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. **Acta Horticulture**, vol. 381, 691-694, 1994.
- GREENFIEL, M. D. Communication in Lilliputian world, 3-8. *In: Signalers and Receivers – mechanisms and evaluation of arthropod communication*. New York: Oxford University Press, 2002.
- GUO, M. Z.; LI, X. S.; YU, H. R.; MEI, Z. C.; SHEN, X. F.; Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, vol. 23, 739-744, 2002.

HAKENBECK, R.; STOCK, J. B. Analysis of two component signal transduction regulation. **Methods in Enzymology**, vol. 273, 281-300, 1996.

HARBORNE, J. B. Flavonoids and evolution of the angiosperms. **Biochemical Systematic and Ecology**, vol. 5, 7-22, 1997.

HARIBAL, M.; RENWICK, J. A. A. Oviposition stimulants for the monarch butterfly: flavonol glycosides from *Asclepias curossavica*. **Phytochemistry**, vol. 41, 1339-144, 1996.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; HENSE, B. A.; SCHRÖDER, P. Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 5, 131, 2014.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, vol. 13, 894-901, 2008.

HAVSTEEN, B. Flavonoids: a classe of natural products of high pharmaceutical potency. **Biochemical Pharmacology**, vol. 32, 1141-1148, 1984.

HAKENBECK, R.; STOCK, J. B. Analysis of two component signal transduction regulation. **Methods in Enzymology**, vol. 273, 281-300, 1996.

HOODA, S. P. Trace Elements in soils. London: John Wiley, 2010.

HORNG, Y. T.; DENG, S. C.; DAYKIN, M.; SOO, P. C.; WEI, J. R.; LUH, K. T.; HO, S. W.; SWIFT, S.; LAI, H. C.; WILLIAMS, P. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. **Molecular Microbiology**, vol. 45, 1655-1671, 2002.

HU, Q. L. and DENG, Z. H. Protective effects of flavonoids from corn silk on oxidative stress induced by exhaustive exercise in mice. **African Journal of Biotechnology**, vol. 10, 3163-3167, 2011.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento e baixo custo. **Embrapa**. Vol. 325, 16-38, 2011.

INCA. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 2a ed.

Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129 p. Disponível em:<[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro\\_abc\\_2ed.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf)>. Acesso: Setembro 2015.

INCA. Inca e Ministerio da Saude apresentam estimativas de cancer para 2014.

Disponivelem:<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014)>.Acesso: Setembro 2015.

- JETEAU, F.; MASOTTI, V.; BESSIÈRE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, vol 73, 532-535, 2002.
- JOSEPH, C.; PHILLIPS, D. Metabolites from soil bacteria effect plant water relations. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 41, 189-192, 2003.
- JOINT, I.; TAIT, K.; CALLOW, M. E.; CALLOW, J. A.; MILTON, D.; WILLIAMS, P.; CAMARA, M. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science*. Vol. 298, 1207, 2002.
- KAMPA, M.; ALEXAKI, V. I.; NOTAS, G.; NIFLI, A. P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, vol. 6, 63-74, 2003.
- KHALID, M.; SIDDIQUI, H. H.; Pharmacognostical evaluation and qualitative analysis of *Saccharum spontaneum* (L.) root. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, vol. 3, 338-341, 2011.
- KUMAR, C. A. S.; VARADHARAJAN, R.; MUTHUMANI, P.; MEERA, R.; DEVI, P.; KAMESWARI, B. Pharmacognostic and preliminary phytochemical investigations on the stem of *Saccharum spontaneum*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, vol. 1, 129-136, 2009.
- LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A. C. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: **DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. de A. Cana-de-açúcar. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 101-156, 2010.**
- LAZAZZERA, B. A.; GROSSMAN, A. D. The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*, vol. 6, 288-294, 1998.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*, 2ª edição, Sarvier: São Paulo, 1995.
- LI, X.; YAO, S.; TU, B.; LI, X.; JIA, C.; SONG, H. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. **Journal of Separation Science**, vol. 33, 1216-1223, 2010.
- LITHGOW, J. K.; WILKINSON, A.; HARDMAN, A.; RODELAS, B.; WISNIEWSKI-DYE, F.; WILLIAMS, P.; DOWNIE, J. A.; The regulatory locus *cinrt* in *Rhizobium*

leguminosarum controls a network of quorum sensing. *Molecular Microbiology*, vol. 37, 81-97, 2000.

LIU, R. H. Potencial synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanisms of action. **The American Society for Nutritional Sciences**, vol. 134, 3479-3485, 2004.

LLOYD, B. H.; SIEBENMORGEN, T. J.; BEERS, K. W. Effect of commercial processing on antioxidants in rice bran. **Cereal Chemistry**, vol. 77, 551-555, 2000.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. Viçosa-MG: UFV, 2007.

LOYD, H. L.; NAIDOO, G.; Chemical array potentially suitable for determination of smut resistance of sugarcane cultivars. **Plant Disease**, vol.67, 1103-1105, 1983.

MA, T.; HUNG, C.; ZONG, G.; ZHA, D.; MENG, X; LI, J.; TANG, W. Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 63, 587-593, 2011.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Greenhouse gases emissions related to sugarcane ethanol. **Biomass and Bioenergy**. Vol. 32, 582-595, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 9<sup>o</sup> edição, 989, 2000.

MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. Vol. 9, 250-258, 2010.

MAILLARD, M. N.; BERSET, C. Evaluation of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, 1789-1793, 1995.

MANGELS, A. R.; HOLSEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **Journal of the American Dietetic Association**, vol. 93, 284-296, 1993.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. New York: Jhn Wiley and Sons, 1<sup>st</sup> edition, 1965.

MAKRIMOVIC, Z. and KOVACEVIC, N. Preliminary assay on the oxidative activity of Maydis stigma extract. **Fitoterapia**, vol. 74, 144-147, 2003.

MATIDA, A. K.; ROSSI, M. H.; BLUMENTHAL, E. E. A.; SCHUQUEL, I. T. A.; MALHEIROS, A.; VIDOTTI, G. J.3-O- $\beta$ -glucopyranosilsterol in species of Labitae,



Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais Associação Brasileira de Química**, vol. 45, 147-151, 1996.

MCGAW, L. J.; LALL, N.; HLOKWE, T. M.; MICHAEL, A. L.; MEYER, J. J.; ELOFF, J. N. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 31, 1429-1433, 2008.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIN, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evidence-based. Complementary and Alternative Medicine**. Doi:101155/2011/365359, 2011.

MINISTERIO DA SAUDE. *Manual de bases técnicas da oncologia SIA/SUS -Sistema de informações ambulatoriais*. 15a ed. Brasília: Ministerio daSaude, 2013. 119 p. Disponível

em:<[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manual\\_oncologia\\_15\\_edicao\\_06\\_09\\_2013.p](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manual_oncologia_15_edicao_06_09_2013.p)>Acesso: Setembro 2015.

MINISTERIO DA SAUDE; INCA. Estimativa 2014 - Incidencia de Cancer noBrasil. 2014. Disponível em:

<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014\\_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226)>. Acesso: Setembro 2015.

MIRA, N. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFERMARQUEZ, U. M. Extraction, analysis and distribution of phenolic acids in pigmented and non-pigmented genotypes of rice (*Oriza sativa L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28, 994-1002, 2008.

MIRANDA, M. L. D.; SOUZA, A.F.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, R. F.; GARCEZ, S. W. S. Constituintes Químicos das Folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). **QuímicaNova**, vol 35, 1306-1311, 2012.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 46, 4769-4807, 2011.

MORGAN, D. Biosynthesis in insects: Advanced edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

MOHANLAL, S.; PARVATHY, R.; SHALINI, V.; HELEN, A.; JAYALESKMY, A. Isolation, characterization and quantification of tricin and flavonolignans in medicinal

rice Njavara (*Oriza sativa L.*) as compared to staple varieties. **Plant Foods for Human Nutrition**, vol 66, 91-96, 2011.

MOHSEN, N. et al. The Global burden of cancer 2013. **Journal of American Medical Association Oncology**, vol. 1, 505-527, 2015.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, vol. 83, 757-766, 1991.

MONTEIRO, J. A.; SCHUQUEL, I. T. A.; ALMEIDA, T. L.; SANTIN, S. M. O.; SILVA, C. C. SILVA; CHIAVELLI, L. U. R.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; NAKAMURA, C. V.; SCARIOT, D. B.; KAPLUM, V.; FARIA, R. T.; POMINI, A. M. Oncibauerins A e B, new flavones from *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Phytochemistry Letters**, vol. 9, 141-148, 2014.

MURILLO, J. I.; ENCARNACIÓN-DIMAYGA, R.; MALMSTRON, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRANZBLAU, S. G. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. **Fitoterapia**, vol. 74, 226-230, 2003.

NARASINGARAO, M.; VIDYARTHI, N. L. Chemical examination of the wax from sugarcane. **Journal Indian Chemistry Society**, vol. 16, 135-143, 1939.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of bacteriology**, vol. 104, 313-322, 1970.

NEWMAN, AD. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, vol. 75, 311-355, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the laste 25 years. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 461-477, 2007.

NIETO-PENALVER, C. G.; VERTINI, E.; FIGUEROA, L. I. C. Identification of N-acyl homoserine lactones produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultured in complex and synthetic media. **Archives Microbiology**. Vol. 194, 615-622, 2012.

- NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. I. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M.; Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 74, 418-425, 2001.
- NORDLUND, D. A., LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, Vol. 2, 211-220, 1976.
- OHMOTO, T. and IKUSE, M. Triterpenoids of the Gramineae. **Phytochemistry**, vol.9, 2137-2148, 1970.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 69, 277-284, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer Fact Sheet nº 297 (revised in January 2013), 2013a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso: agosto 2015.
- OKUNADE, A. L.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Natural antimicrobial metabolites: Current status. **Phytochemistry**, vol. 65, 1017-1032, 2004.
- OYAMA, T.; YASSÚÍ, Y.; SUGIE, S.; KOKETSU, M.; WATANABE, K.; TANAKA, T. Dietary tricin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in mice Crj:CD-1 mice. **Cancer Prevention Research (Phila)**, vol. 2, 1031-1038, 2009.
- PALMER, A. G.; SENECHAL, A. C.; MUKHERJEE, A.; ANÉ, J.M.; BLACKWELL, H.E. Plant responses to bacterial N-Acyl L-homoserine lactones are dependent on enzymatic degradation to L-homoserine. **ACS Chemical Biology**, vol. 9, 1834-1845, 2014
- PALLAVI, R.; ELAKKIYA, S.; TENNETY, S. S. R.; DEVI, P. S. Anthocyanin analysis and its anticancer property from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) pee. **International Journal of pharmaceutical Chemistry Research**, vol. 2, 338-345, 2012.
- PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings National Academy Science**, vol. 97, 8789-8793, 2000.
- PAULA, M. O.; TINÔCO, I. F. F.; RODRIGUES, C. S.; SILVA, E. N.; SOUZA, C. F. Potencial de cinza do bagaço de cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia agrícola e ambiental**. Vol. 13, 353-357, 2009.

- PEARSON, J. P.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKEI, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **Journal of Bacteriology**, vol.181, 1203-1210, 1995.
- PENN, D. J. Chemical communication: five major challenges in the post-genomic age, 9-18. *In: Chemical Ecology from gene to ecosystem*. Dordrecht: Springer, 2006.
- PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J. D.; SPORN, M. B. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduced human cancer rates?. **Nature**, vol. 290, 201-208, 1981.
- PICMAN, A. K.; SCHNEIDER, E. F.; PICMAN, J. Effect of flavonoids on mycelia growth of *Verticillium albo-atrum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 23, 683-693, 1995.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, vol. 25, 45-61, 2002.
- POMINI, A. M.; ARAÚJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal of Chemical and Ecology**. Vol. 32, 1769-1778, 2006.
- POMINI, A. M.; CRUZ, P. L. R.; GAI, C.; ARAÚJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Long-chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: Synthesis and absolute configurations. **Journal of Natural Product**. Vol. 72, 2125-2129, 2009.
- POMINI, A. M.; MANFIO, G. P.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* R. IBSBF 453T, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, 6262-6265, 2005.
- POMINI, A. M., MEIRELLES-PACCOLA, L. D.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. Isolated from the maize white spot foliar disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 1200-1204, 2007.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAINCH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 53, 4290-4302, 2005.
- RAD, U. V.; KLEIN, I.; KOTTOVA, J.; ZAZIMALOVA, E.; FEKETE, A.; HARTMANN, A.; KOPPLIN-SCHIMITT, P.; DURNER, J. Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. **Planta**, vol. 229, 73-85, 2008.

- READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **Fems Microbiology**, vol 254, 1-11, 2006.
- RIBEIRO, R. A.; de BARROS, F.; de MELO, M. M.; MUNIZ, C.; CHIEIA, S.; WANDERLEY, M. D.; GOMEZ, C.; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by medicinal plants used in the state of San Paulo, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 24, 19-29, 1988.
- RUCIANI, L. Glycolic acid peel. **Journal of European Academy of Dermatology and Venerology**, vol. 9, 12-13, 1997.
- RUSSELL, G. B.; CONNOR, H. E.; PURDIET, A. W. Triterpene methyl ethers of *Chionochloa* (Gramineae). **Phytochemistry**, vol. 15, 1933-1935, 1976.
- SAJJADI, S. E.; SHOKOOHINIA, Y.; MOAYEDI, NARJESS-SADAT. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima* Mozaffi. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, vol. 7, 159-162.2012.
- SANTIN, M. R.; dos SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; FERREIRA, I. C. P.; NAKAMURA, T. U. *In vitro* activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, 105, 1489-1496, 2009.
- SANTOS, W. C.; da SILVA, F. C.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F. Os novos fármacos aprovados em 2014 pelo Food Drug Administration: Análise do relatório de 2015. **Revista Virtual de Química**, vol. 7, 1535-1551, 2015.
- SAWADA, W. O.; NICOLUSSI, A. C.; OKINO, L.; CARDOZO, F. M. C.; ZAGO, M. M. F. Z. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, vol. 43, 581-587, 2009.
- SCHUEGGER, R.; IHRING, A.; GANTNER, S.; BAHNWEG, G.; KNAPPE C.; VOGG, G.; HUTZLER, P.; SCHIMID, M.; VAN BREUSEGEM, F.; EBERL, L.; HARTMANN, A.; LANGEBARLS, C. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. **Plant, Cell and Environment**, vol. 29, 909-918, 2006.
- SCOTT, K. N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. **Journal of the American of Chemical Society**, vol. 94, 8564-8568, 1972.
- SEBAIHIA, M. S.; JONES, M. S. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. **Microbiology**, vol. 141, 541-550, 1995.

- SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba, 415, 2006.**
- SETTA, N.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; METCALFE, C. J.; CRUZ, G. M. Q.; DEL BEM, L. E.; VICENTINI, R.; NOGUEIRA, F. T. S.; CAMPOS, R. A.; NUNES, S. L. AND 26 MORE. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics**. Vol. 15, 1-17, 2014.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, Editora da UFSC, Santa Catarina, 2004.
- SHOEMAKER, R.H. The NCI 60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, vol. 6, 813-823, 2006.
- SINGH, B. and SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, 30, 3834-3842, 2012.
- SOLIHAN, M. A.; WANROSLI, W. I.; NURHAMAN, A. R. Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysia *Zea mays* hair extracts. **Internacional Food Research Journal**, vol. 19, 1533-1538, 2012.
- SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A. L.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanisms and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, vol. 579, 200-213, 2005.
- SILVA, A. M. S.; ALKORTA, I.; ELGUERRO, J.; SILVA, V. L. M. A <sup>13</sup>C NMR study of the structure of four cinammic acids and their methyl esters. **Journal of Molecular structure**, vol. 595, 1-6. 2001.
- SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, Fortaleza: **UFC/Laboratório de Produtos Naturais**, 207-213, 1991.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 82, 1107-1112, 1990.
- TABET, N.; BIRKS, J.; GRIMLEY, E. Vitamina E para la enfermedad de Alzheimer (Revision Cochrane traducida). **La Biblioteca Cochrane Plus**, 4º edição, 2008.

TAHRAOUI, A.; EL HILALY, J.; ISRAILI, Z. H. and LYOUSSI, B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in South-eastern Morocco (Errachidia province). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 110, 105-117, 2007.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, vol. 71, 1387, 2007.

TEMPONE, A. G.; de OLIVEIRA, C. M. and BERLINCK, R. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Médica**, 77, 572-585, 2011.

TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J. B.; BAUER, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular-Microbe Interactions*. Vol. 13, 637-648, 2000.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, M. C.; VERPOORTE, R.; FILHO, R. B. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, vol. 29, 415-418, 2006.

TRIGO, J. R.; BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.; MARSAIOLI, A. J. Ecologia Química. **Chemkeys**, 1-9, 2000.

VANDRESEN, F.; FALZIROLLI, H.; BATISTA, S. A. A.; GIARDINI-SILVA, A. P. B.; OLIVEIRA, D. N.; CATHARINO, R. R.; RUIZ, A. L. T.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A.; SILVA, C. C. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbozones and their antitumor activity against human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 79, 110-116, 2014.

VERSCHOYLE, R. D.; GREAVES, P.; CAI, H.; BORKHARDT, B. M.; D'INCALCI, M.; RICCIO, E. Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricetin, a naturally occurring flavone. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, vol. 57, 1-6, 2006.

VIAL, L.; CUNY, C.; GLUCHOFF-FIASSON, K.; COMTE, G.; OGER, P. M.; FAURE, D.; DESSAUX, Y.; BALLY, R.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. **FEMS Microbiology and Ecology**. vol. 58, 155-68, 2006.

VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 70, 323-327, 2000.

- VIDAL, R. A.; BAUMAN T. T. Fate of allelochemicals in the soil. **Ciência Rural**, vol. 27, 351-357, 1997.
- VEIGAS, C. JR. E BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, vol.29, 326-337, 2006.
- VILA, F. C.; COLOMBO, R.; LIRA, T. O.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 19, 903-908, 2008.
- ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 63, 570-577, 2013.
- ZHOU, J.; IBRAHIM, R. K. Tricin a potential multifungal nutraceutical. **Phytochemistry Reviews**, vol. 9, 413-424, 2010.
- WAGNER, V.E.; FRELINGER, J.G.; BARTH, R.K.; IGLEWSKI, B.H. Quorum sensing: Dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. **Trends in Microbiology**, vol. 14, 55-58, 2006.
- WANG, J.; QUAN, C.; WANG, X.; ZHAO, P.; FAN, S. Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *Microbial and Biotechnology*. Vol. 4, 479–490, 2011.
- WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Boston. Blackwell, 238, 1994.
- WEI, H.; TYE, L.; BRESNICK, E.; BIRT, D. F. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoids on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. **Cancer Research**, vol. 50, 499-502, 1990.
- WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; SMITH, P. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. **Phytochemistry**, vol. 13, 1141–1149, 1974.
- WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 25, 365-404, 2001.
- WHO. Leishmaniasis. Who-World Health Organization. Report N° 340, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> [consultado em 20 de maio, 2015].
- YU, H. B.; ZHANG, H. F.; LI, D. Y; ZHANG, X.; XUE, H. Z.; ZHAO, S. H.; Matrine inhibits matrine metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular

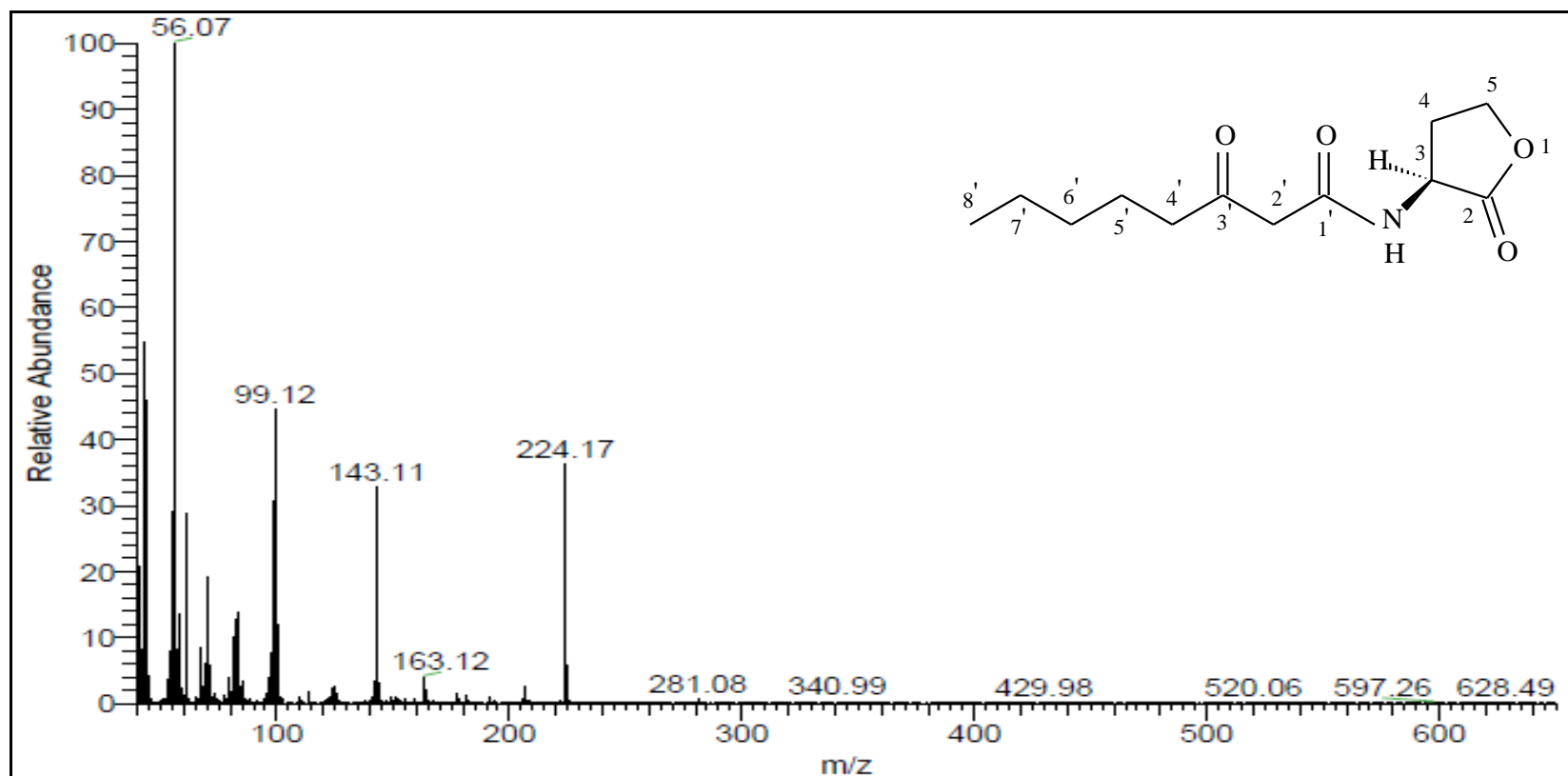


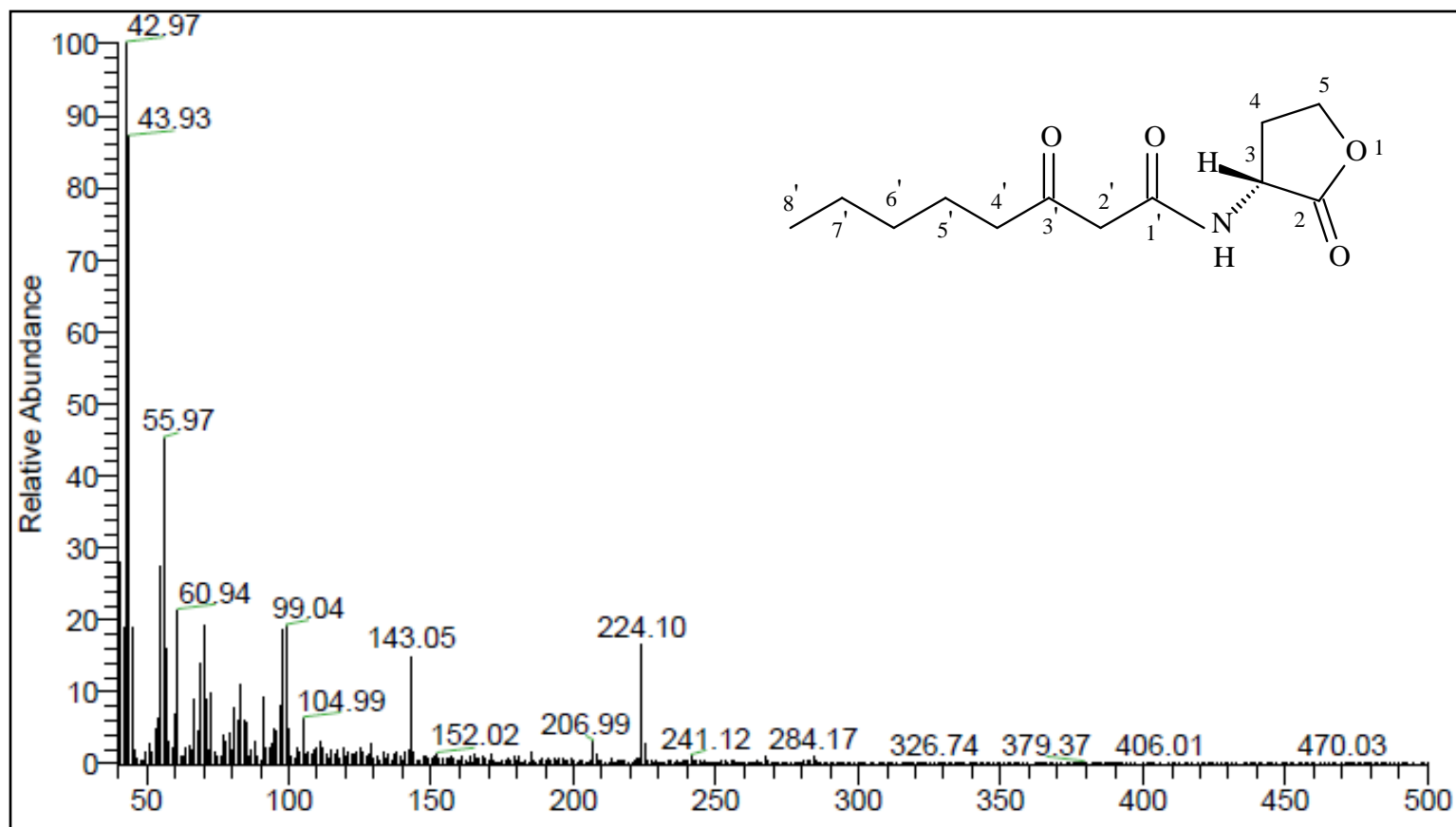
carcinoma cells. **Journal of Asian of Natural Products Research**, vol. 13, 242-250, 2011.

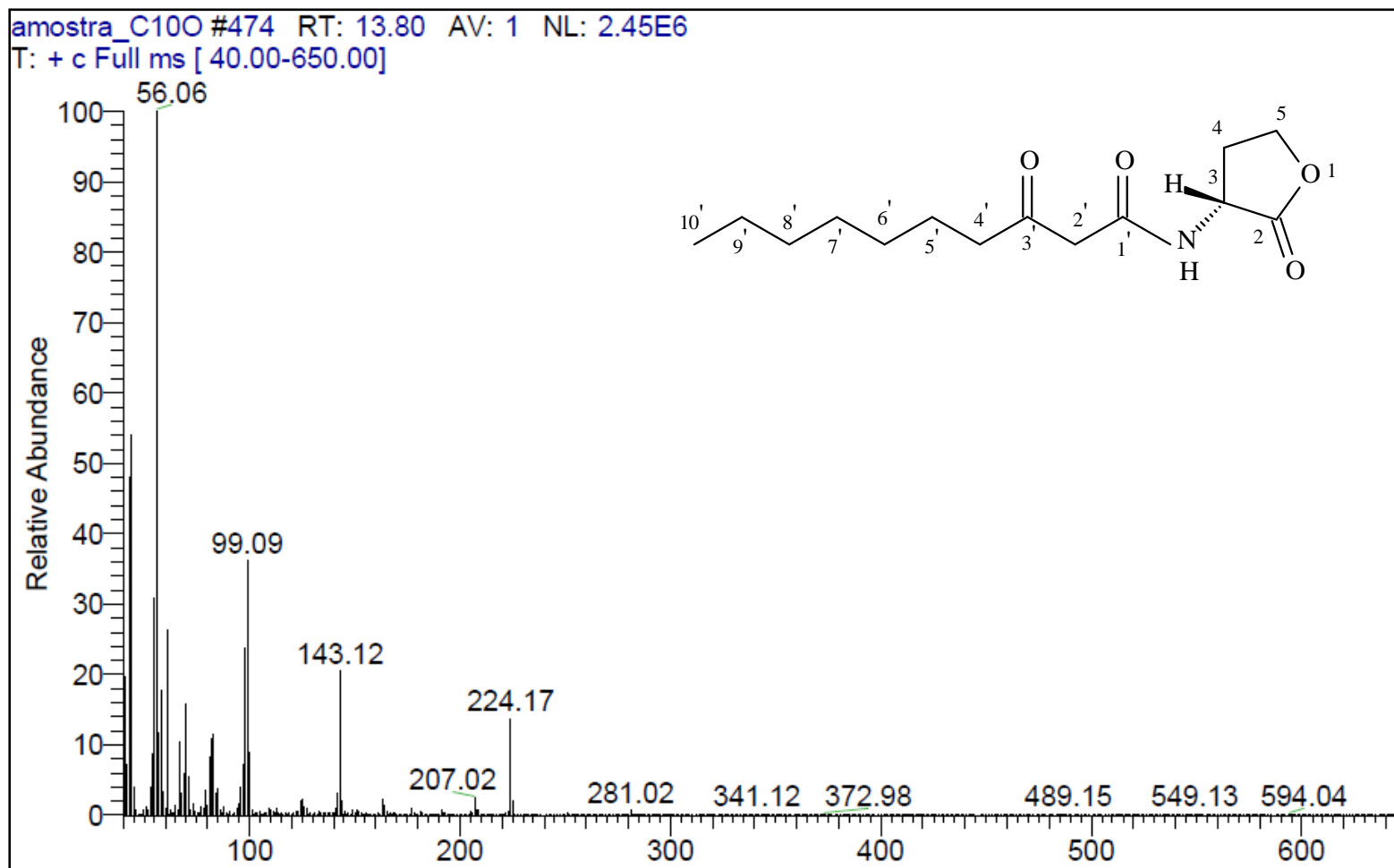
YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Química de produtos naturais. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 11-30, 2012.

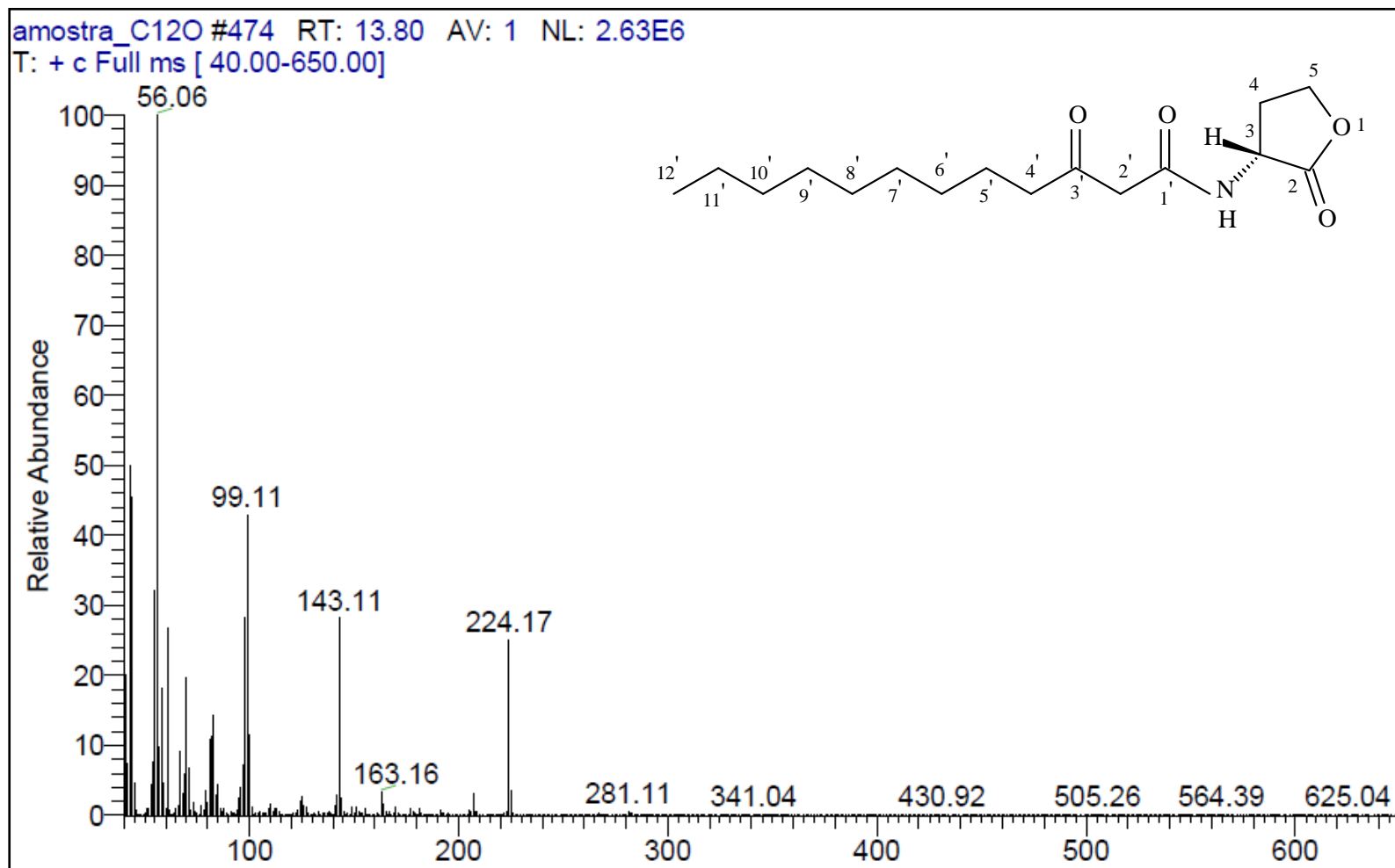
YU, Y.; GAO, H.; TANG, Z.; SONG, X.; WU, L. Several phenolic acids from the fruit of *Capparis spinosa*. **Asian Journal of Tradicional Medicines**, vol. 1, 1-4, 2006.

## **9 ANEXOS**

**Figura 20:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **1a**

**Figura 21:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **2a**

**Figura 22:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **3a**

**Figura 23:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **4a**

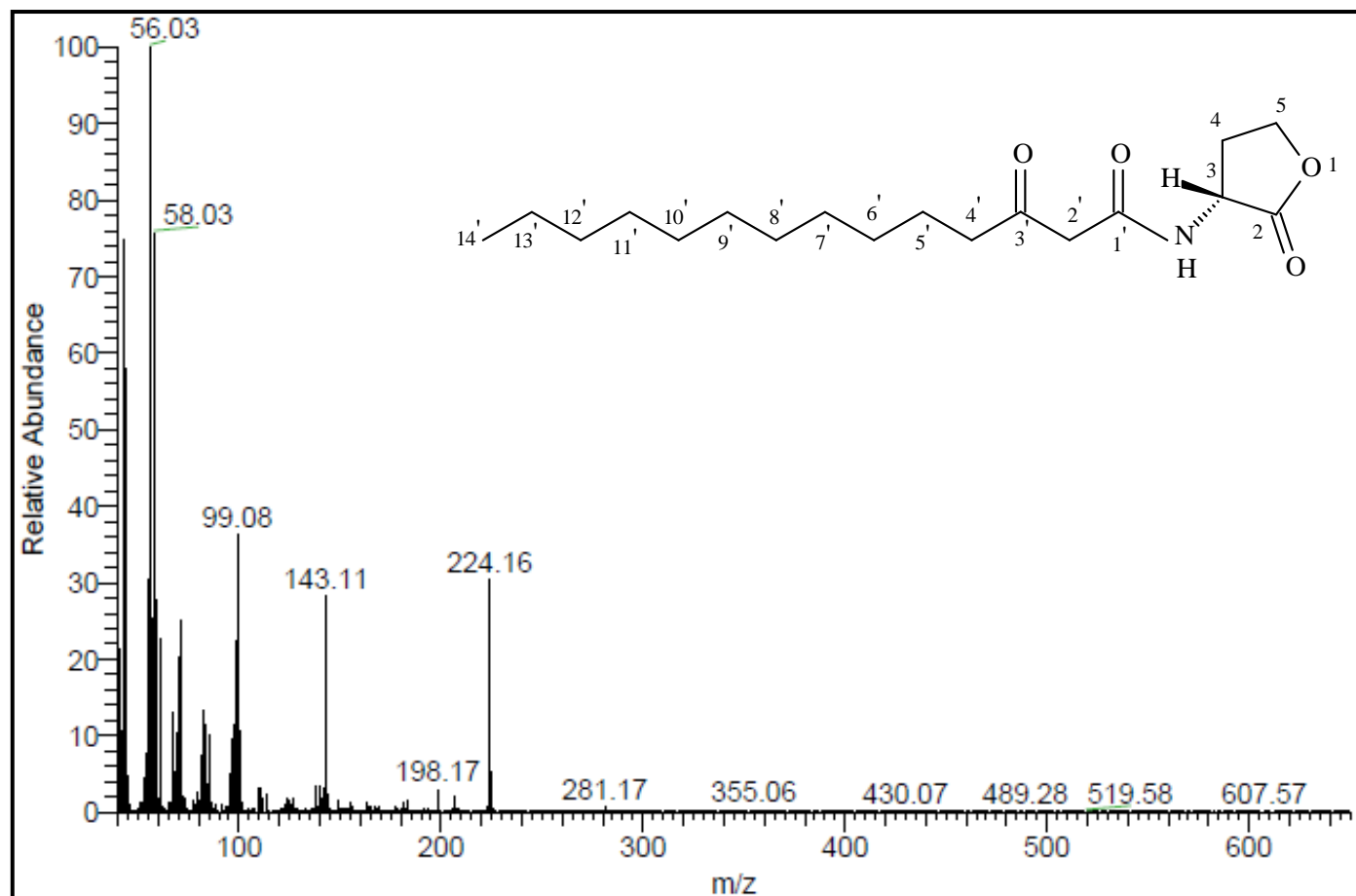
**Figura 24:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **5a**

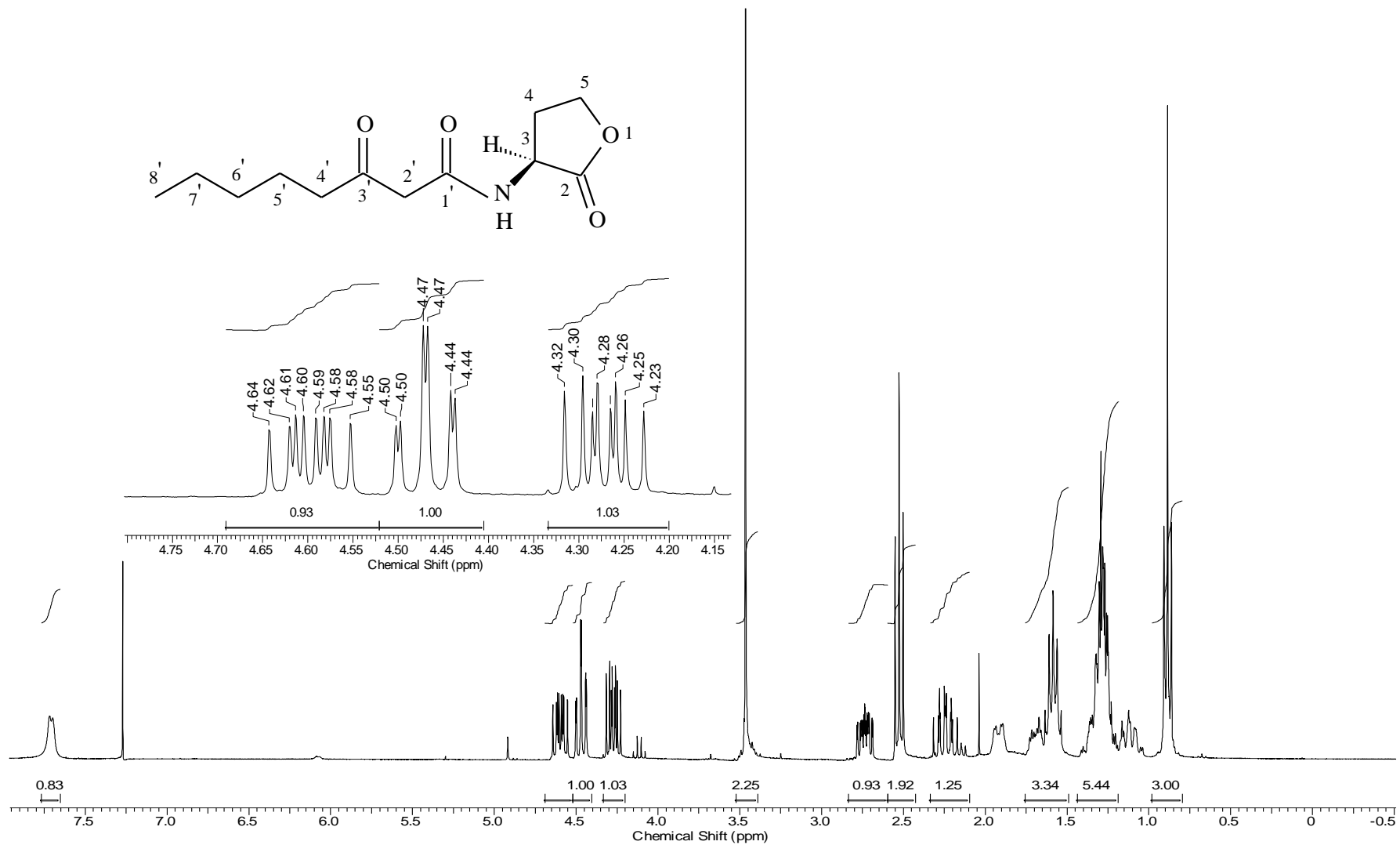
Figura 31: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **1a**



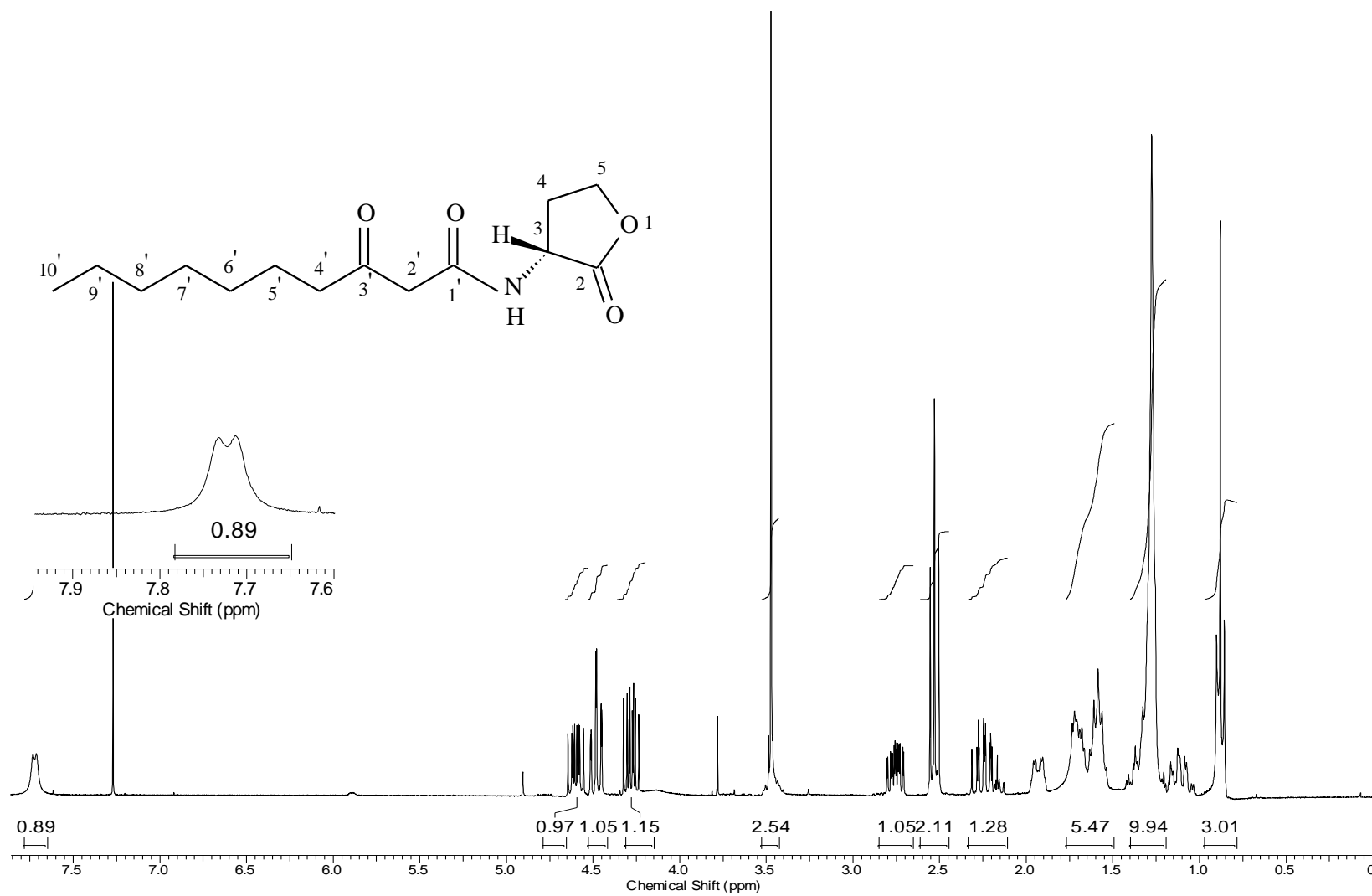
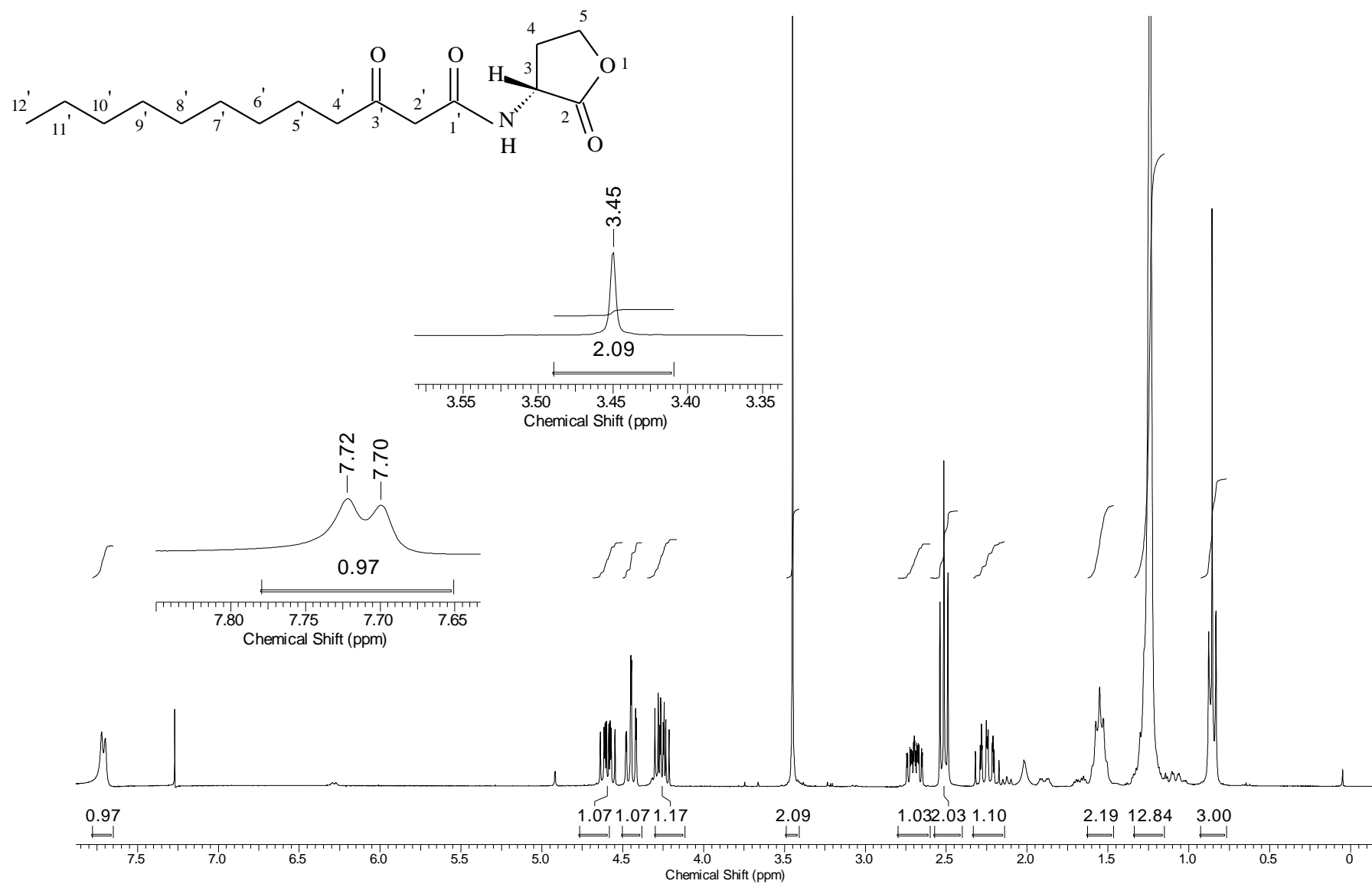
Figura 32: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **3a**

Figura 33: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **4a**

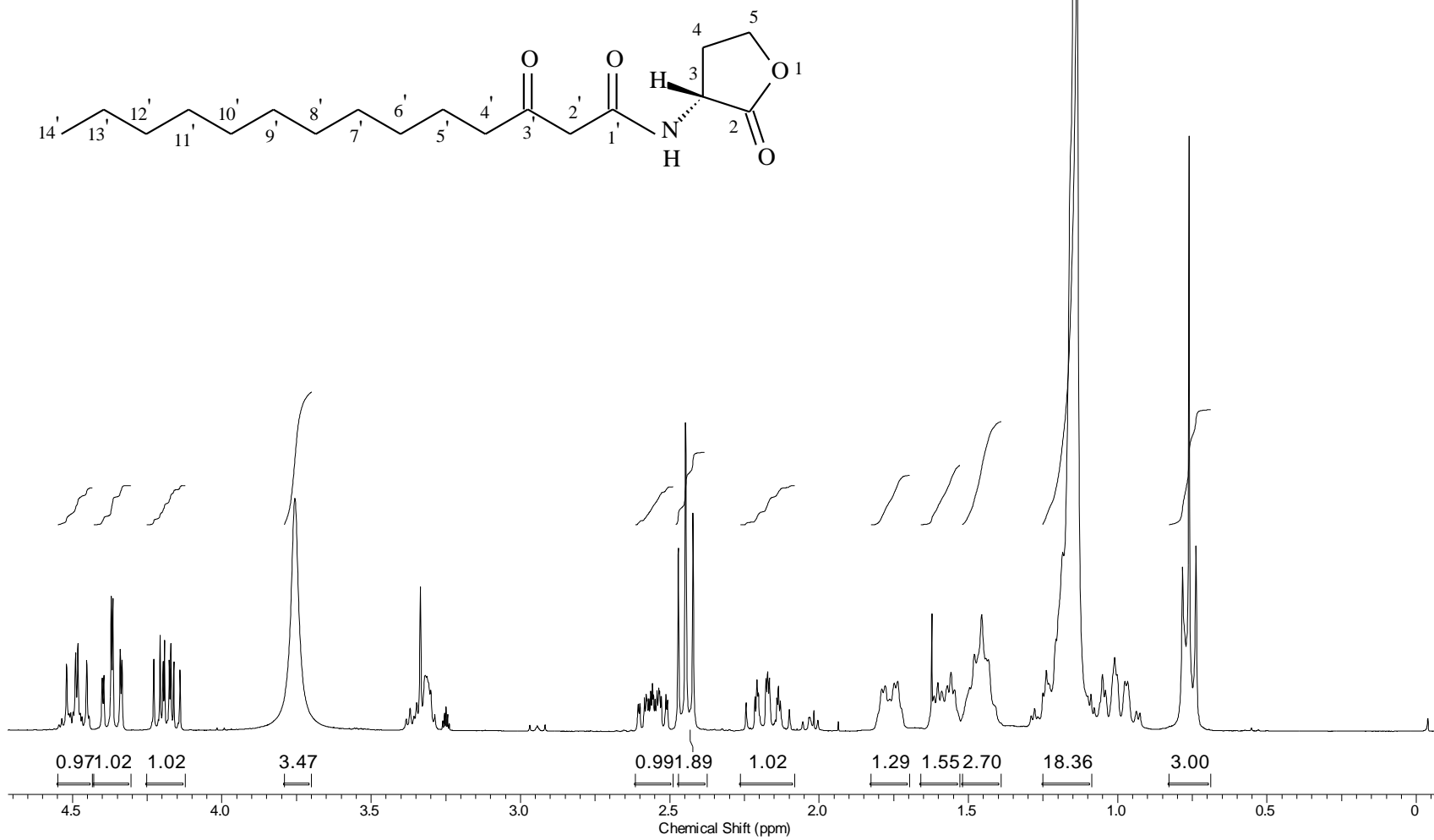
**Figura 34:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **5a**

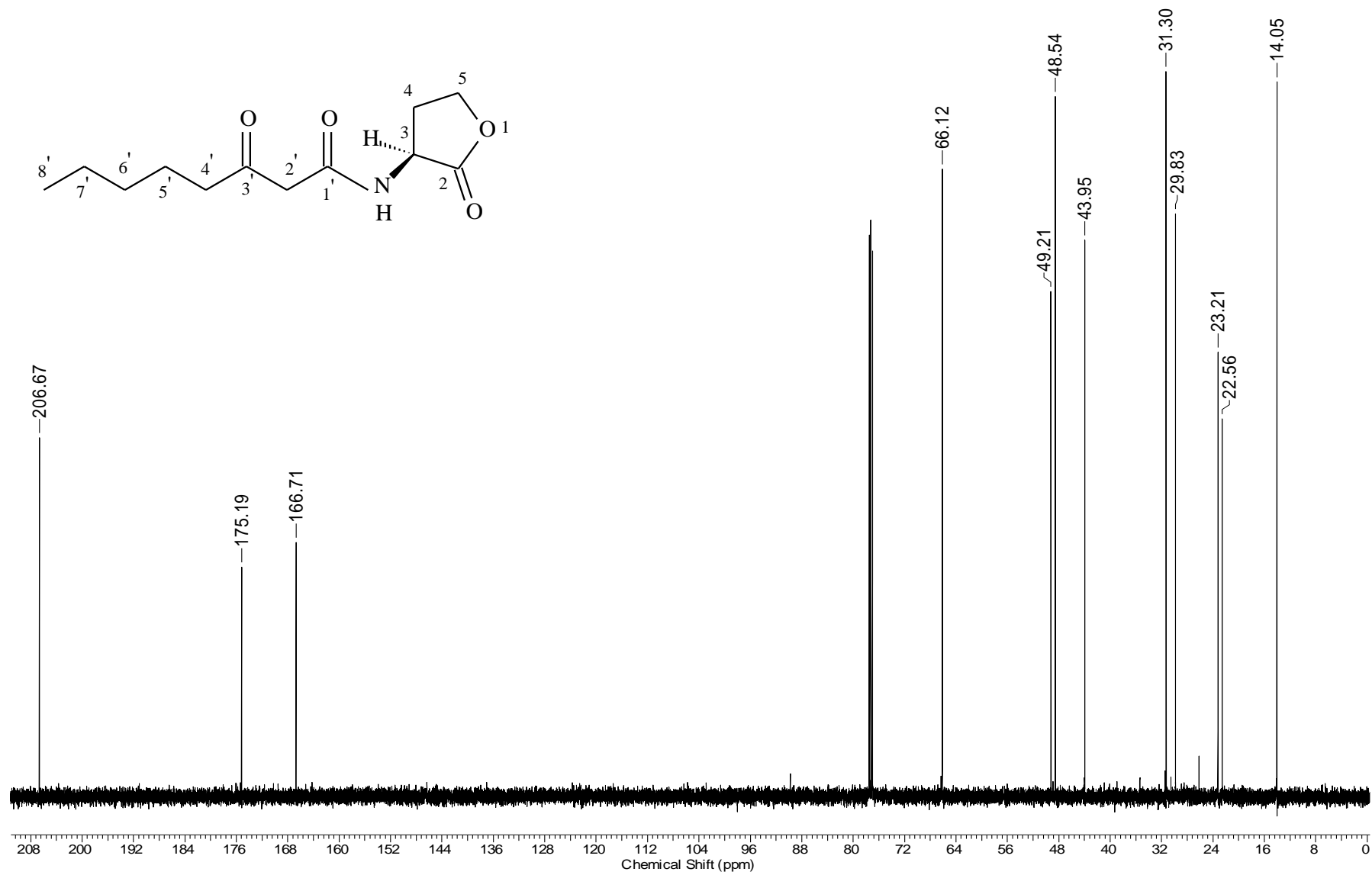
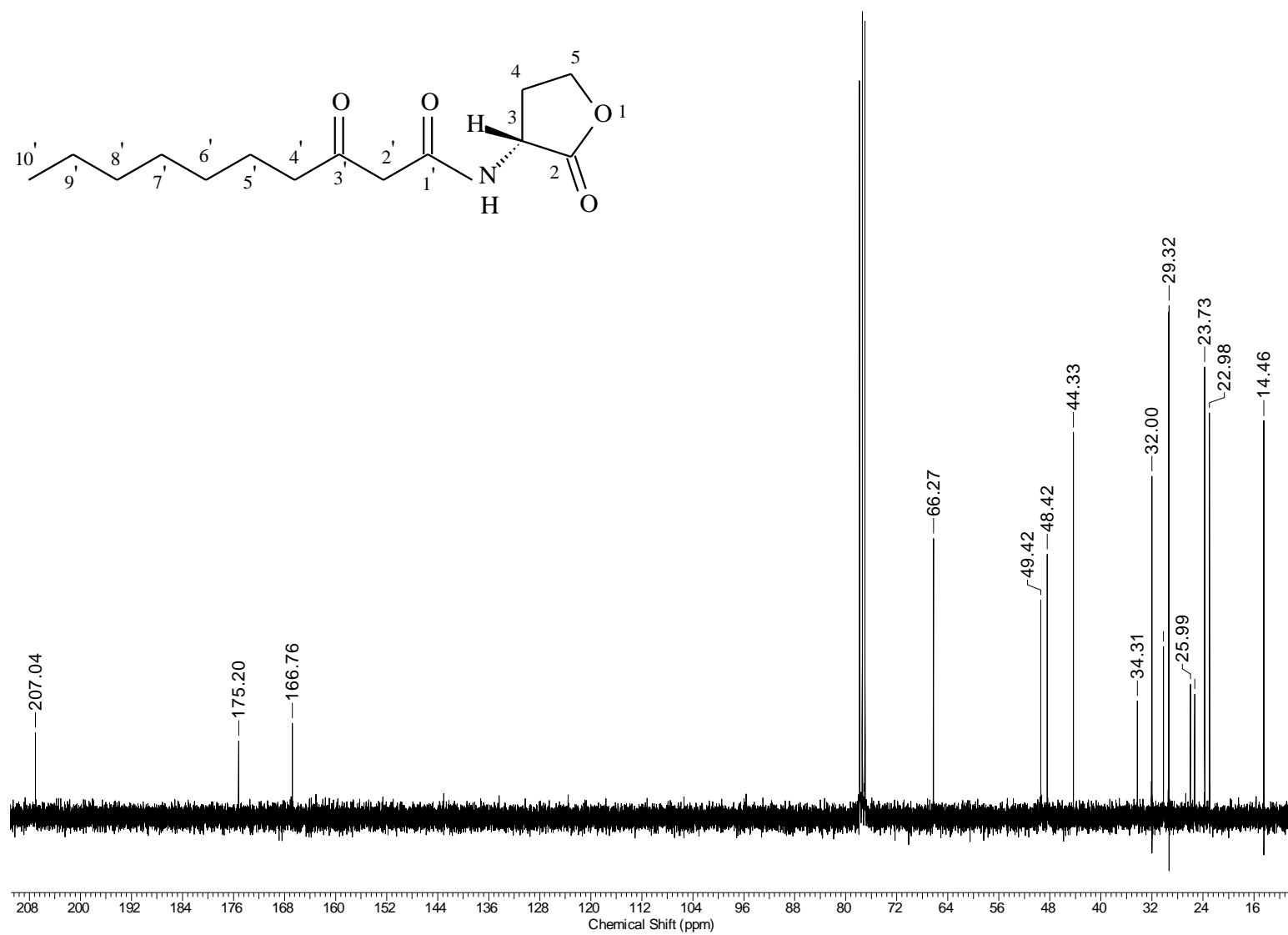
Figura 35: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125,5 MHz) de **1a**

Figura 36: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **3a**

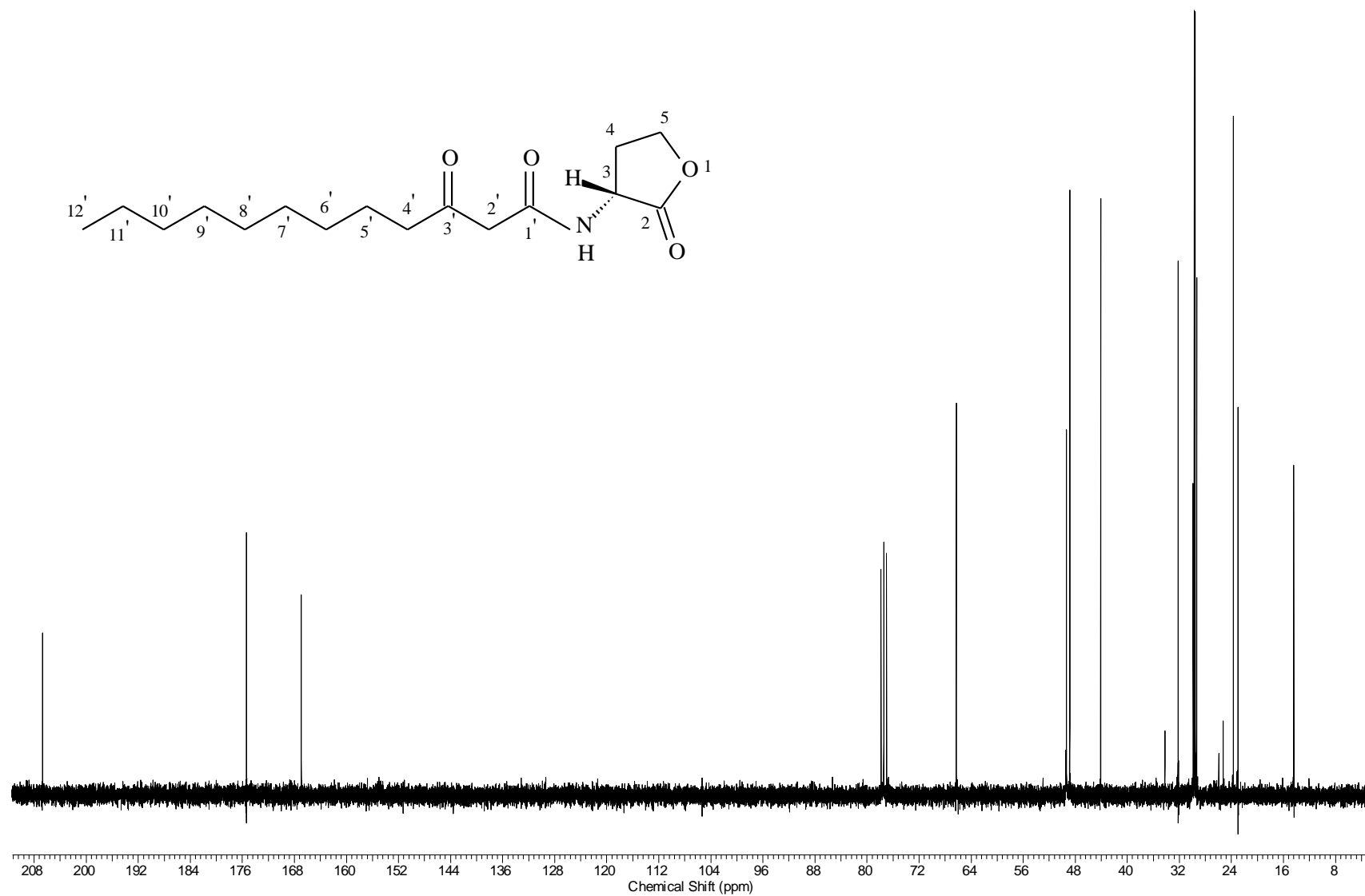
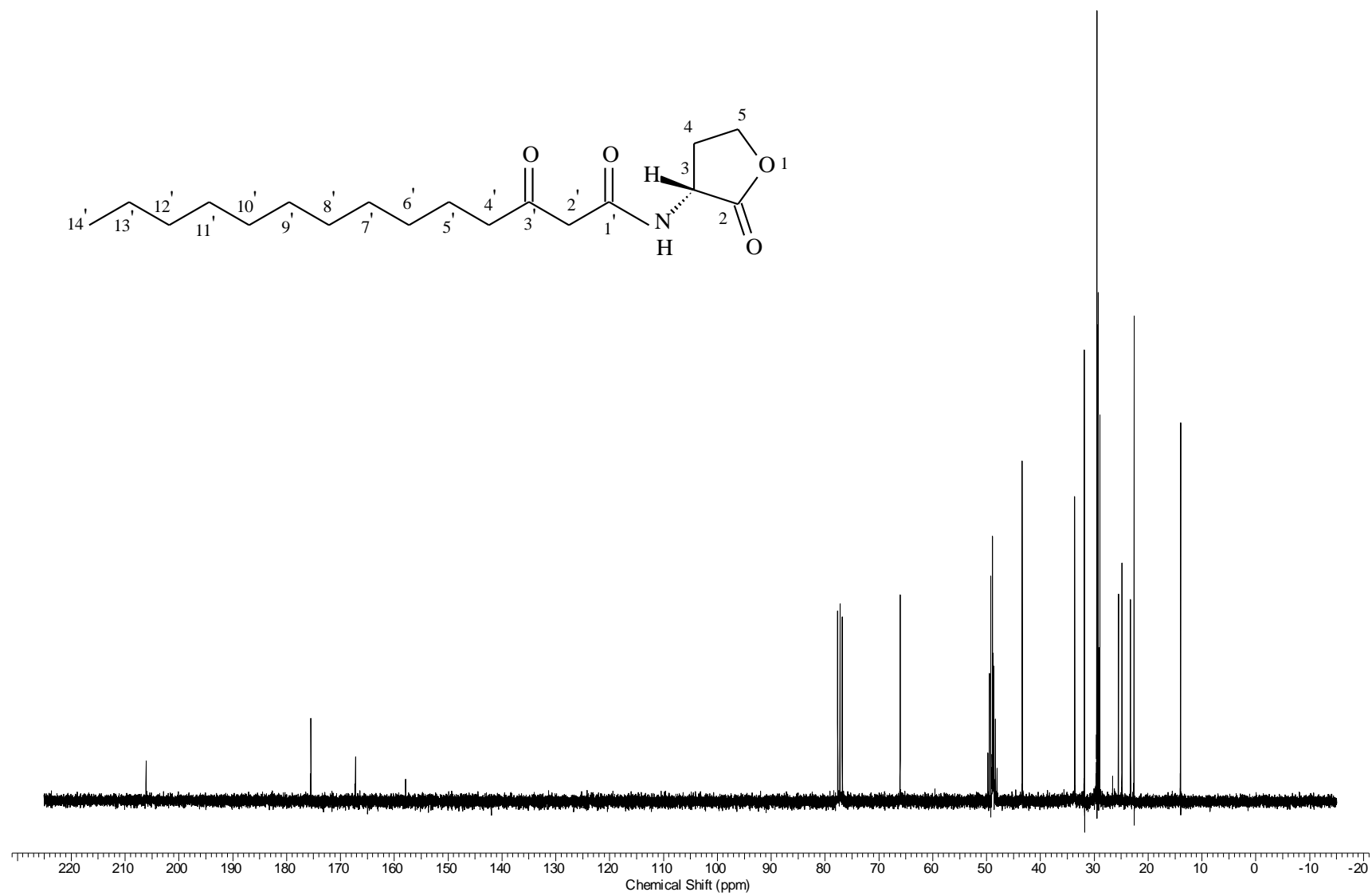
**Figura 37:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **4a**

Figura 38: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,5 MHz) de **5a**

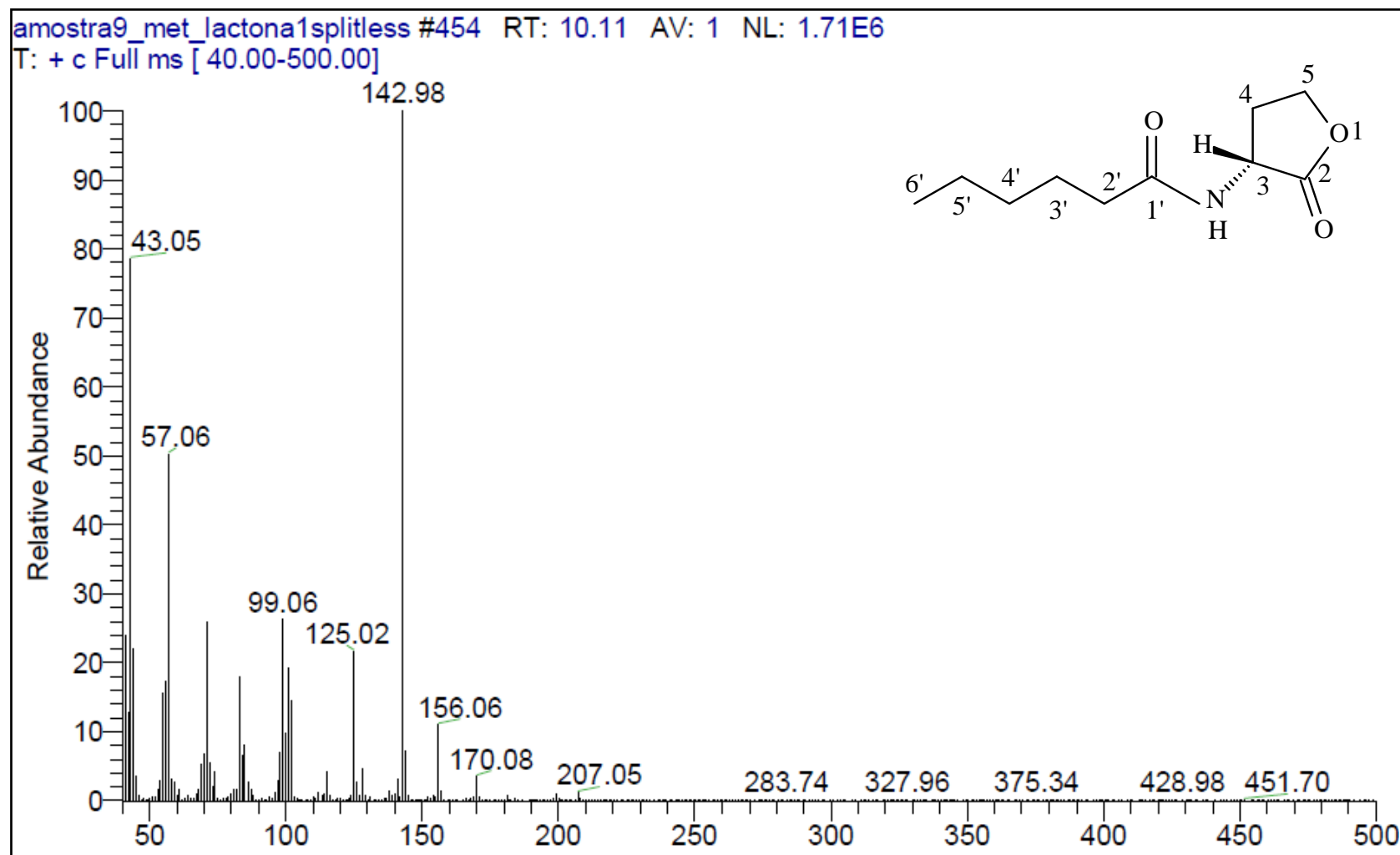
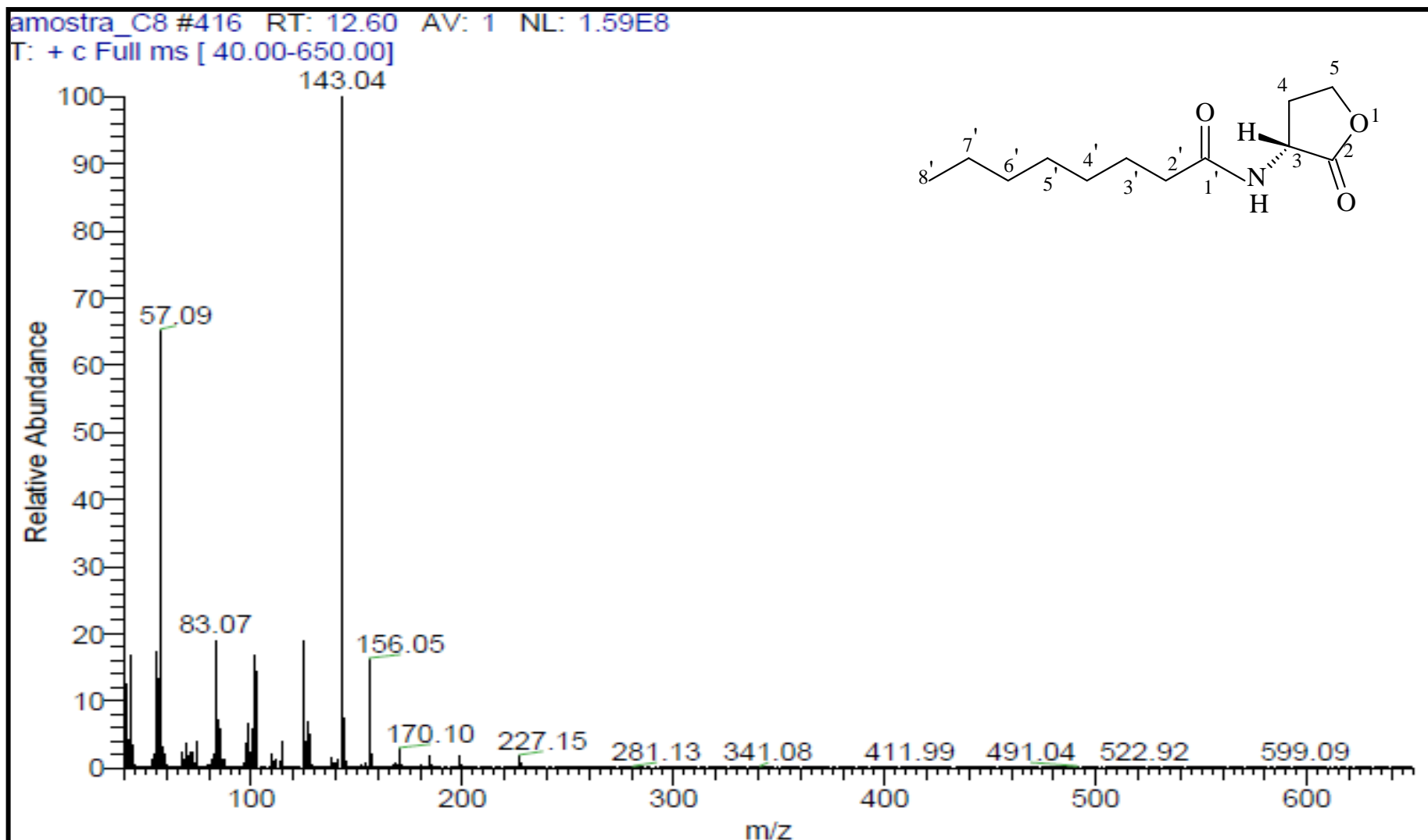
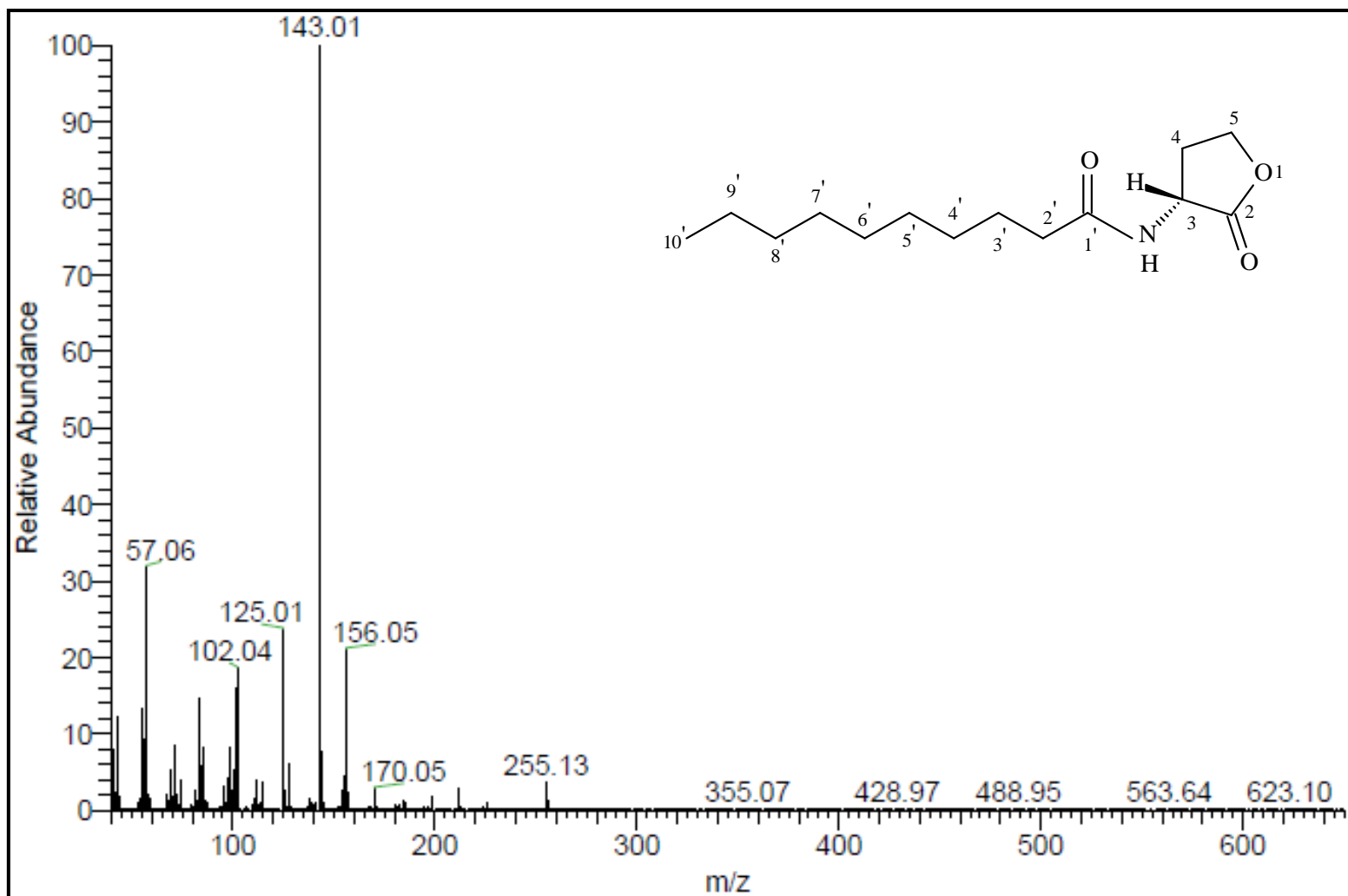
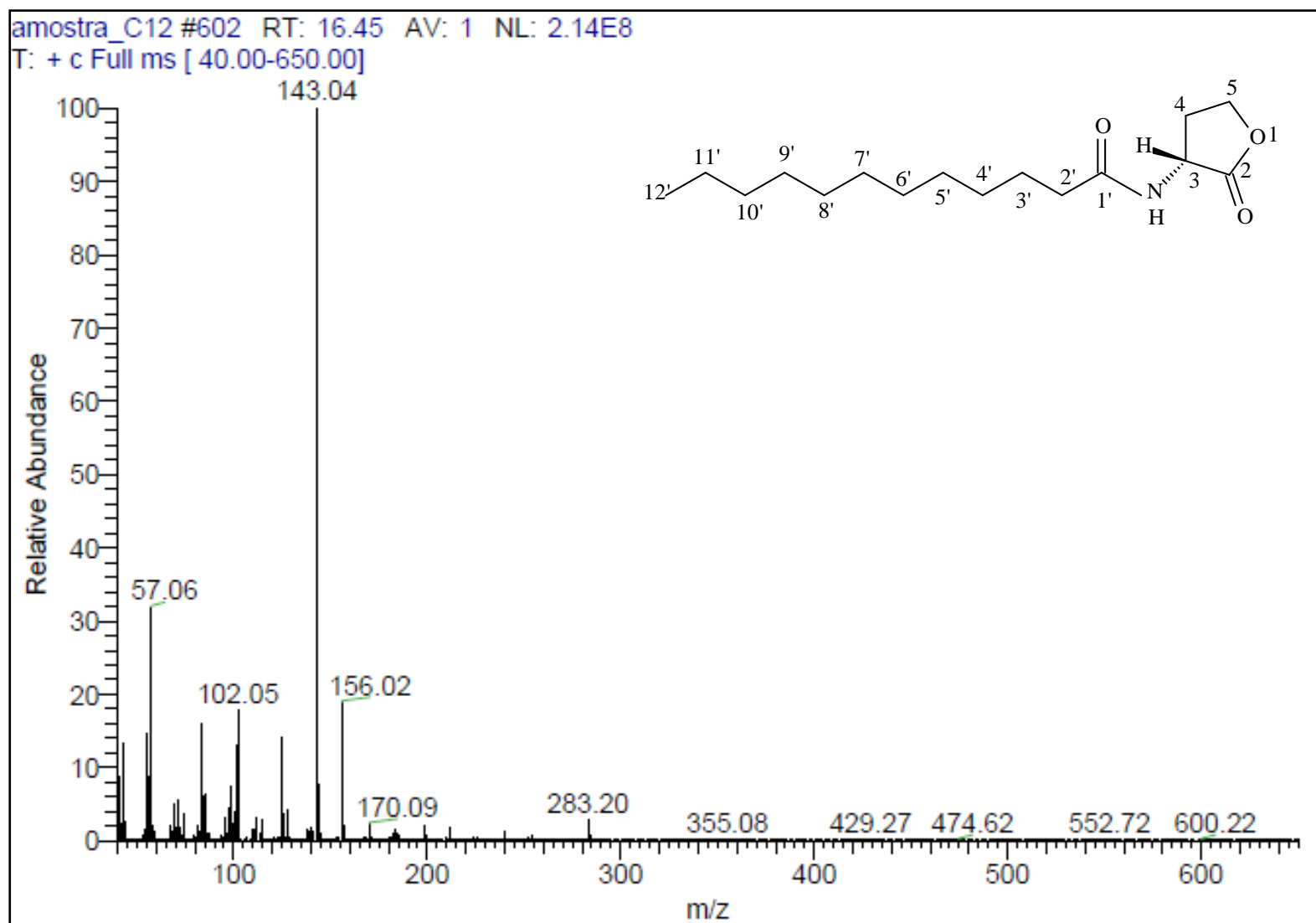
**Figura 40:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **1b**



Figura 41: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância 2b



**Figura 42:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **3b**

**Figura 43:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **4b**

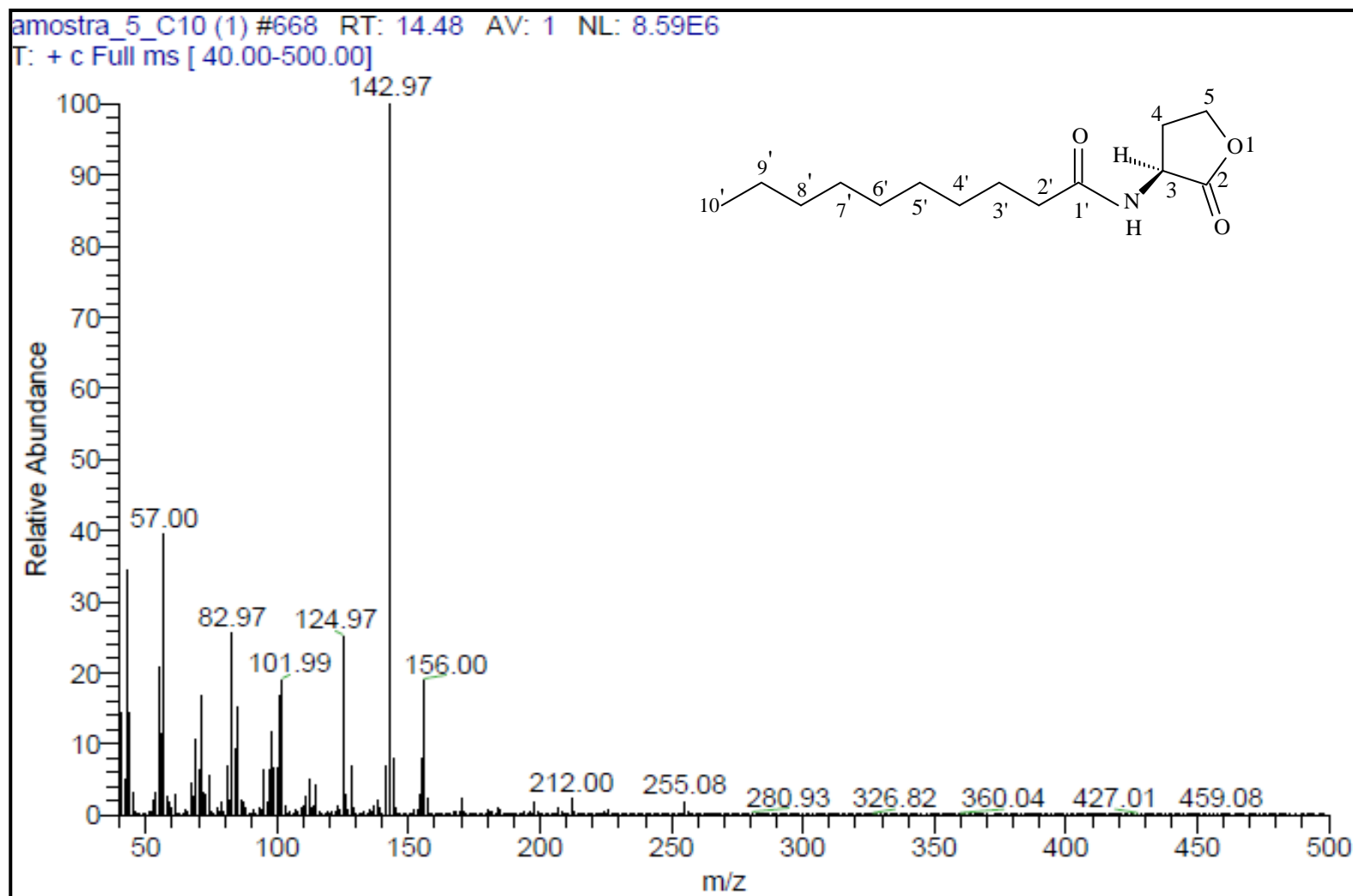
**Figura 43:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para a substância **5b**

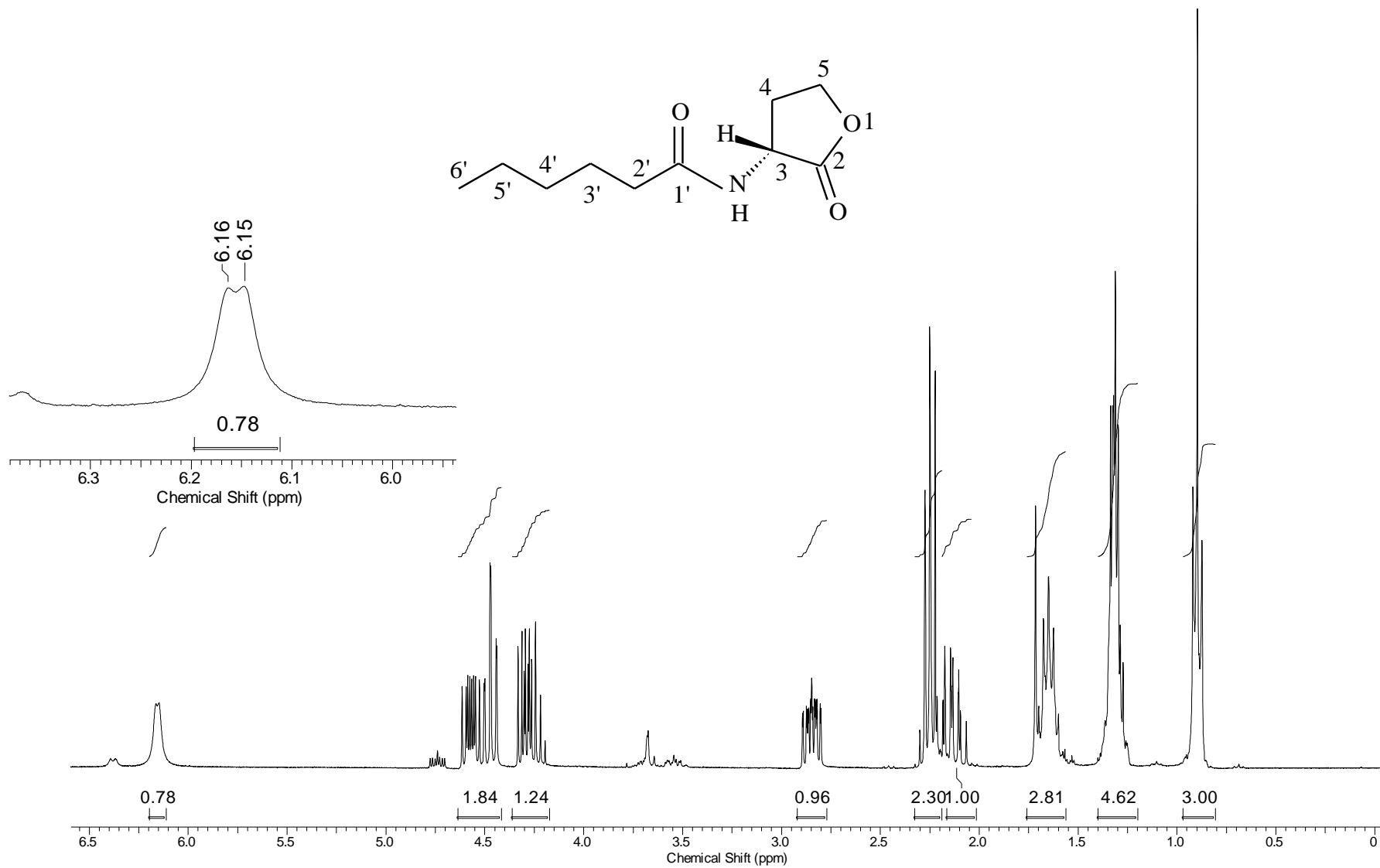
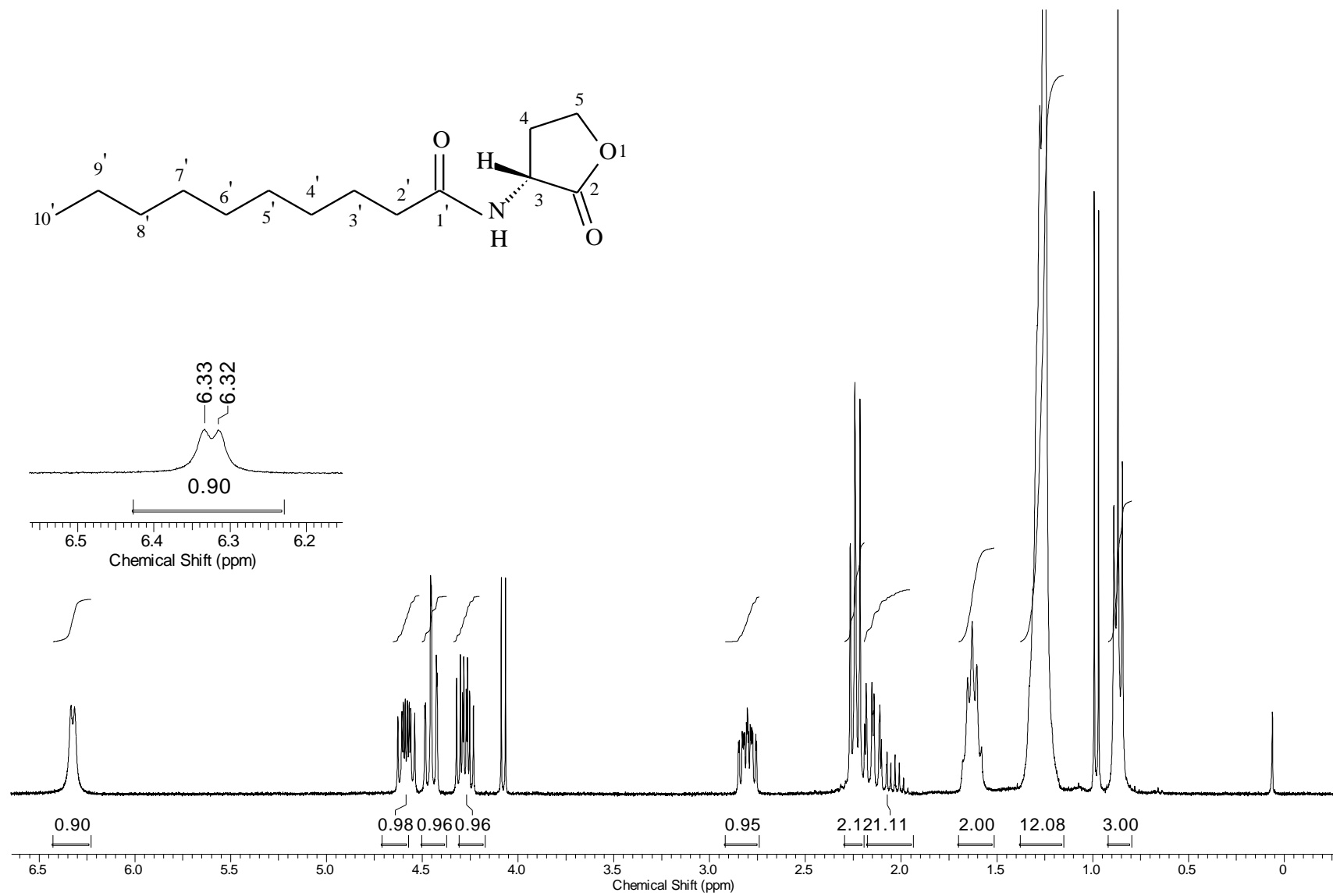
Figura 49: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **1b**

Figura 50: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **3b**

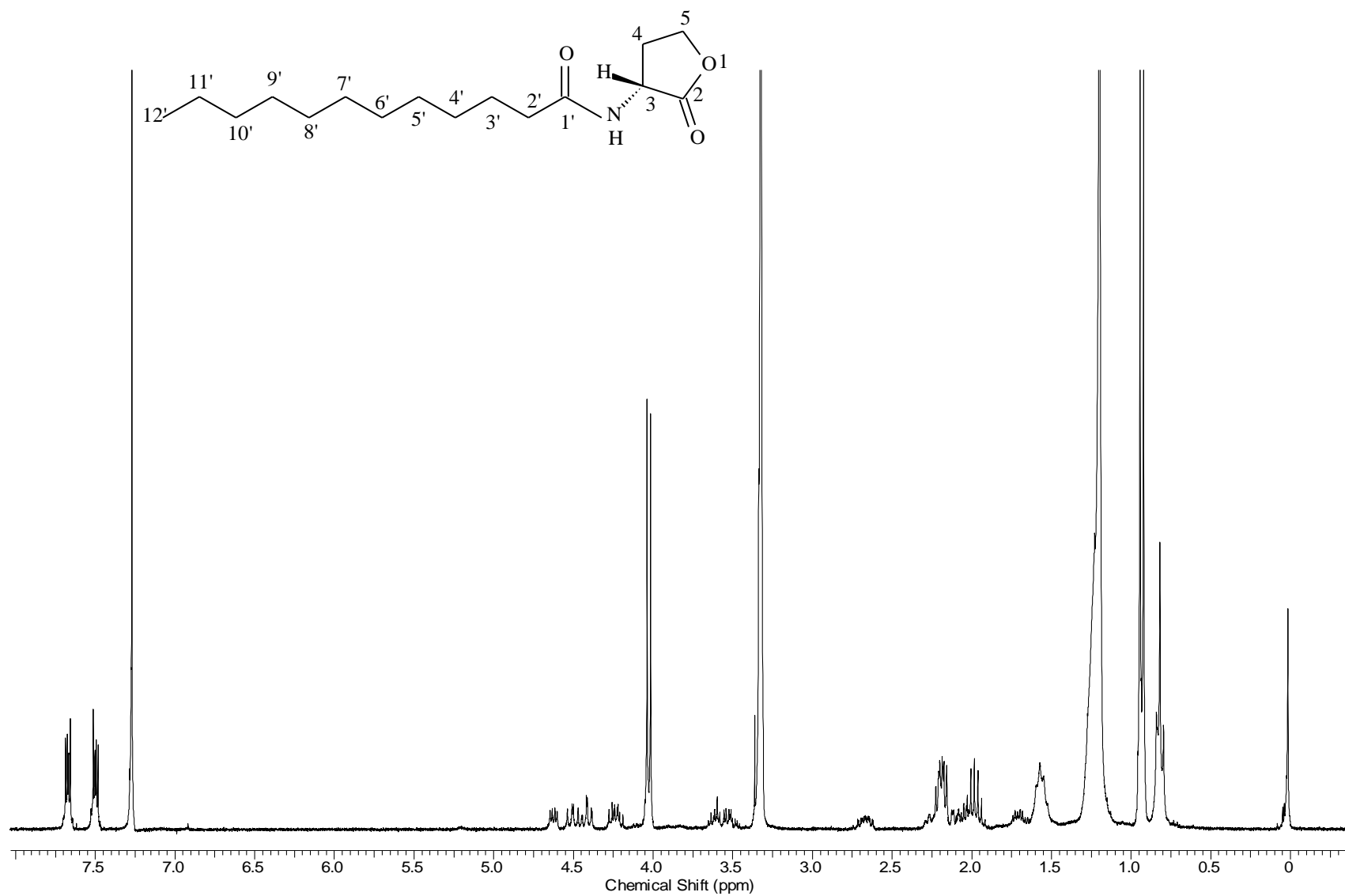
**Figura 51:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **4b**

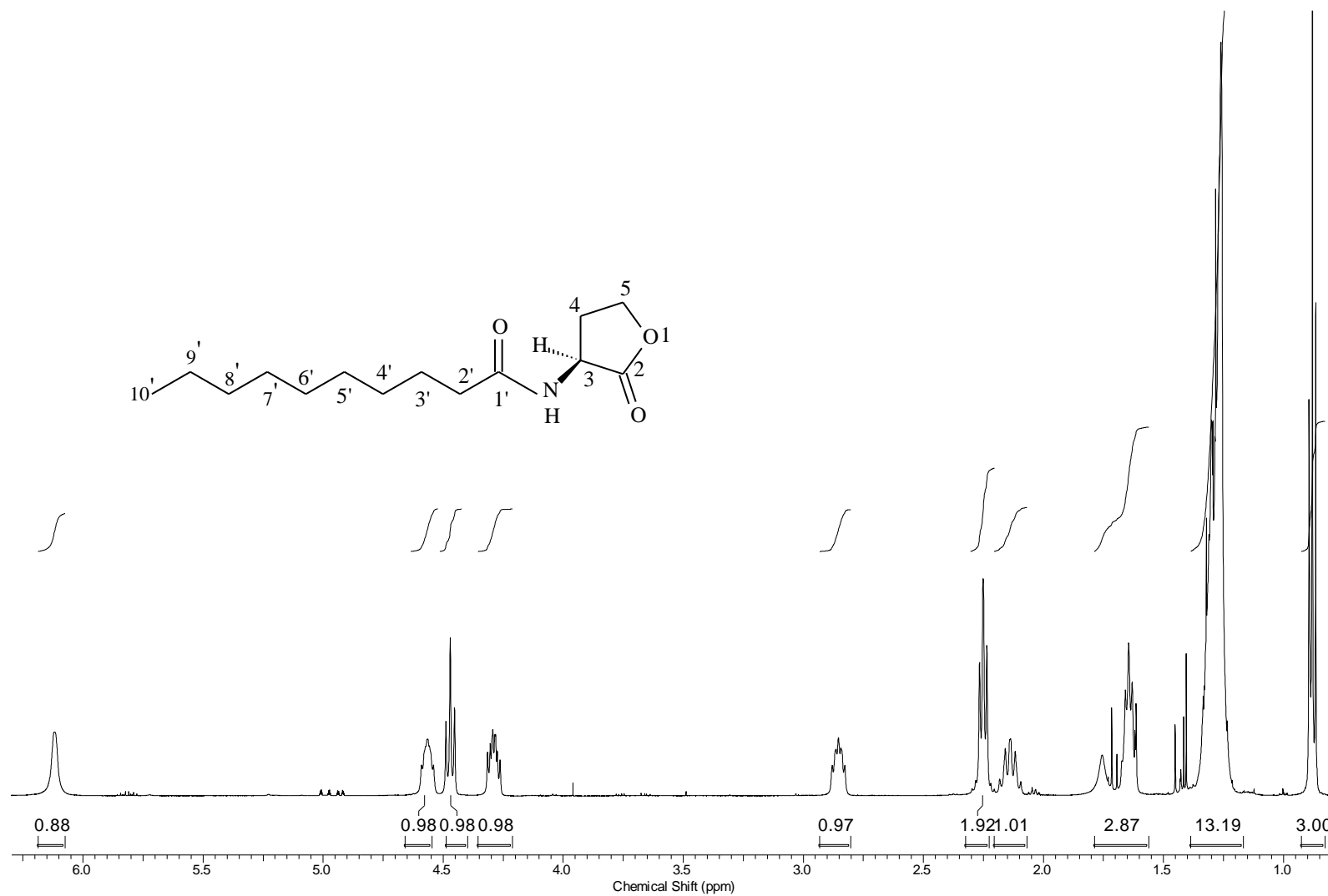
Figura 52: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **5b**



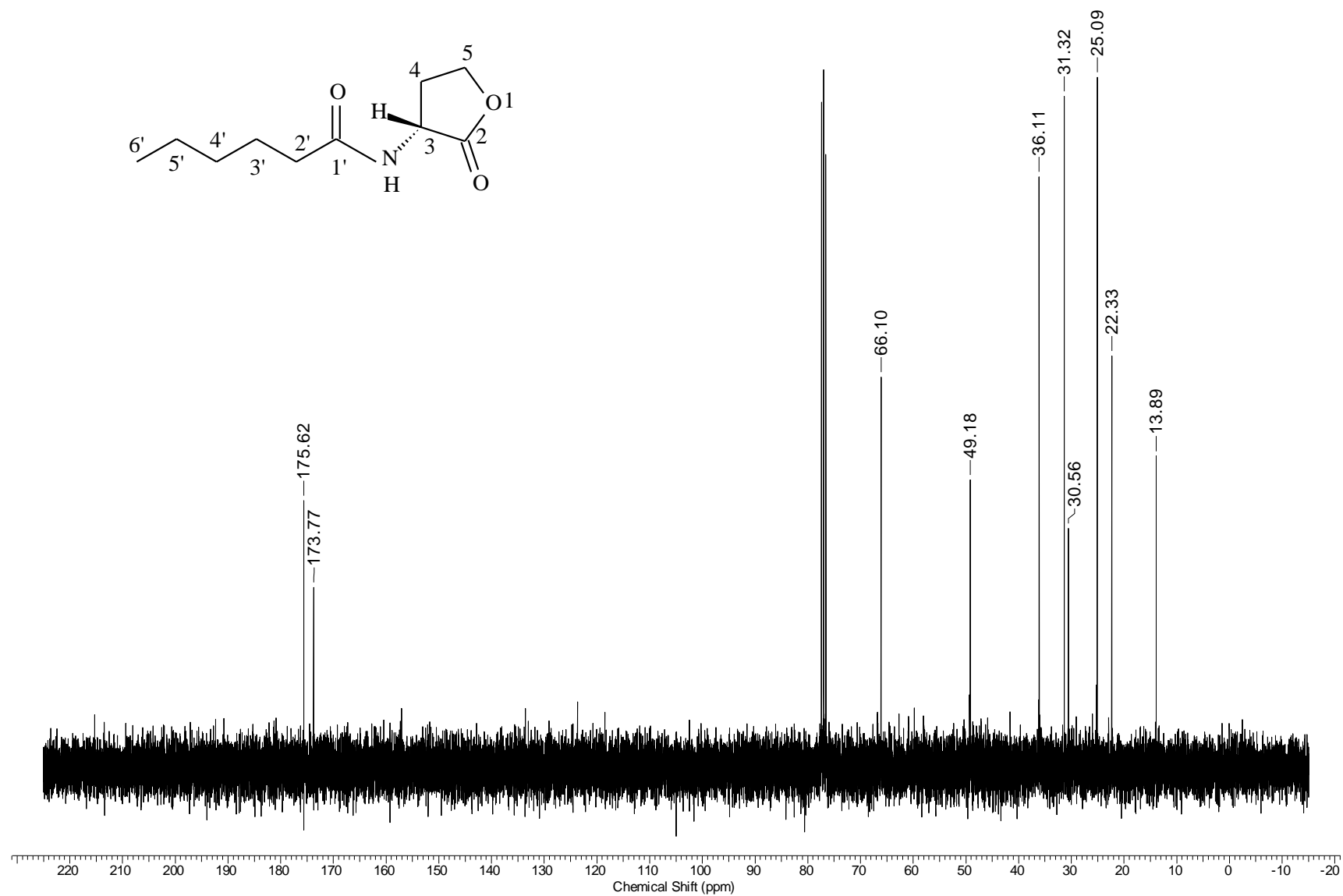
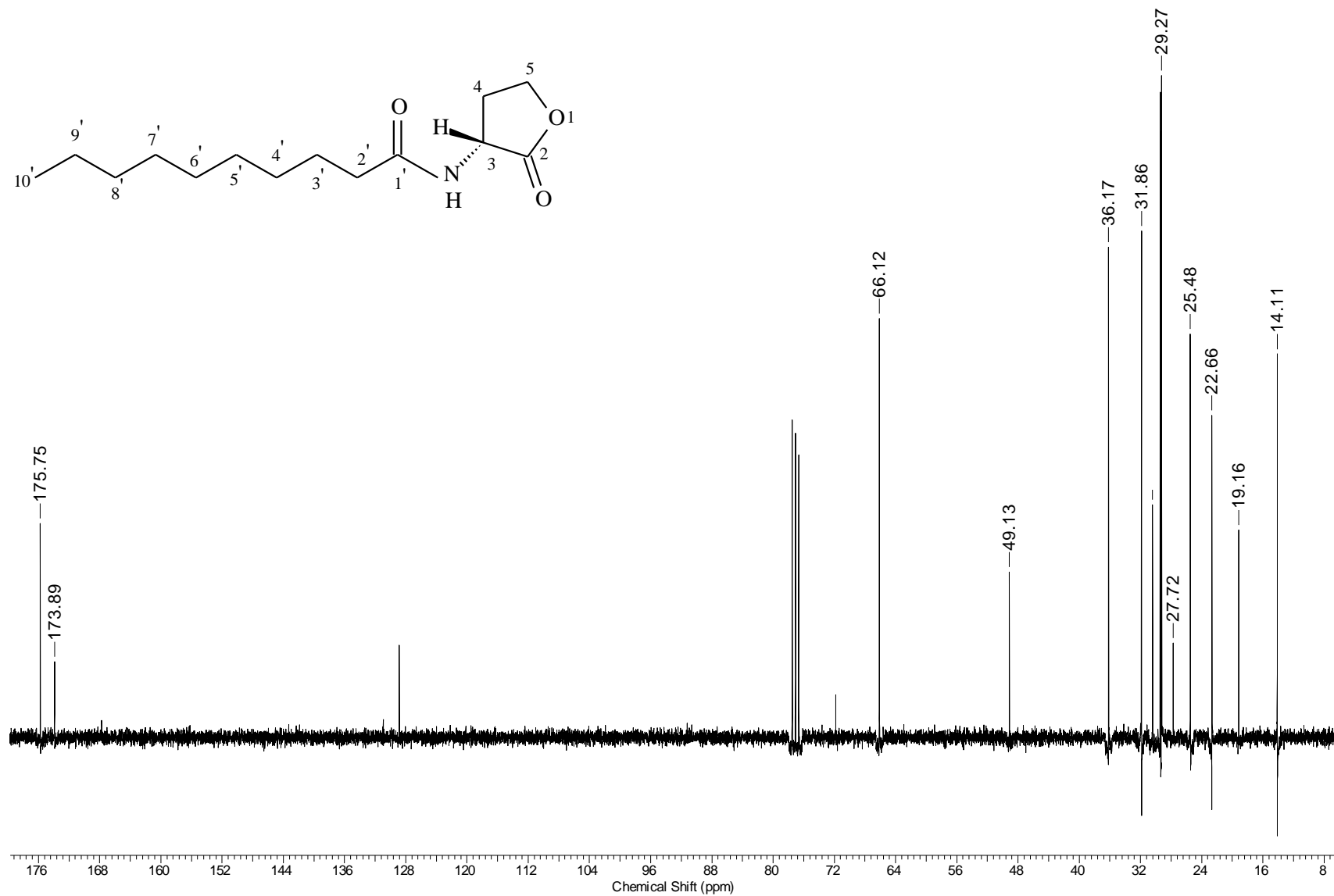
Figura 53: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **1b**

Figura 54: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,5 MHz) de **3b**

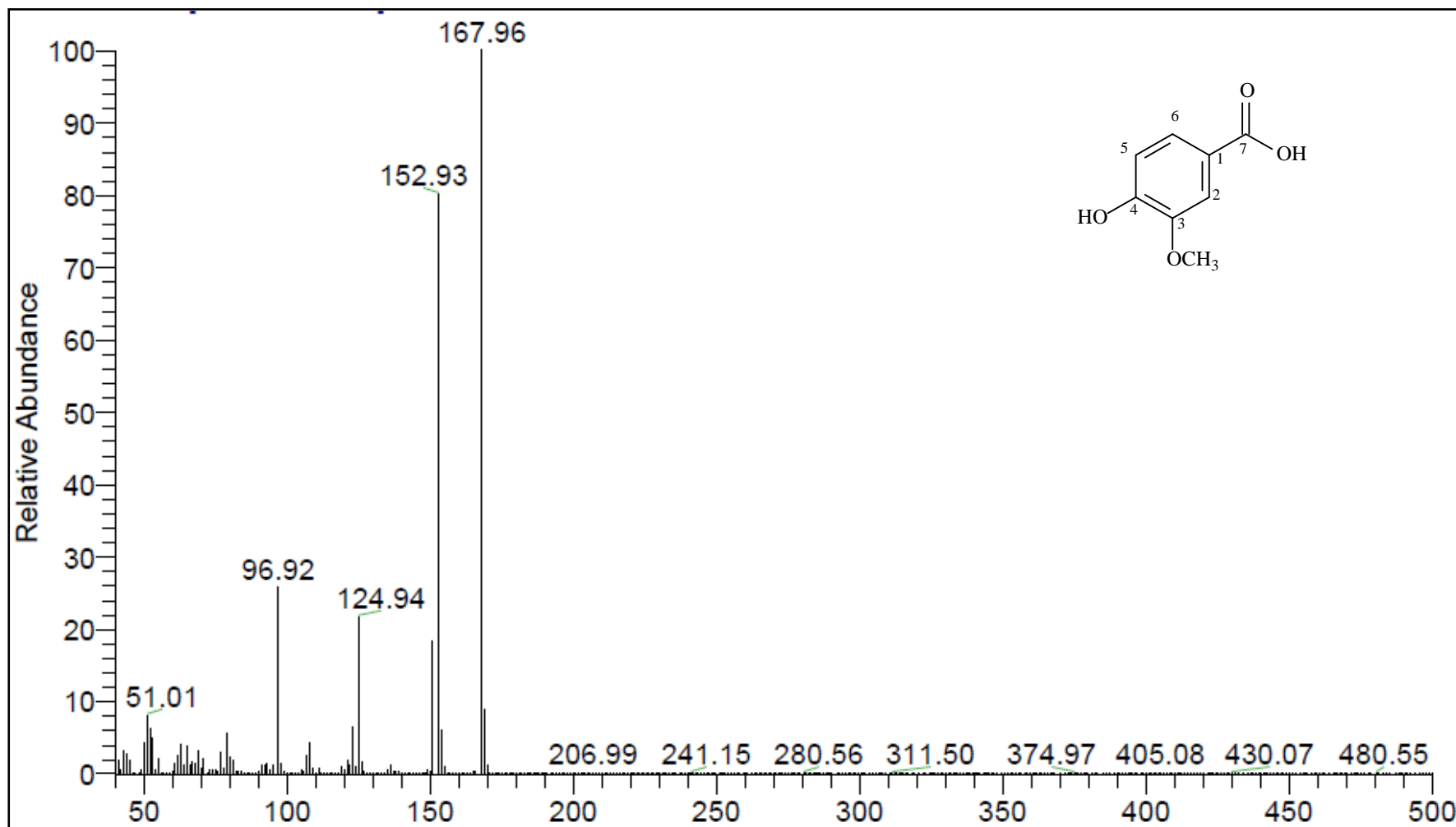
**Figura 70:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S7**

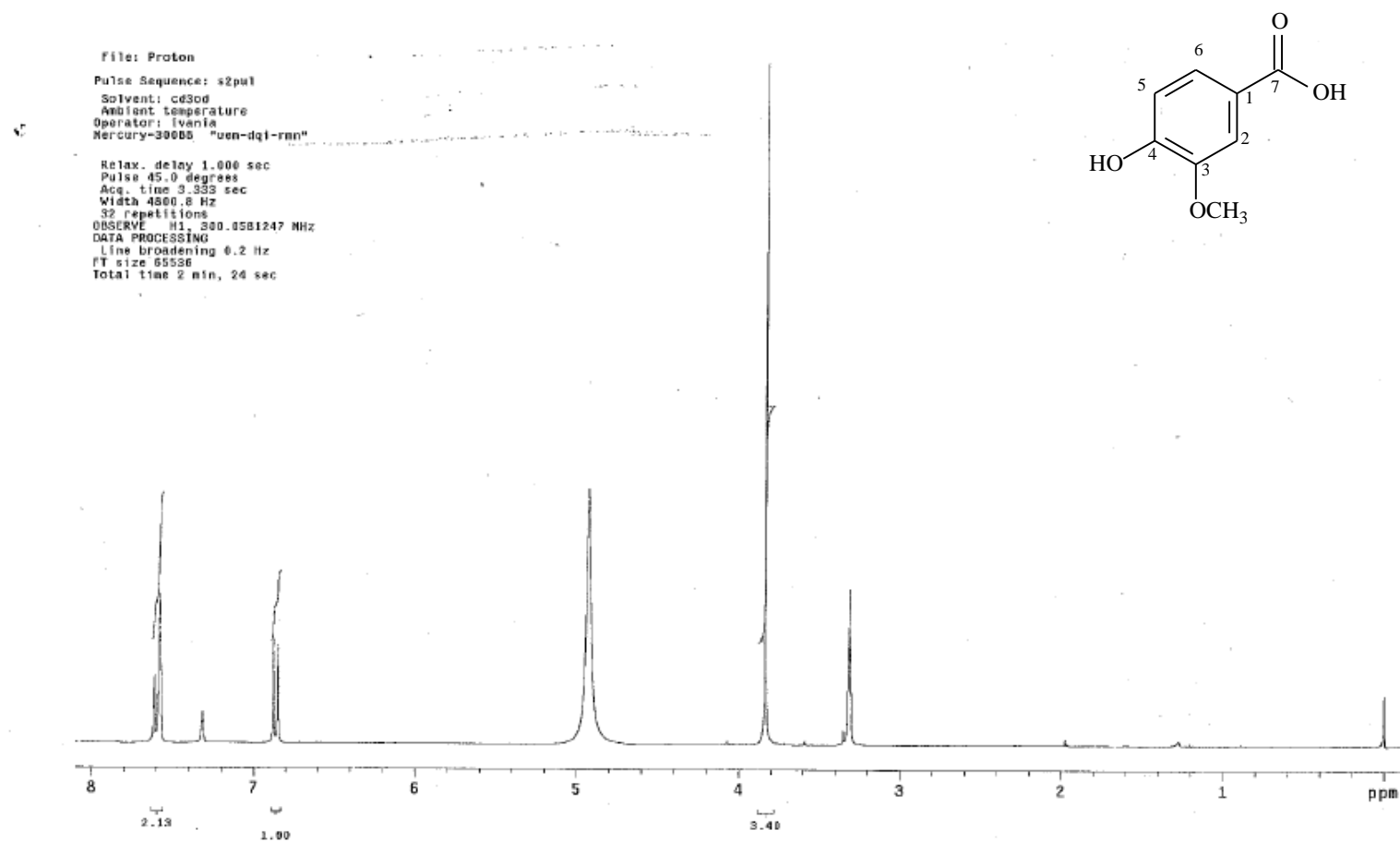
Figura 71: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para S7

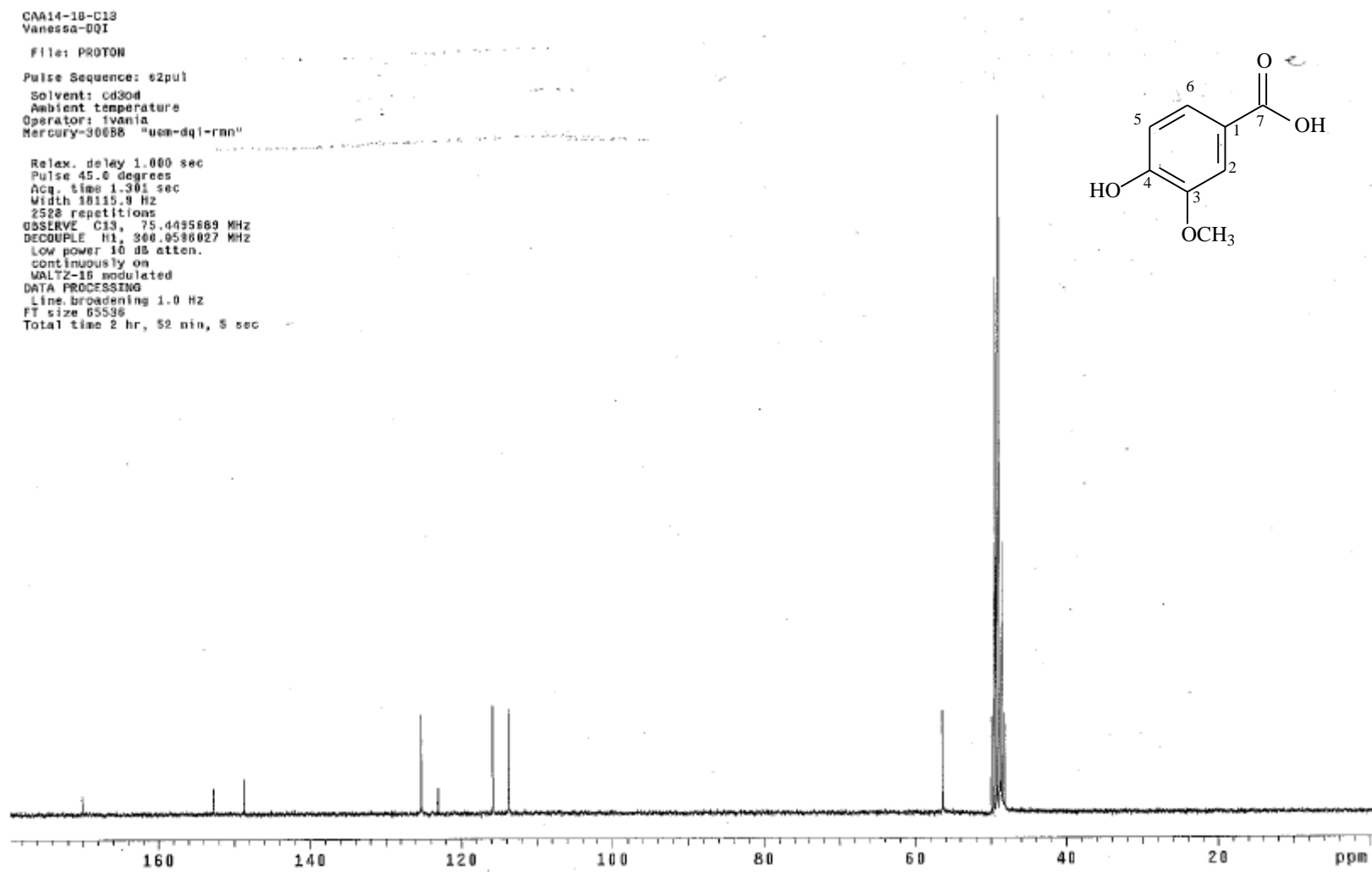
Figura 72: Espectro de RMN de  $^{13}$  (CD<sub>3</sub>OD; 75,5 MHz) para S7

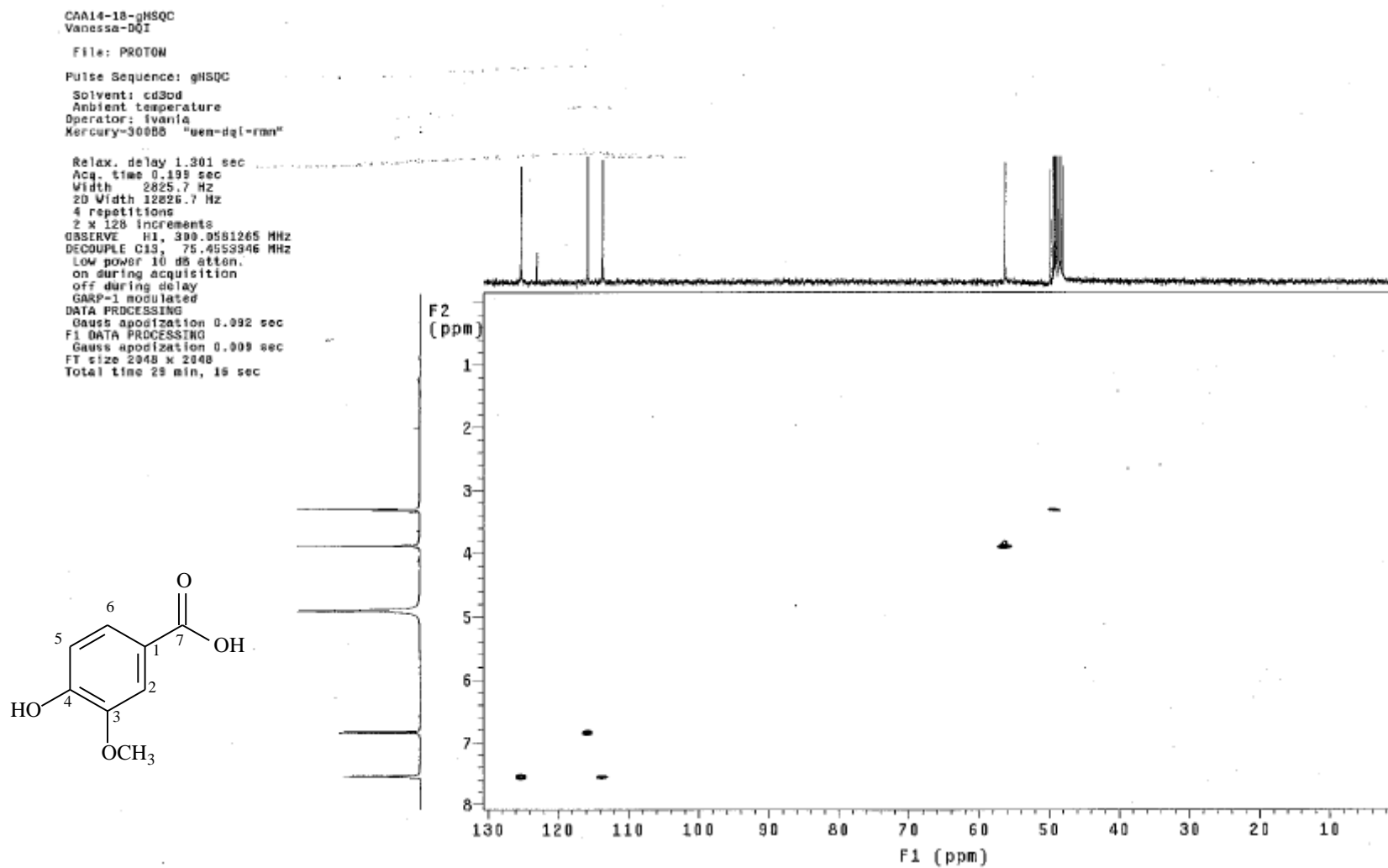
Figura 73: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para S7

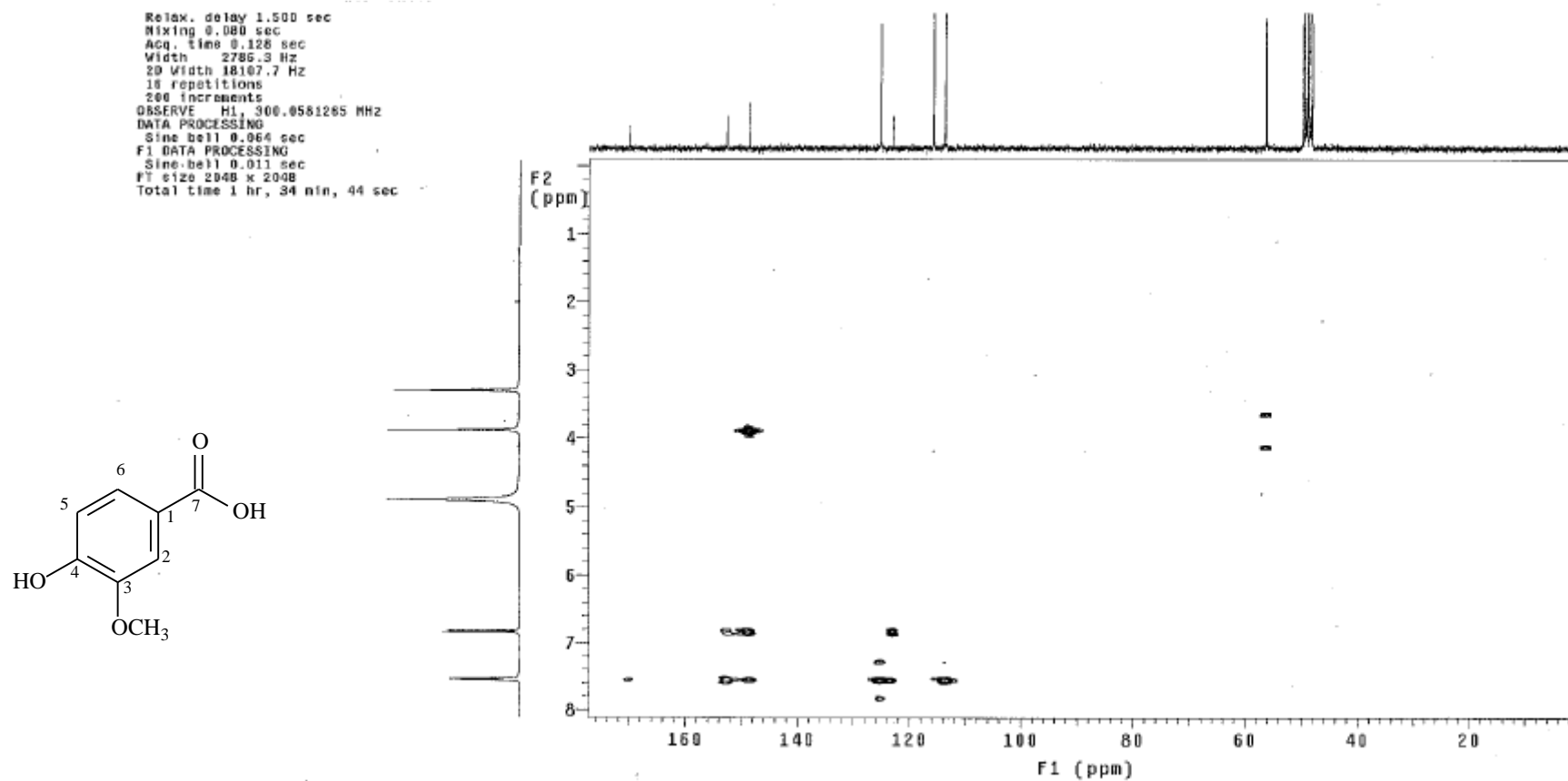
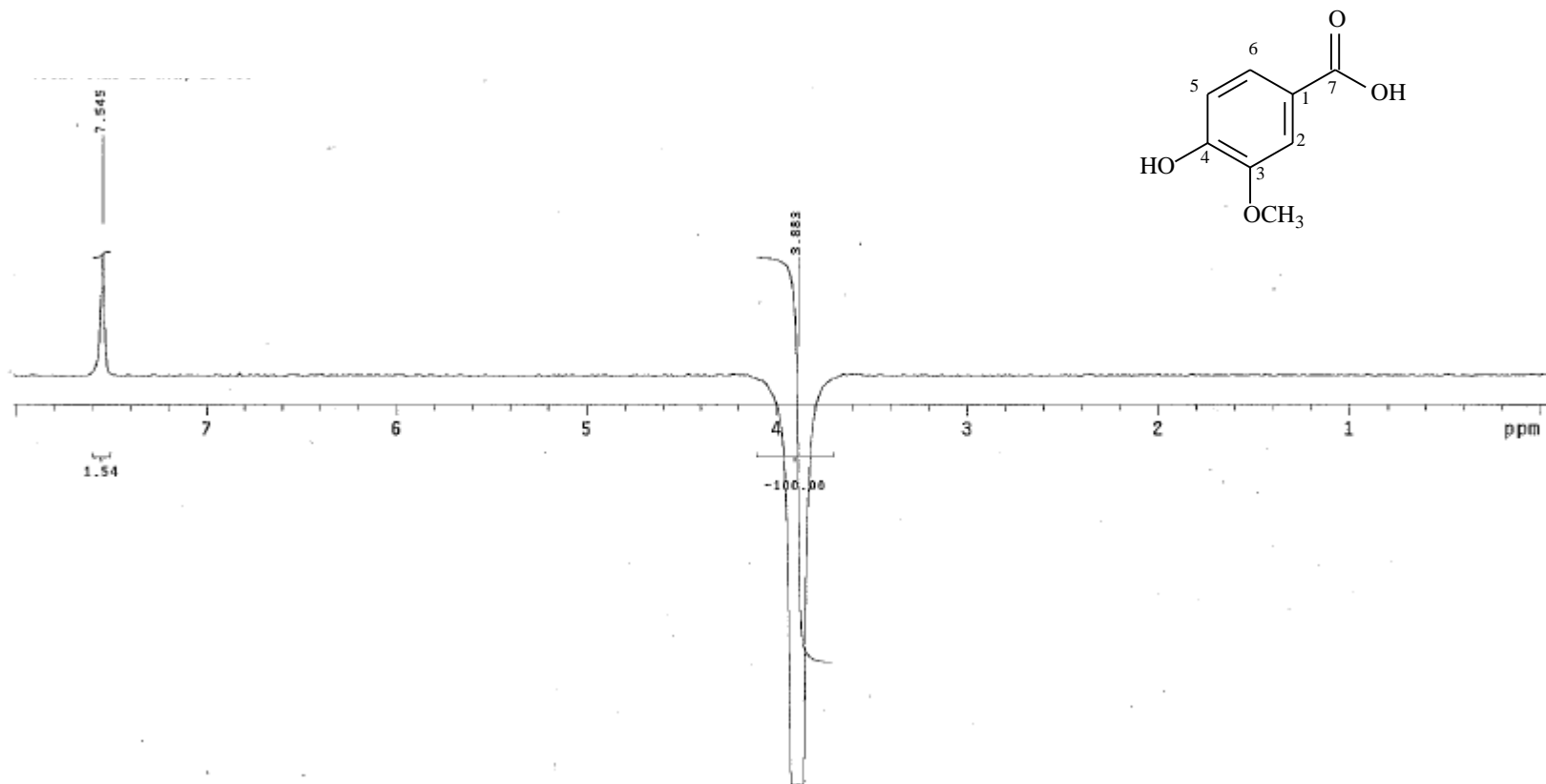
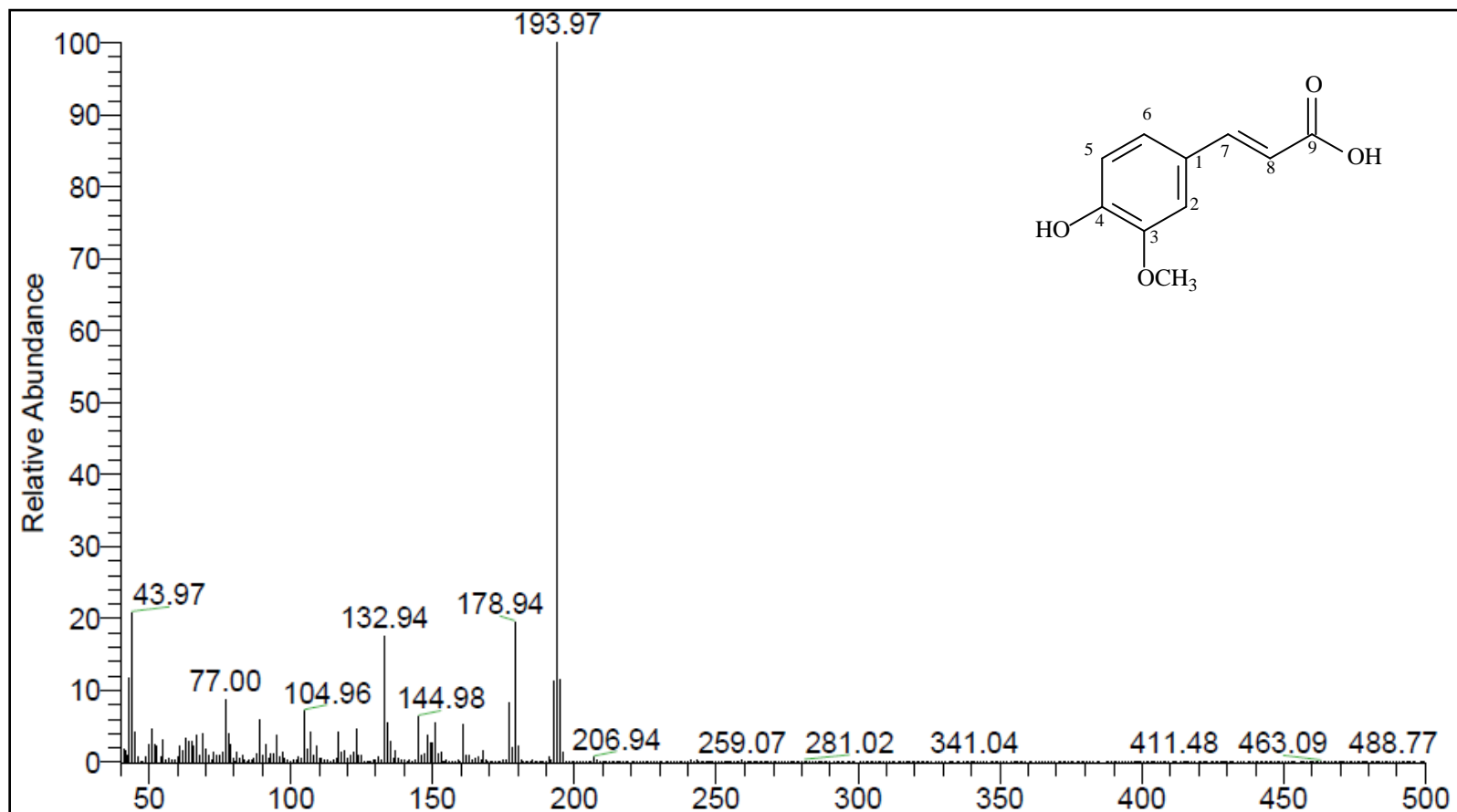
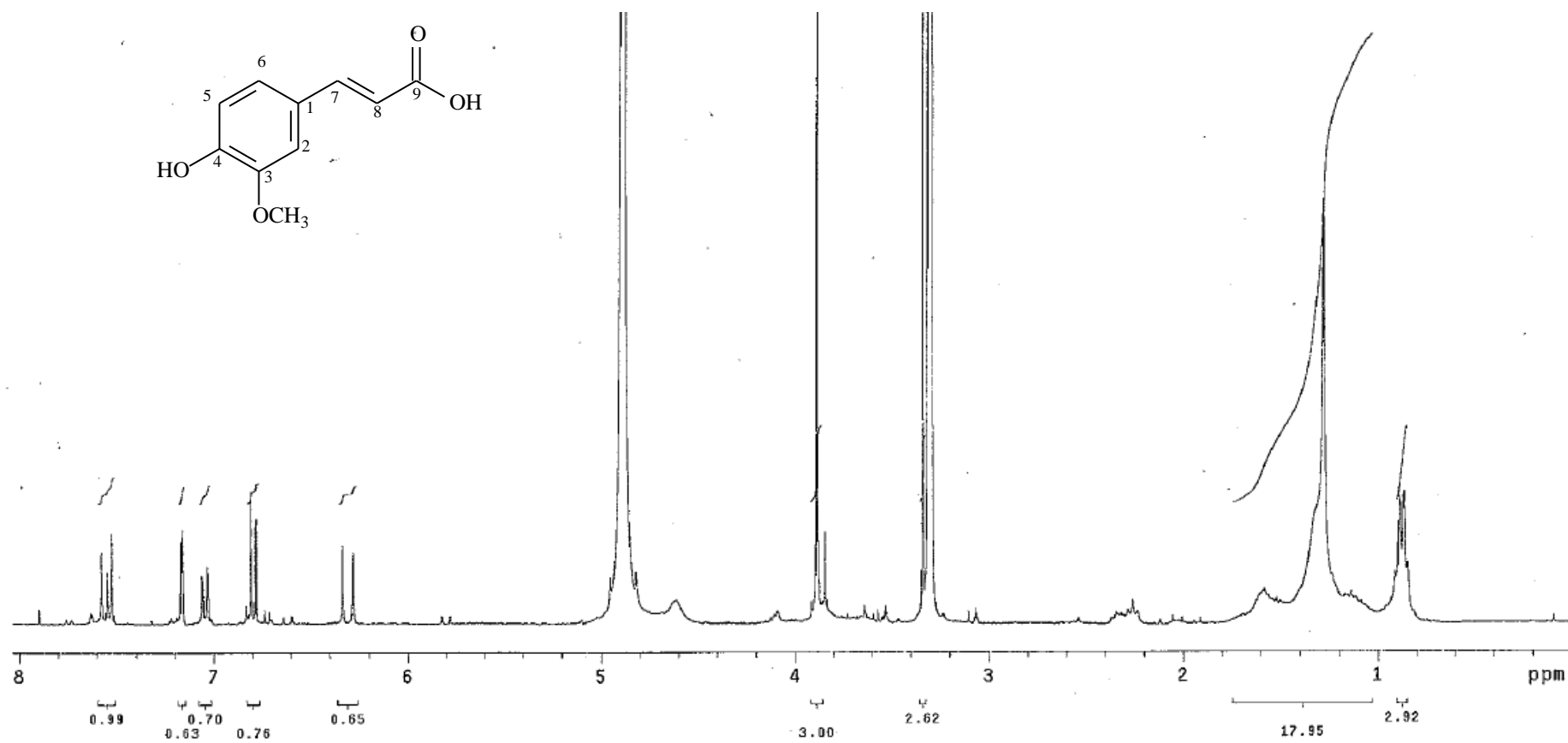
Figura 74: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para S7

Figura 75: Espectro de NOE para S7





**Figura 76:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S8**

**Figura 77:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para **S8**

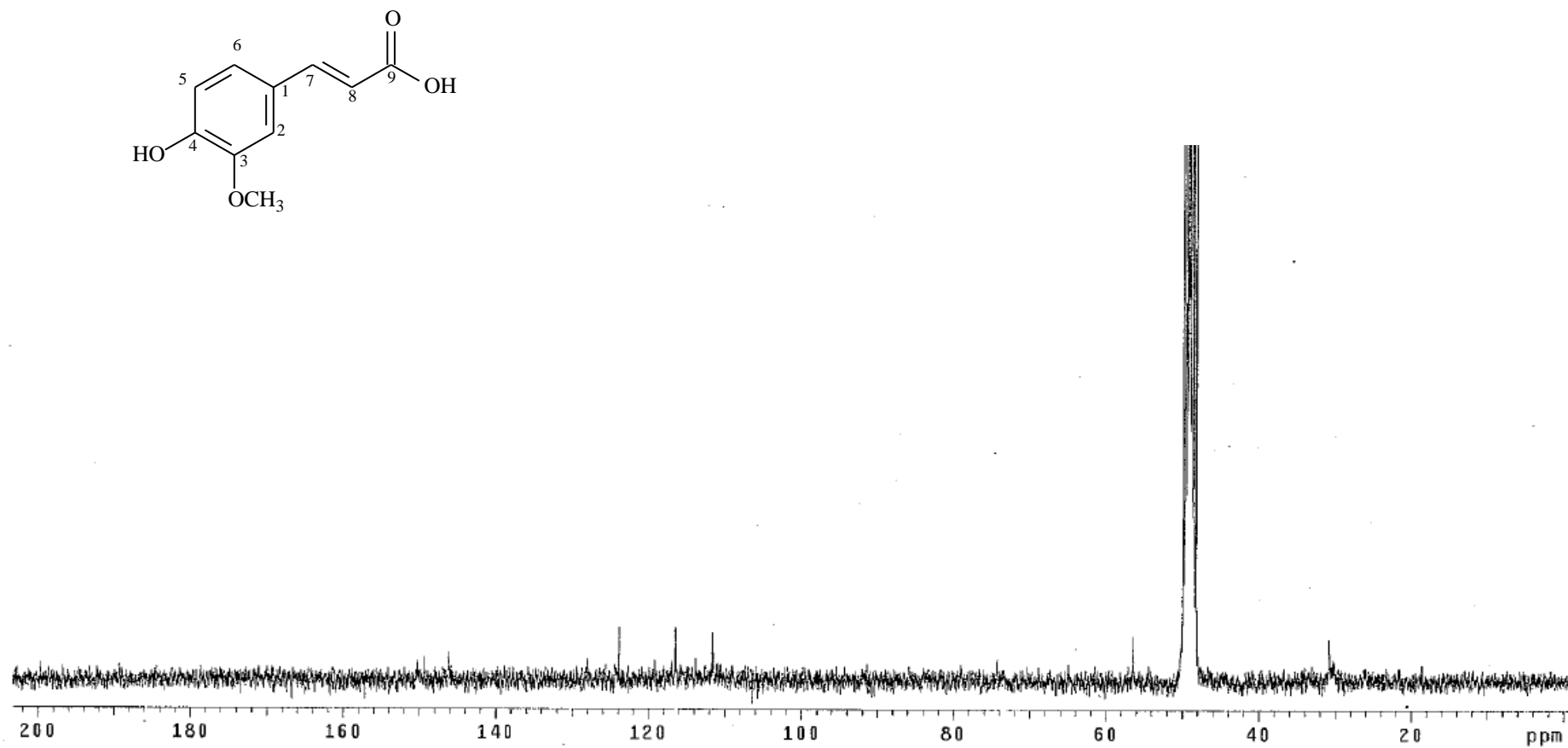
**Figura 78:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para **S8**

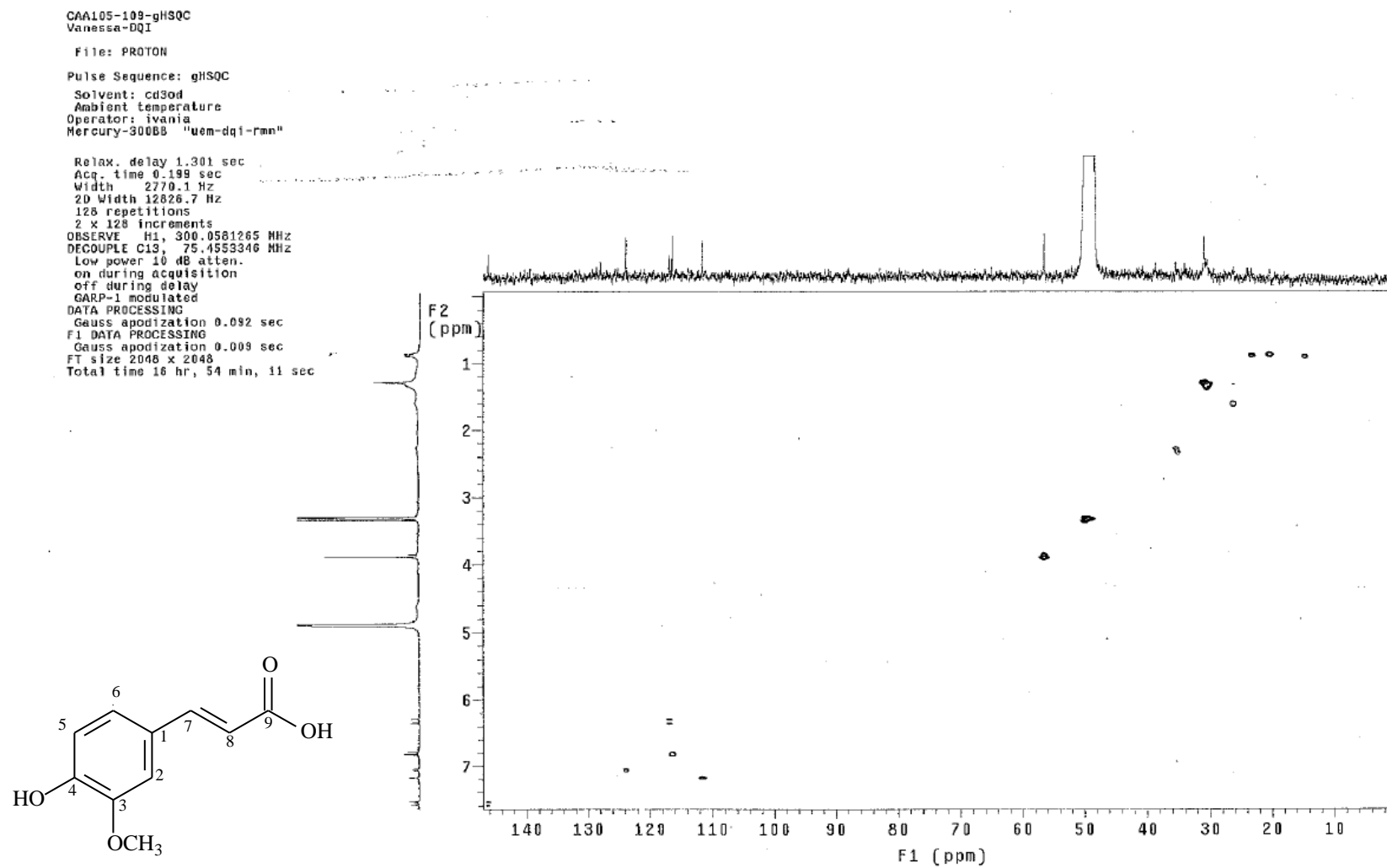
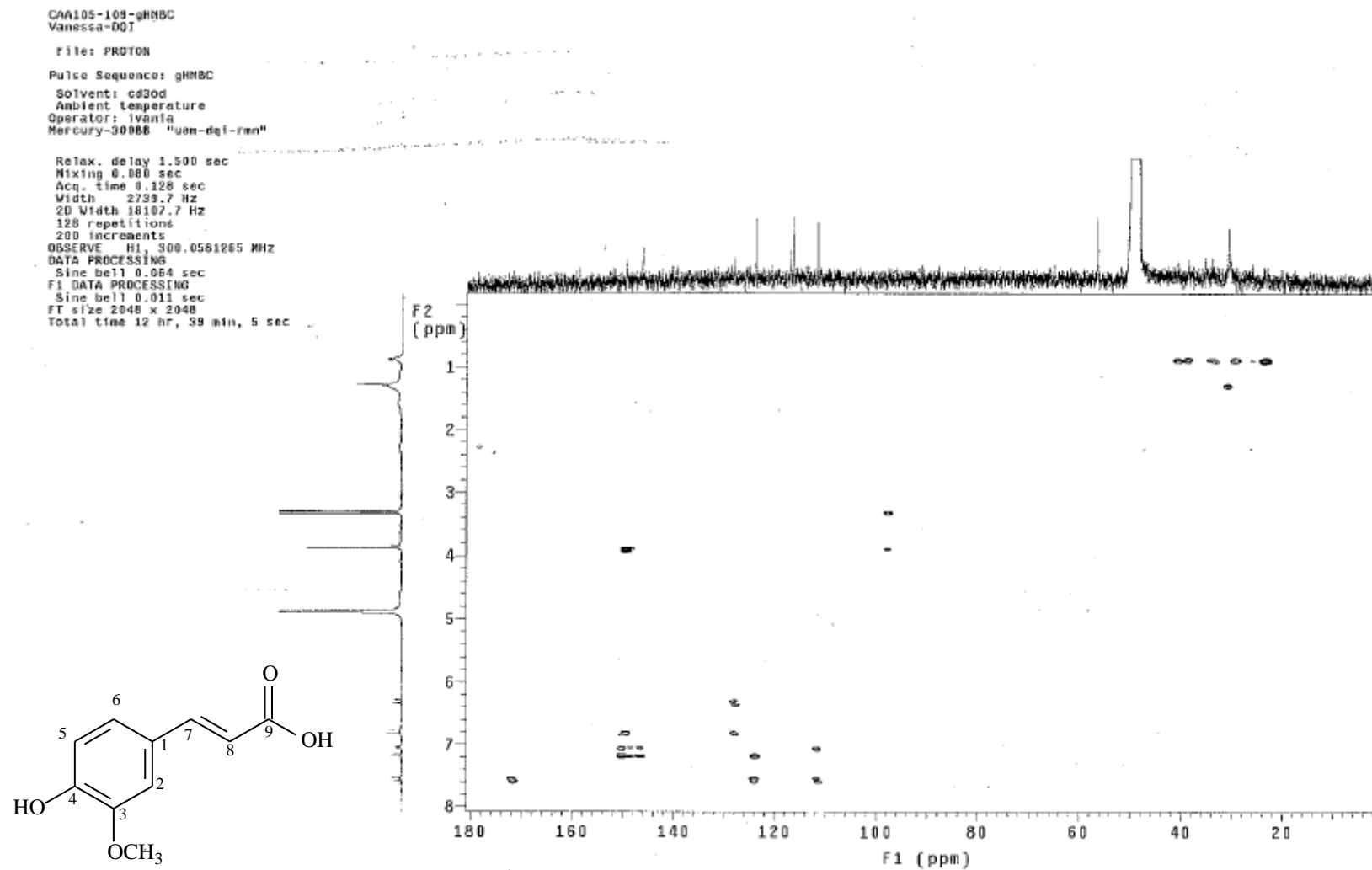
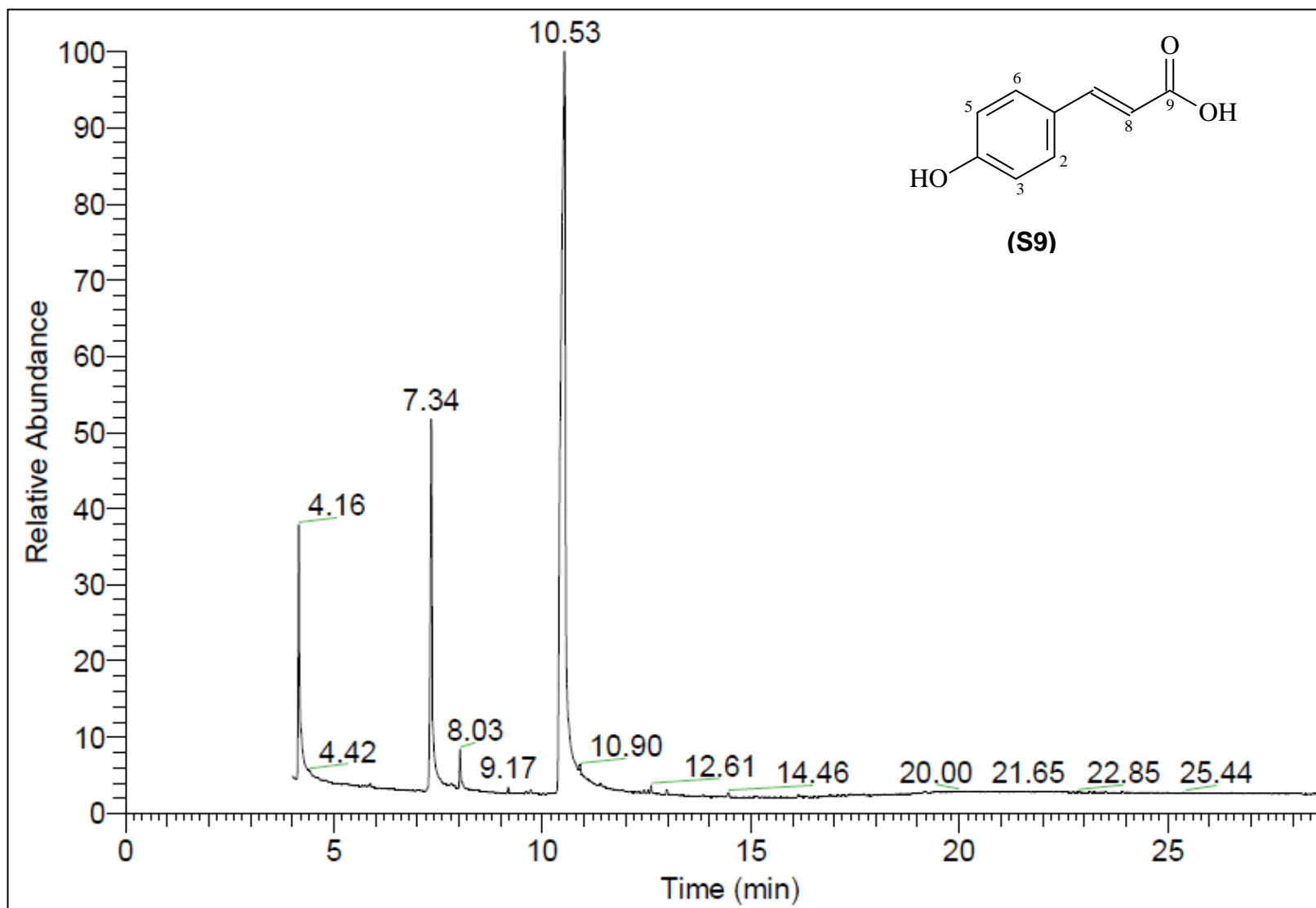
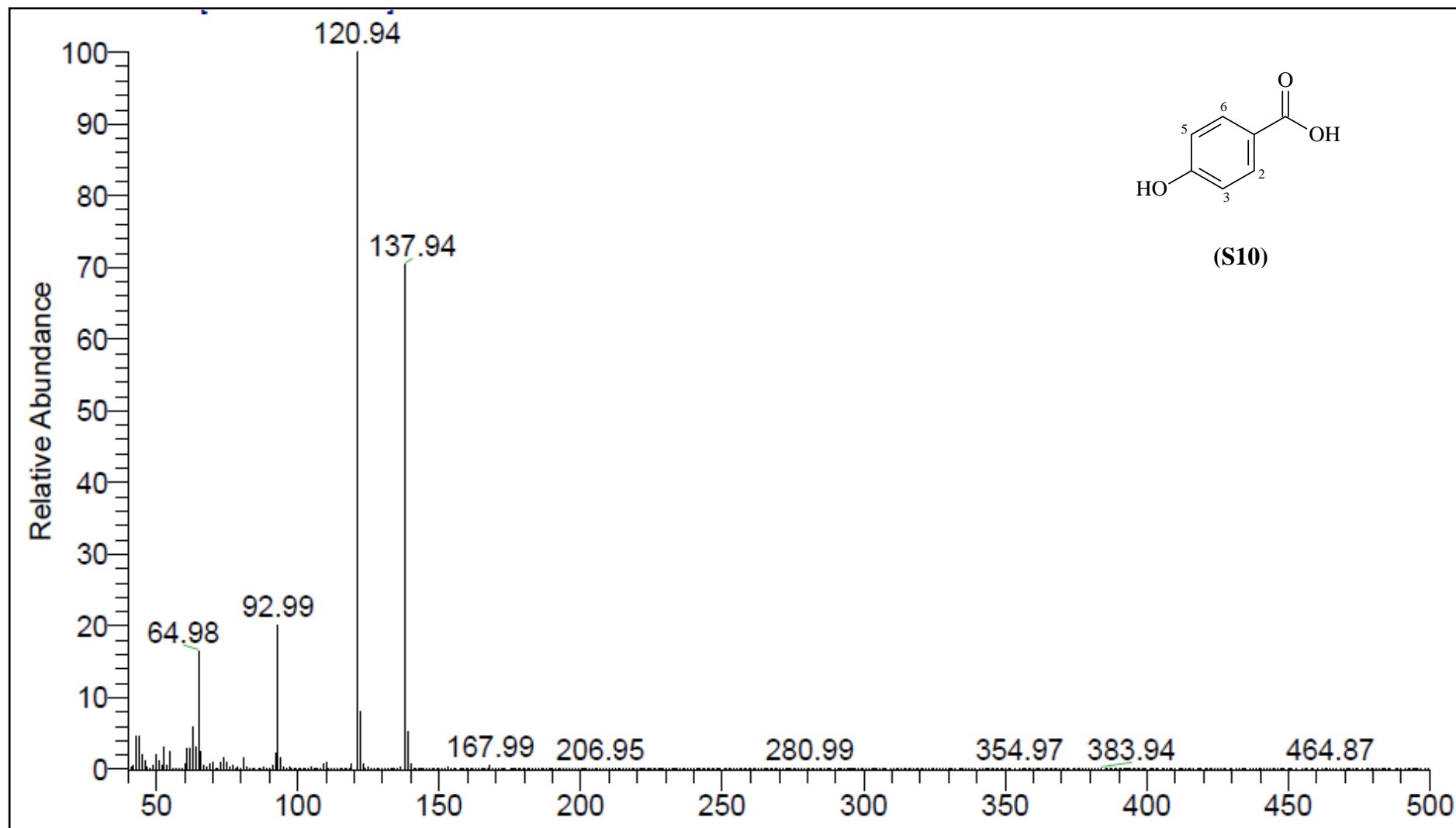
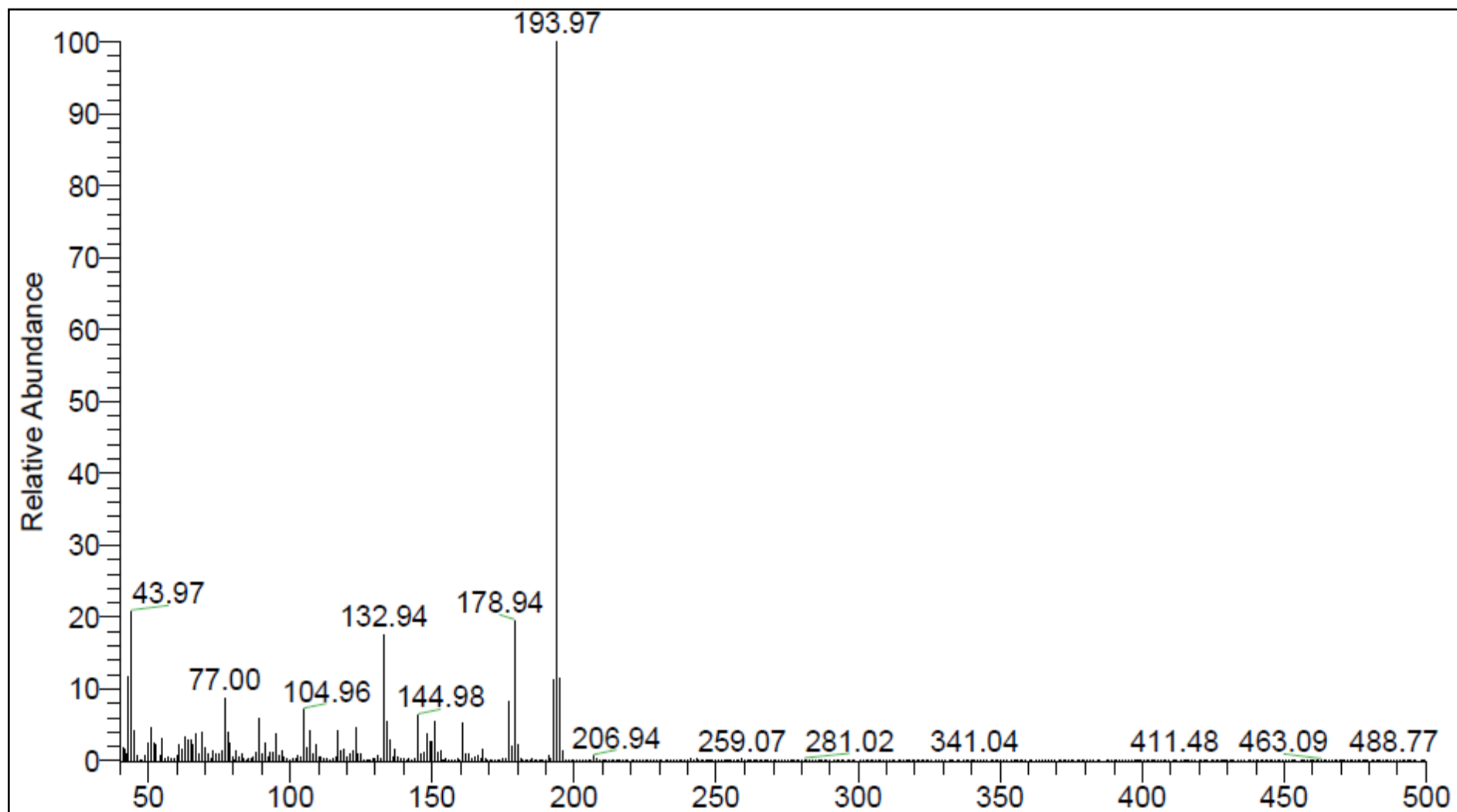
Figura 79: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para S8

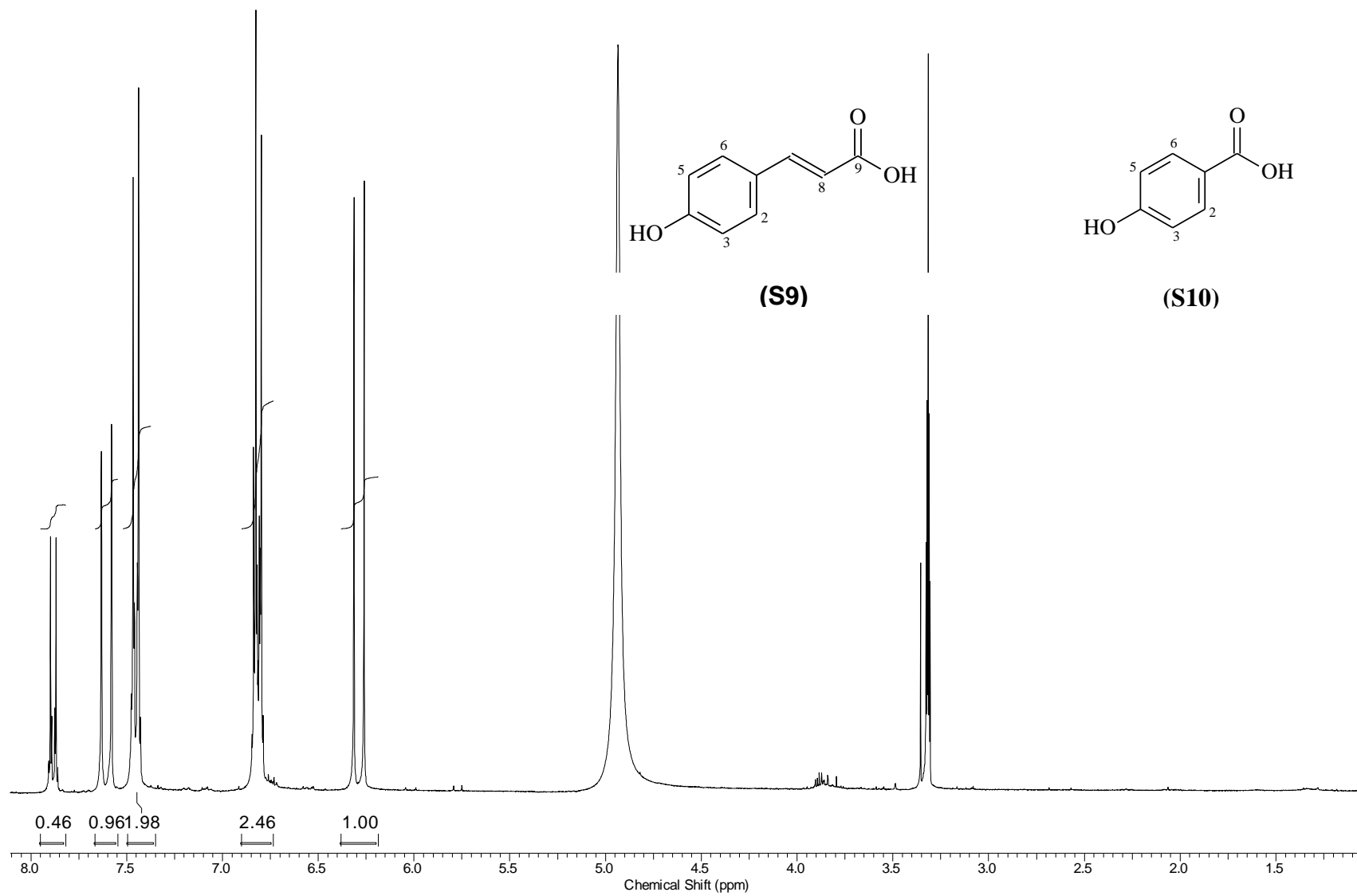
Figura 80: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para S8

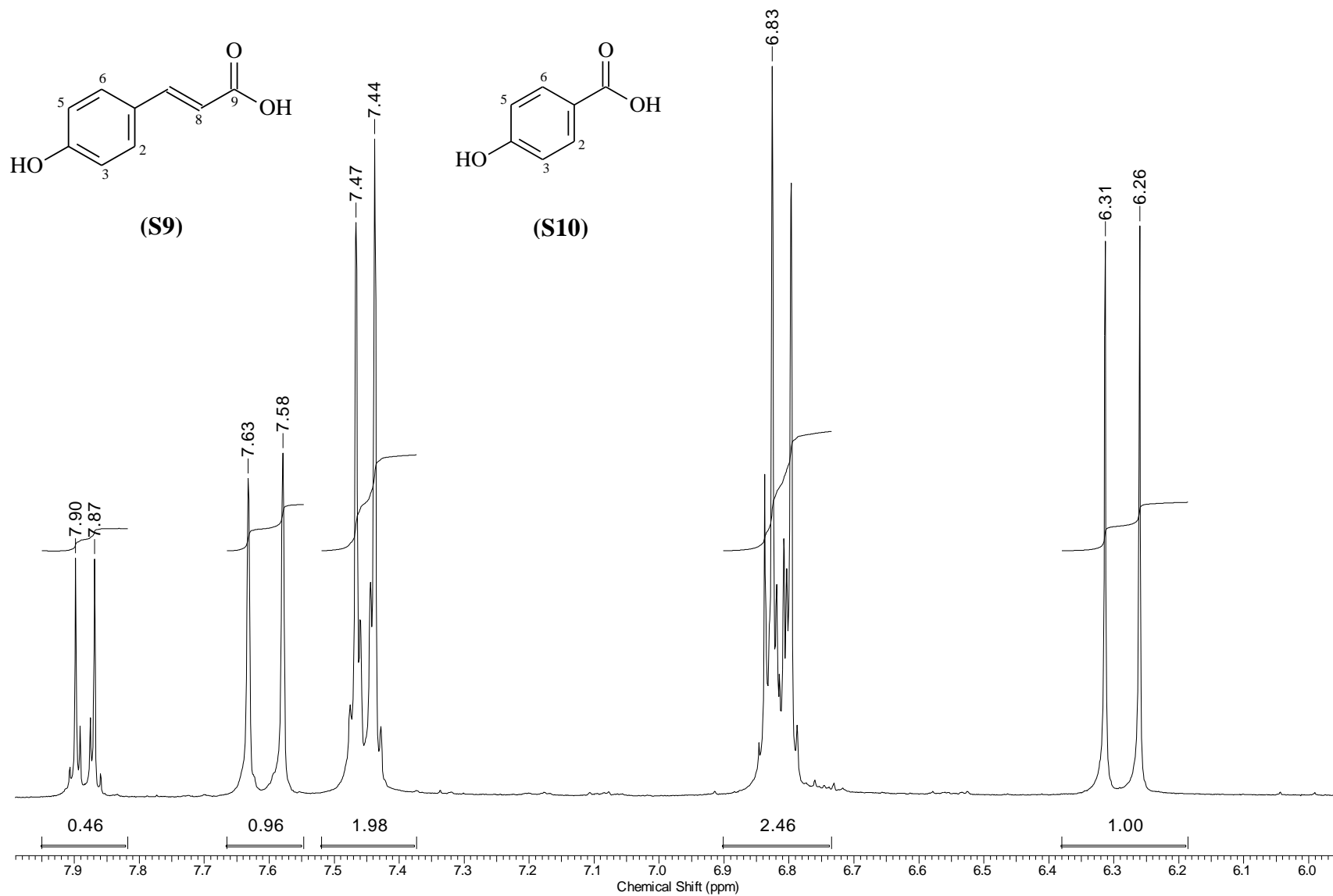
**Figura 82:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura de substâncias **S9+S10**

**Figura 83:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S10**

**Figura 84:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S9**



**Figura 85:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para a mistura **S9**+**S10**

**Figura 86:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para a mistura **S9+S10**

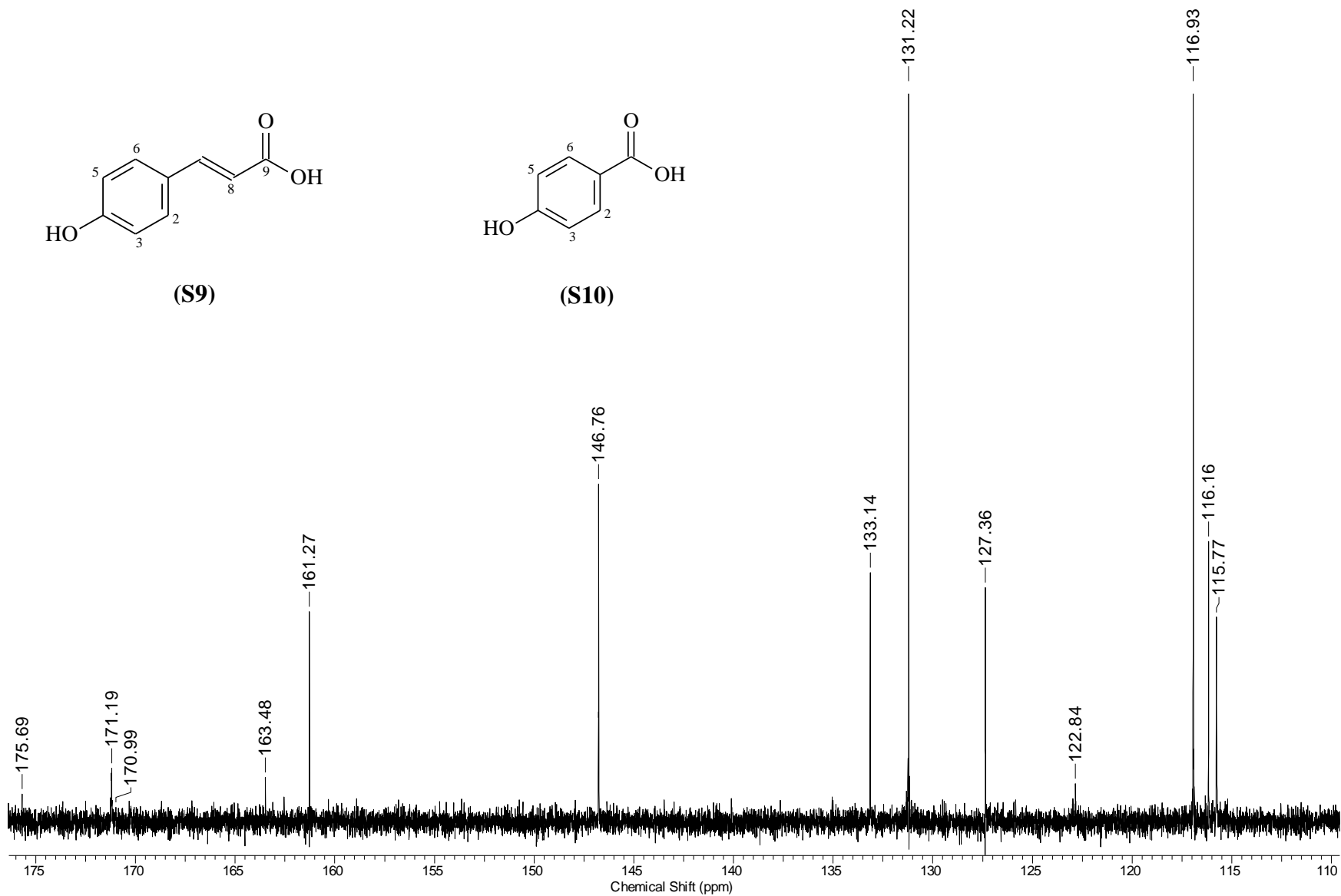
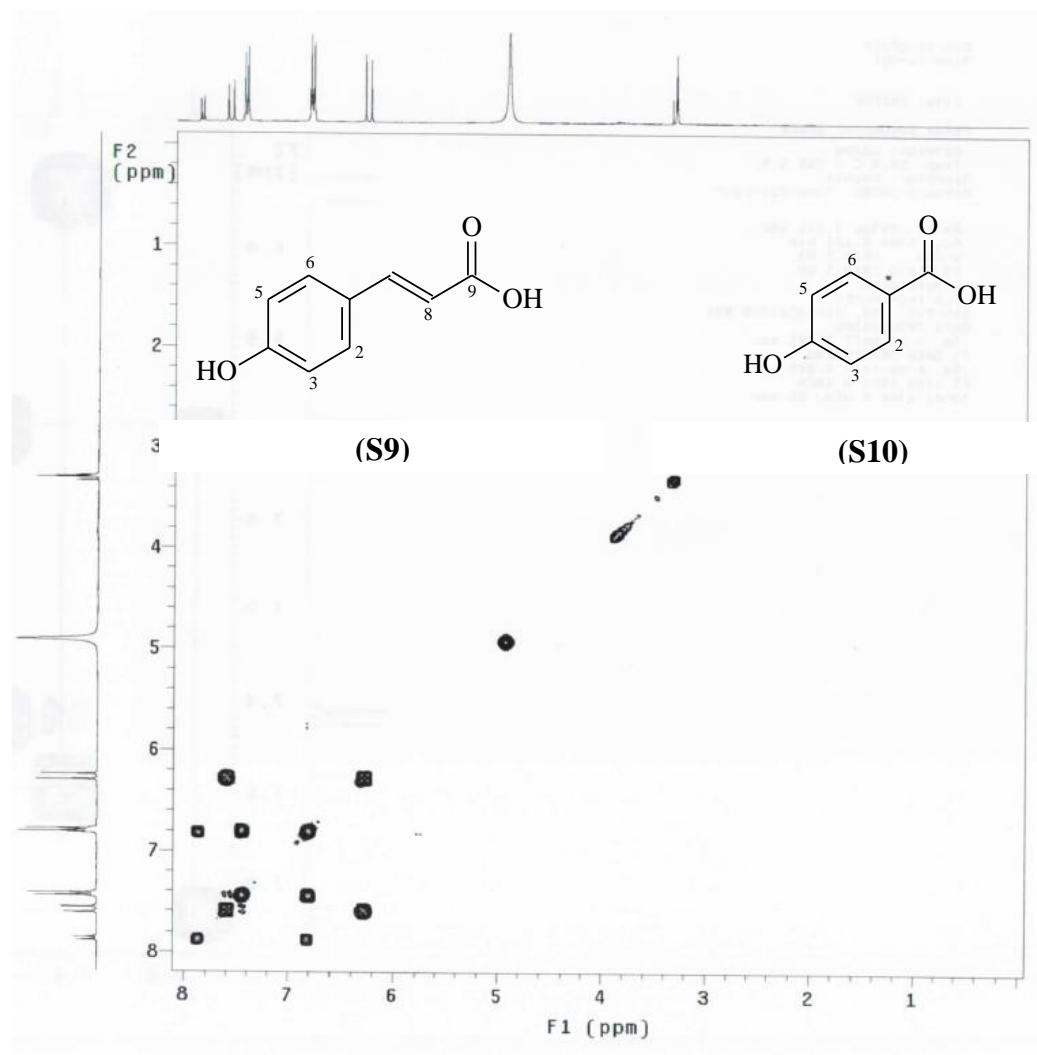
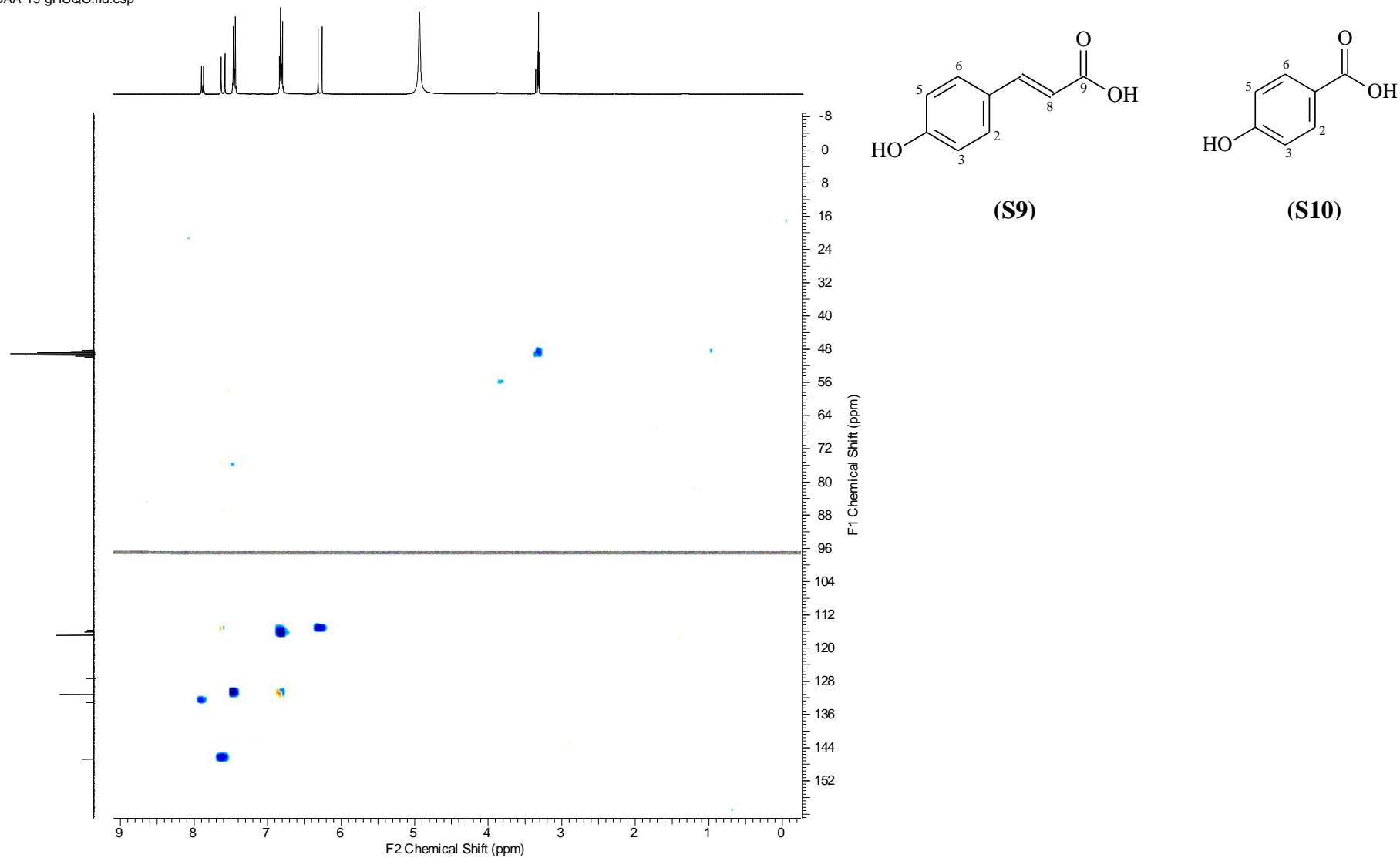
**Figura 87:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) para a mistura **S9+S10**

Figura 88: Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para mistura S9+S10

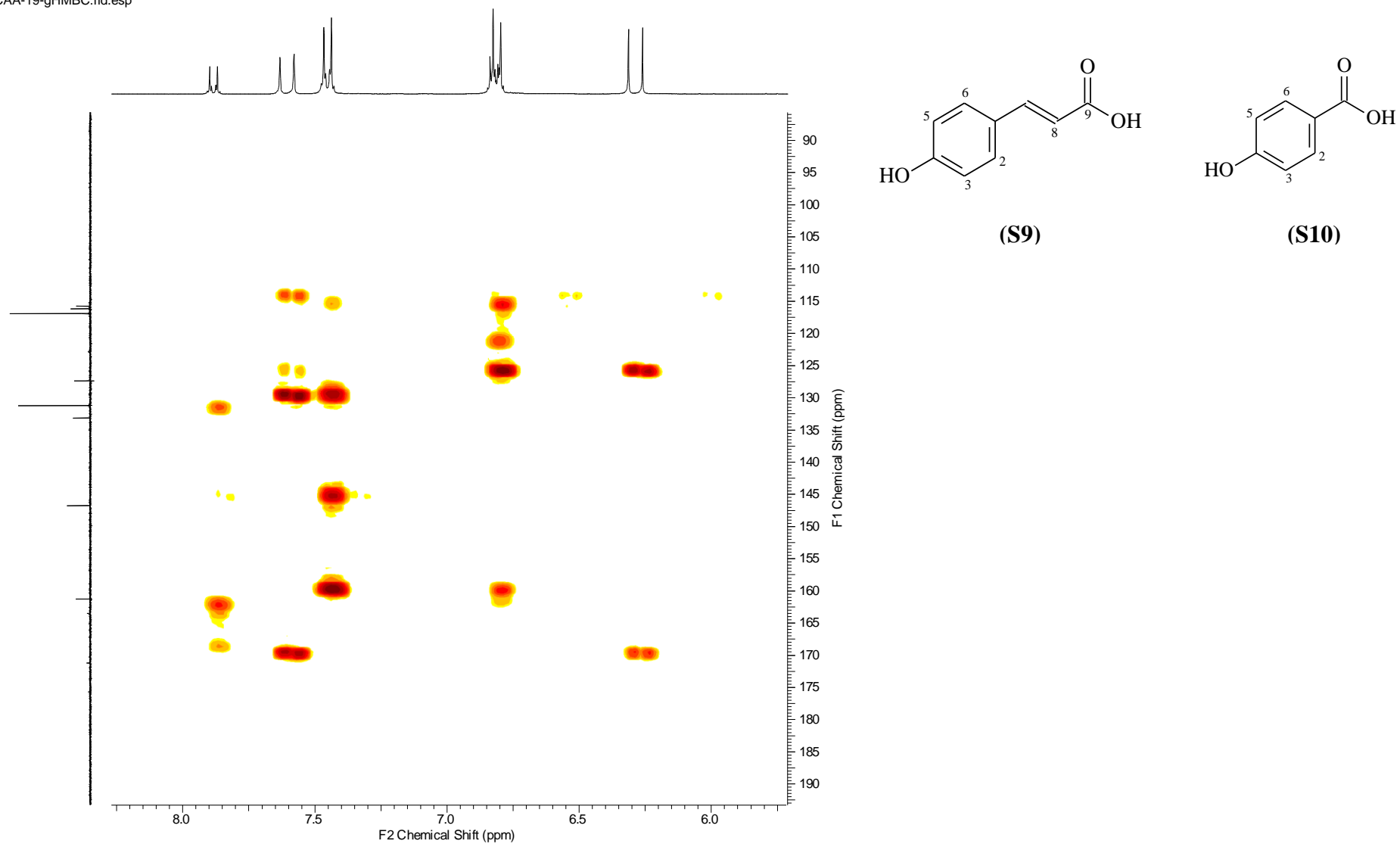
**Figura 90:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para a mistura de substâncias **S9+S10**

CAA-19-gHSQC.fid.esp



**Figura 91:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para a mistura de substâncias **S9+S10**

CAA-19-gHMBC.fid.esp



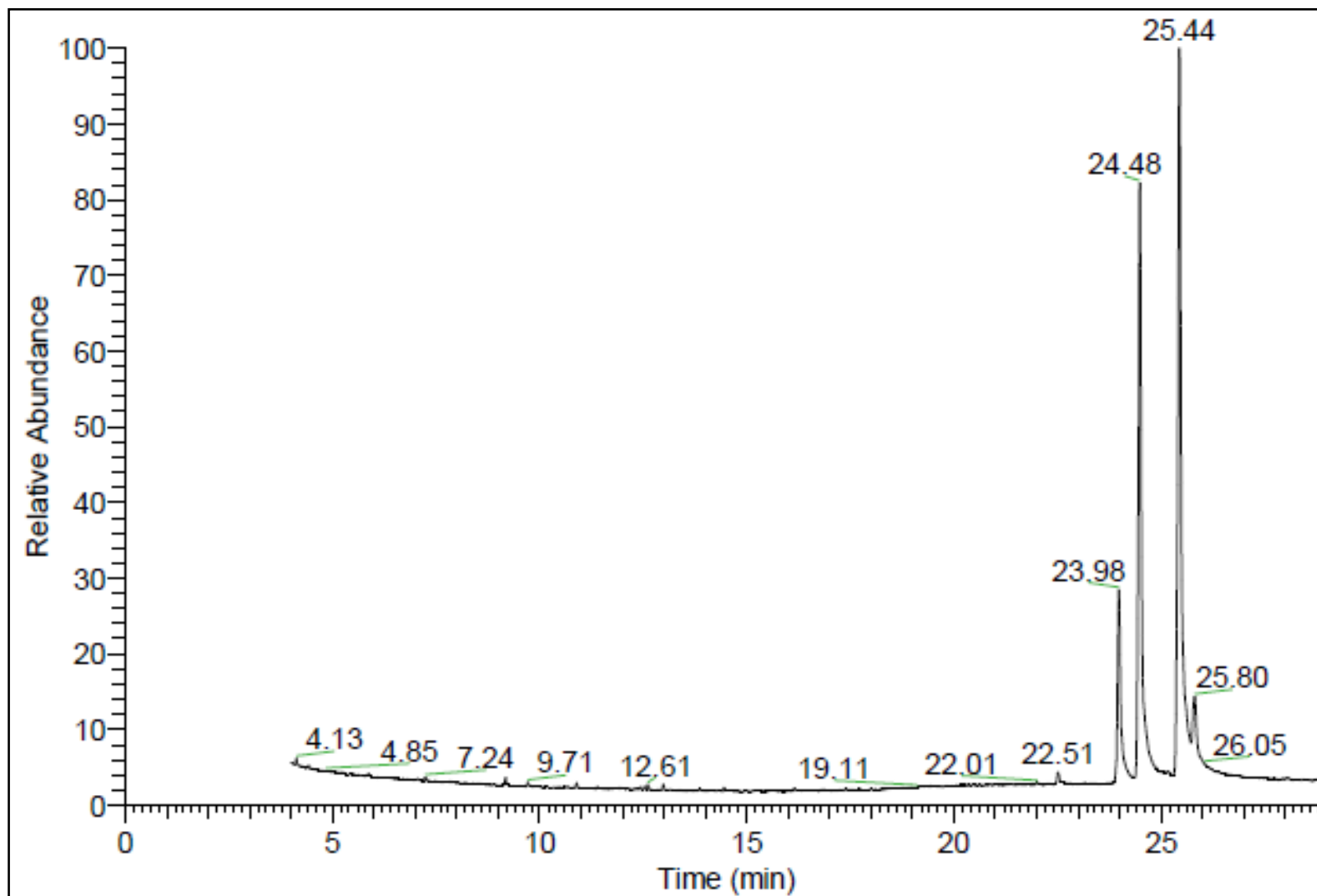
**Figura 94:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura de compostos S1+S2+S3

Figura 95: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto S1

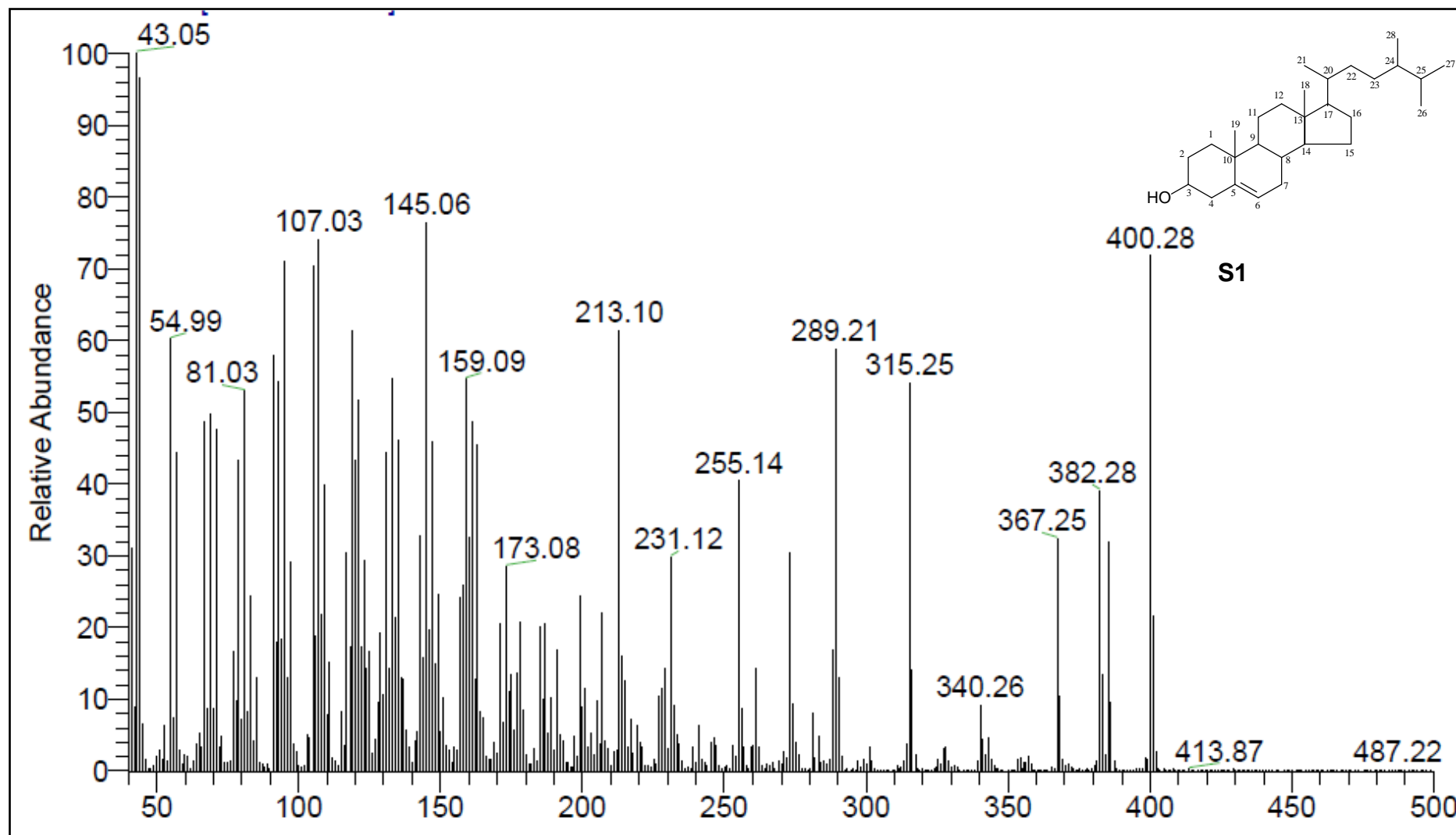
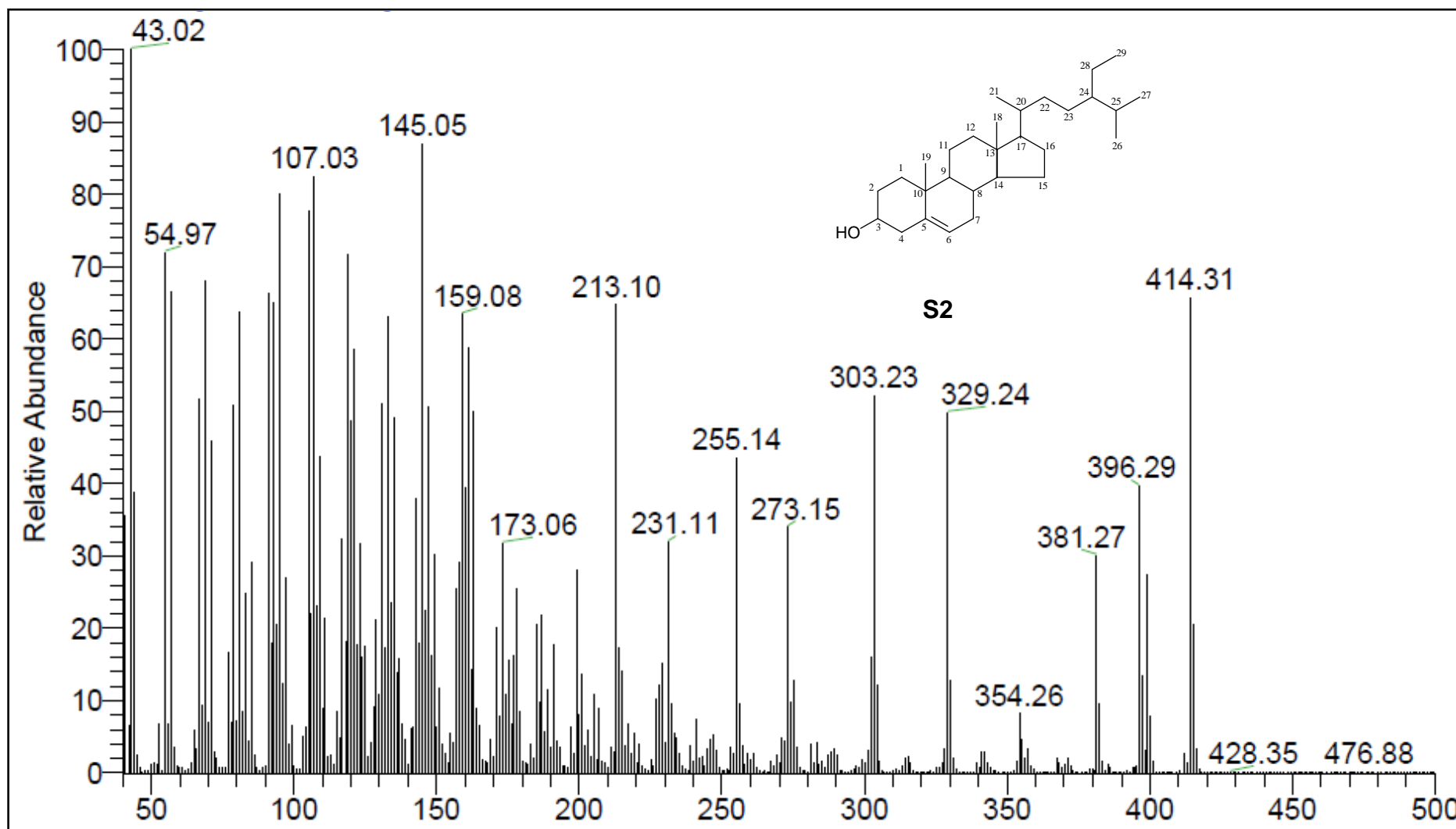
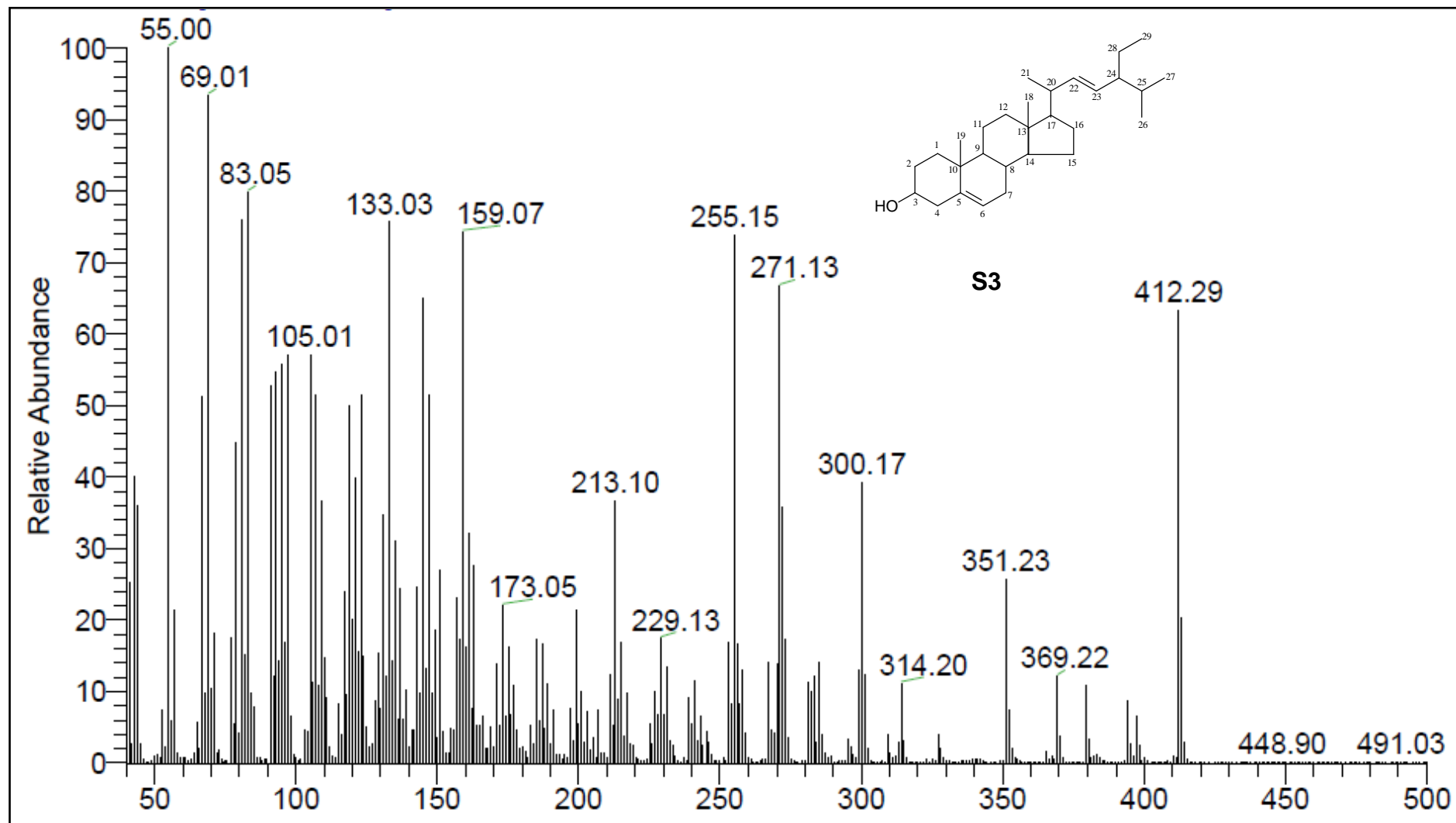
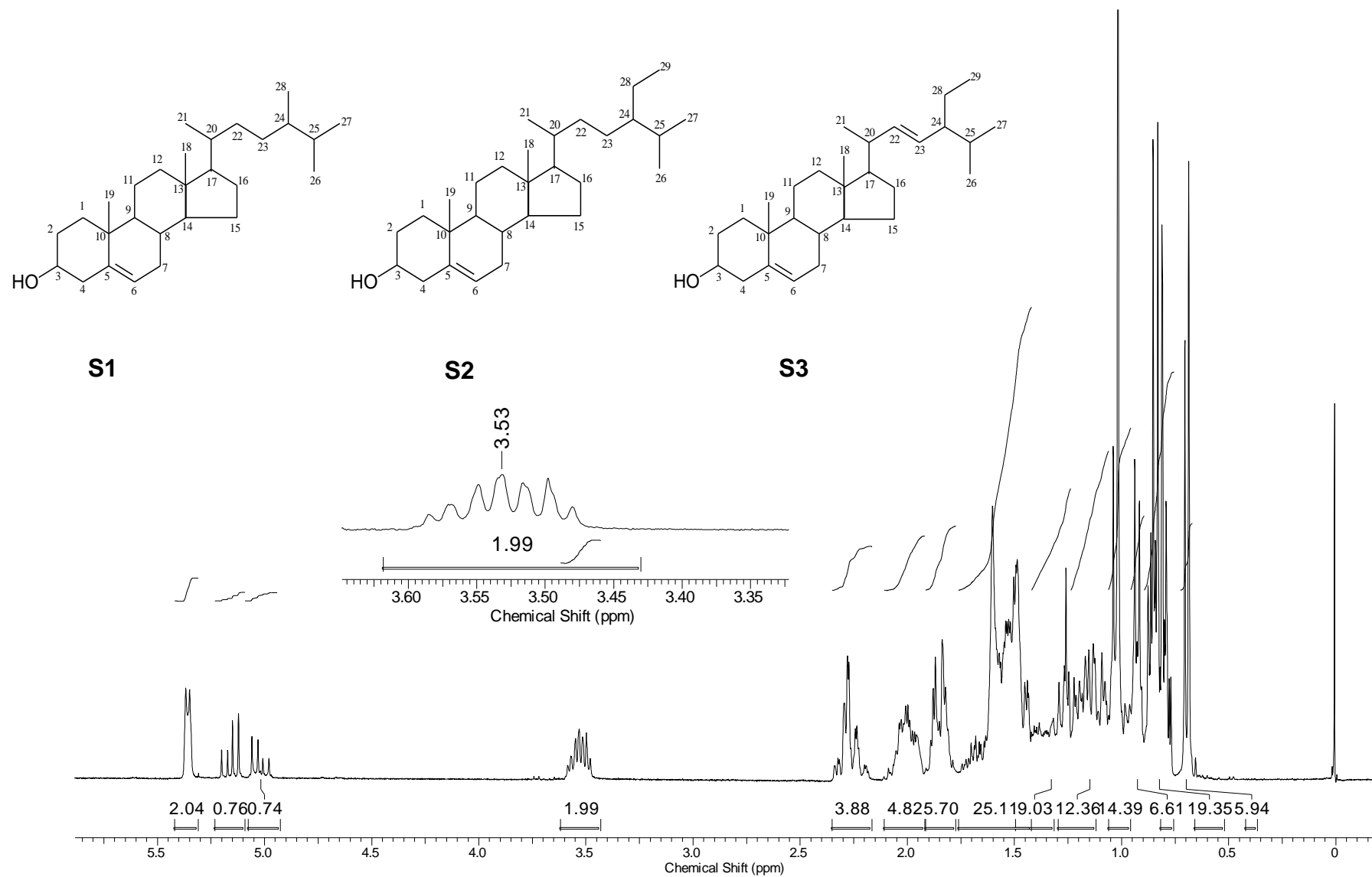




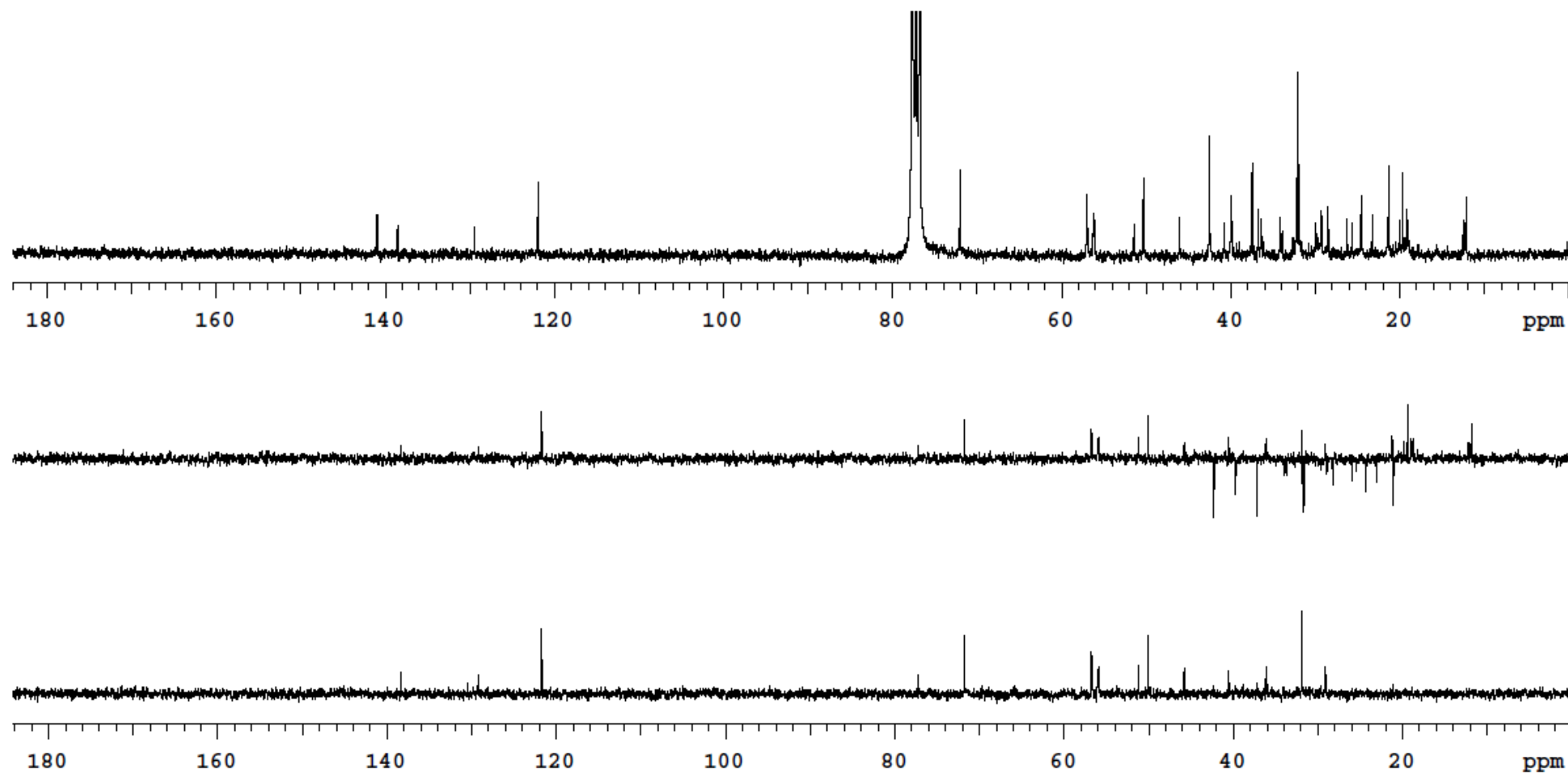
Figura 96: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto S2

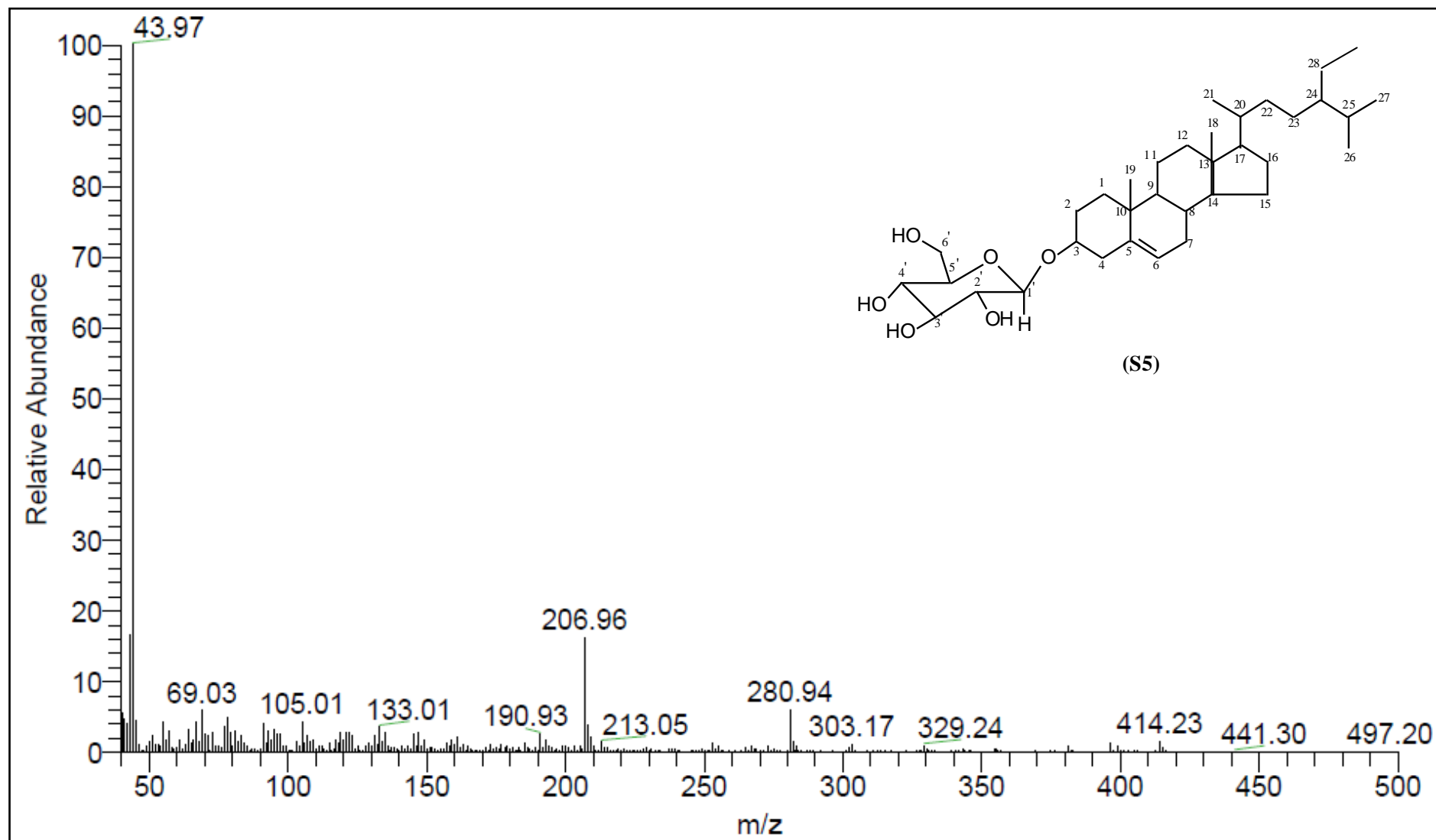


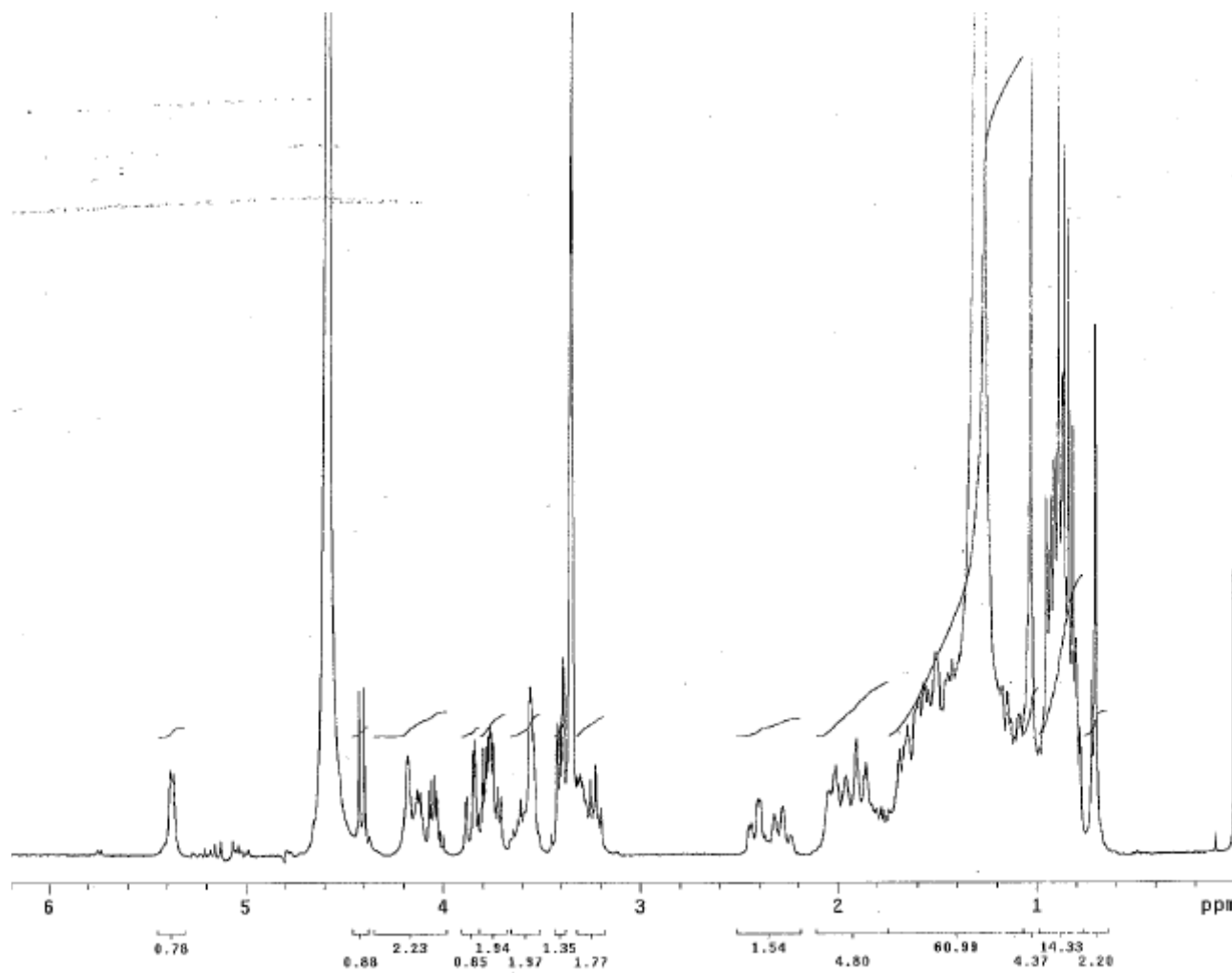
**Figura 97:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S3**

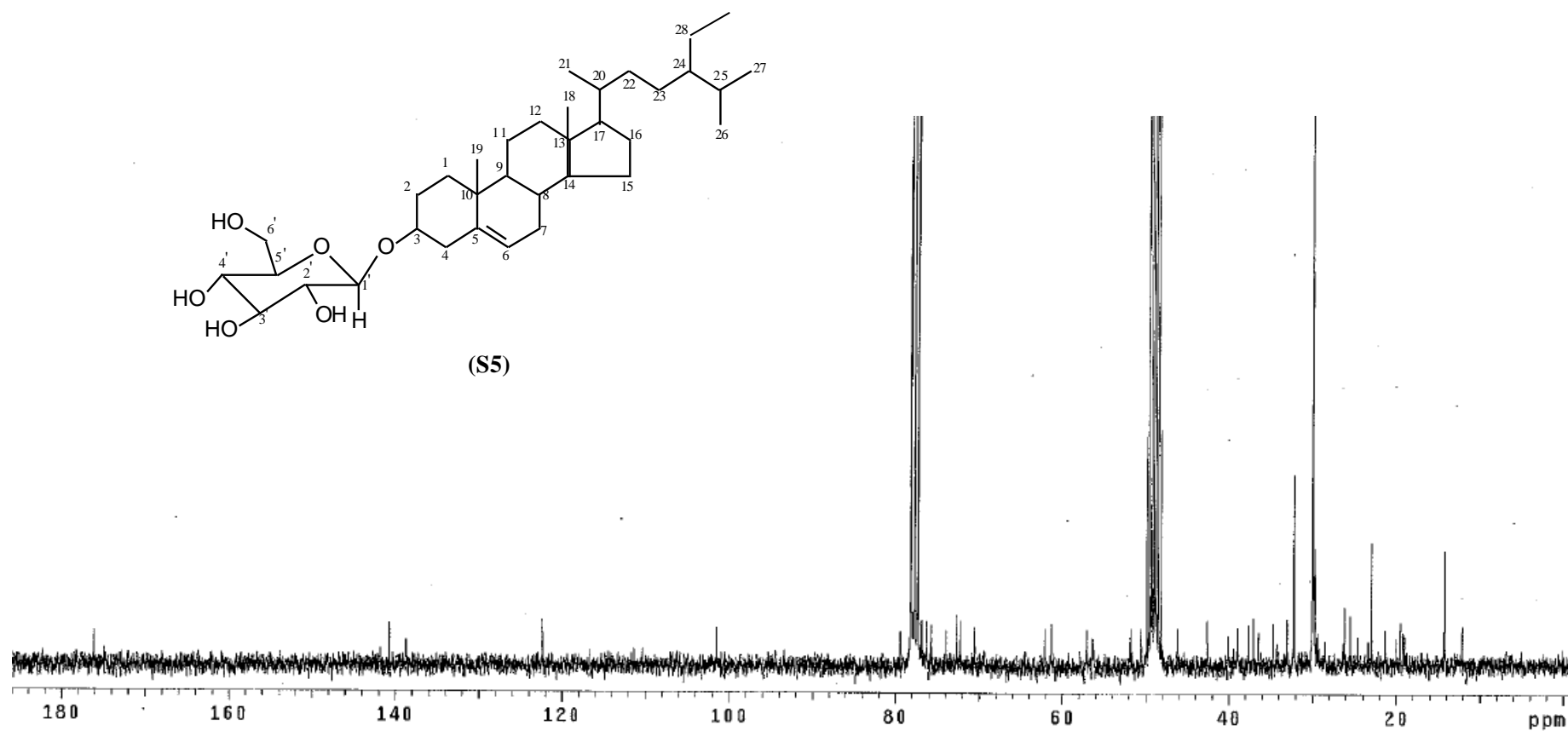
**Figura 98:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) para a mistura de compostos **S1+S2+S3**

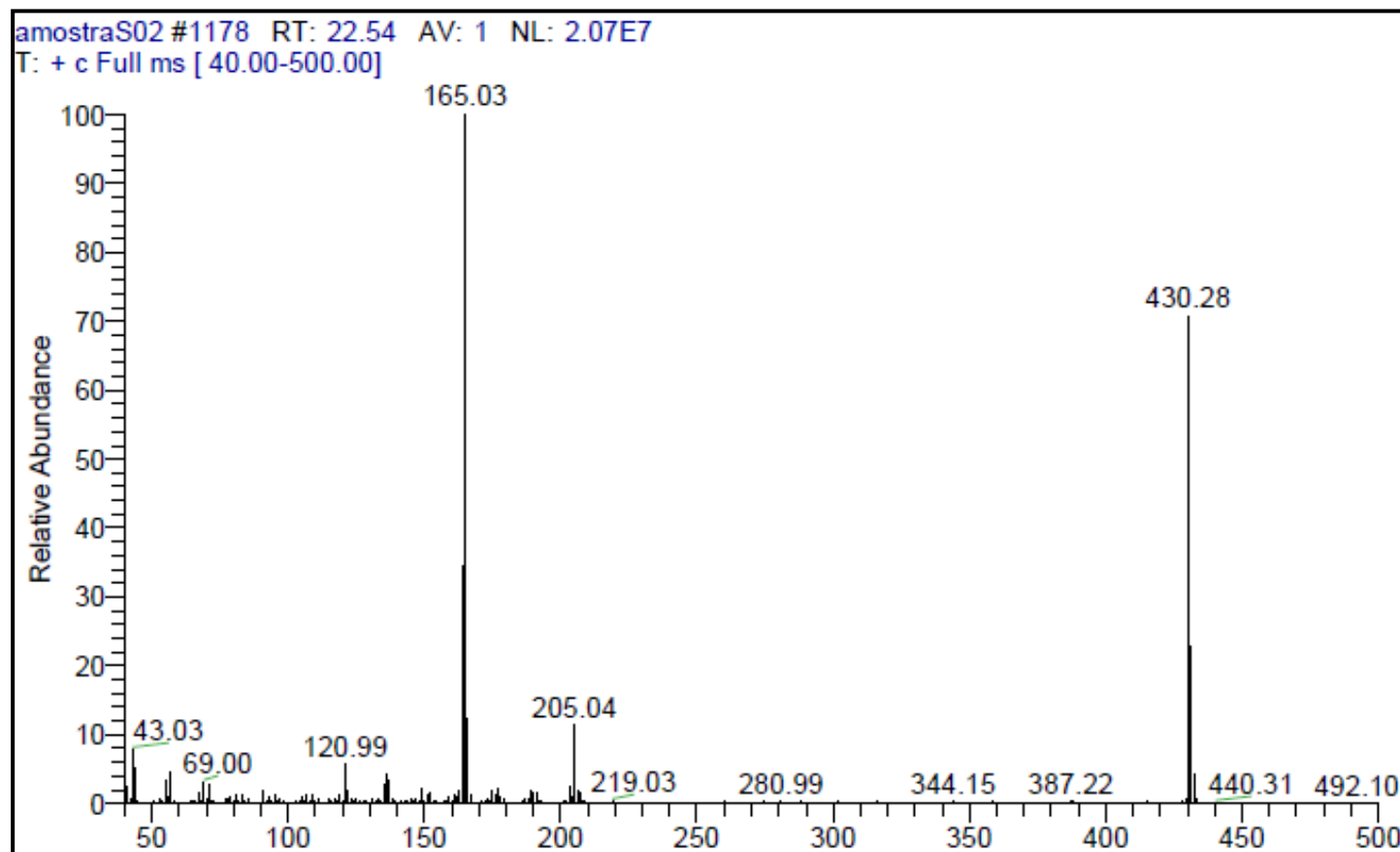
**Figura 99:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (a)/DEPT  $90^\circ$  (b) e  $135^\circ$  (c) ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45 MHz) para a mistura de compostos **S1+S2+S3**



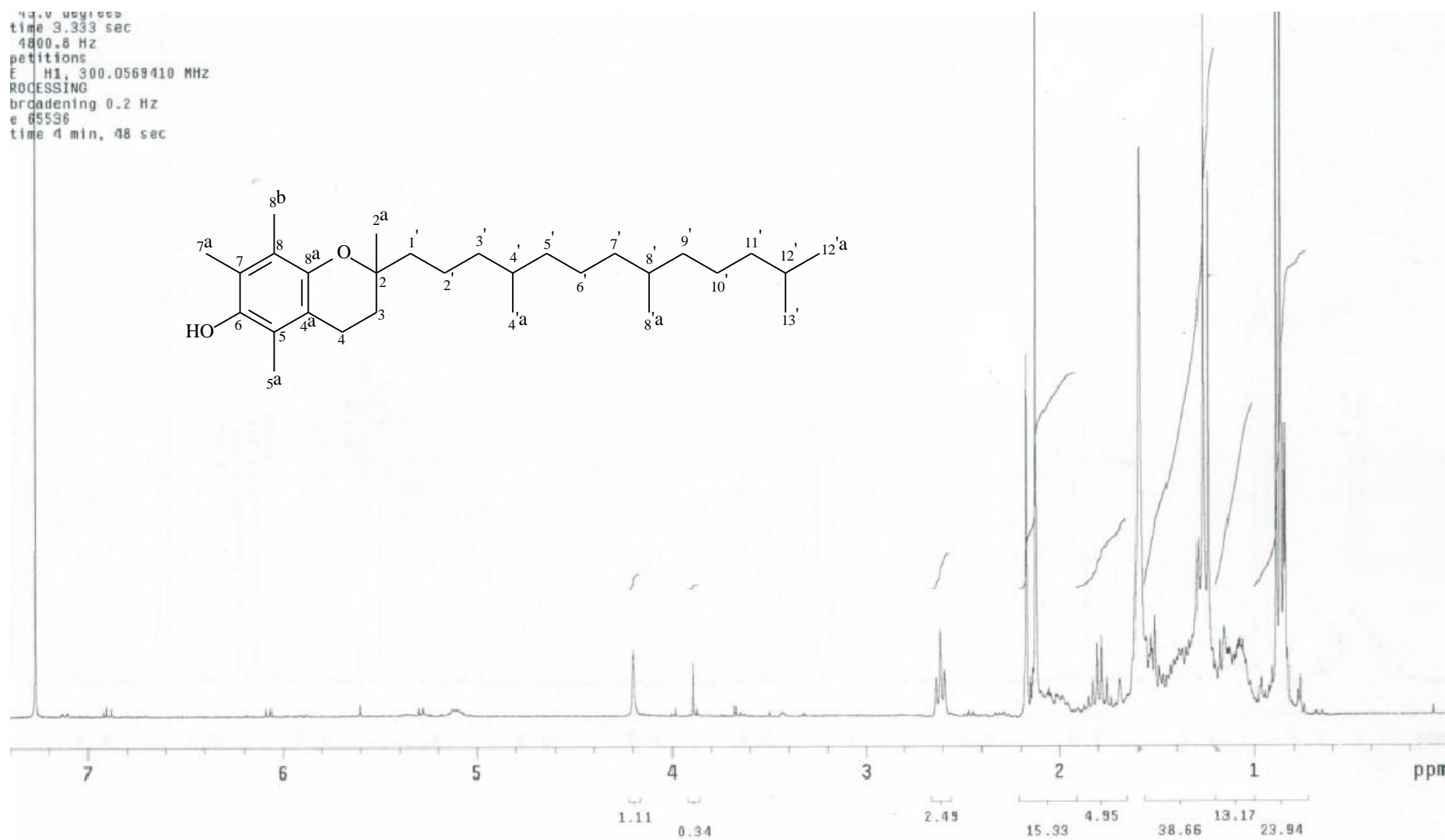
**Figura 100:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S5**

**Figura 101:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) para o composto **S5**

**Figura 102:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,5 MHz) para o composto **S5**

**Figura 103:** Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para o composto **S6**



**Figura 104:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300,06 MHz) para o composto **S6**

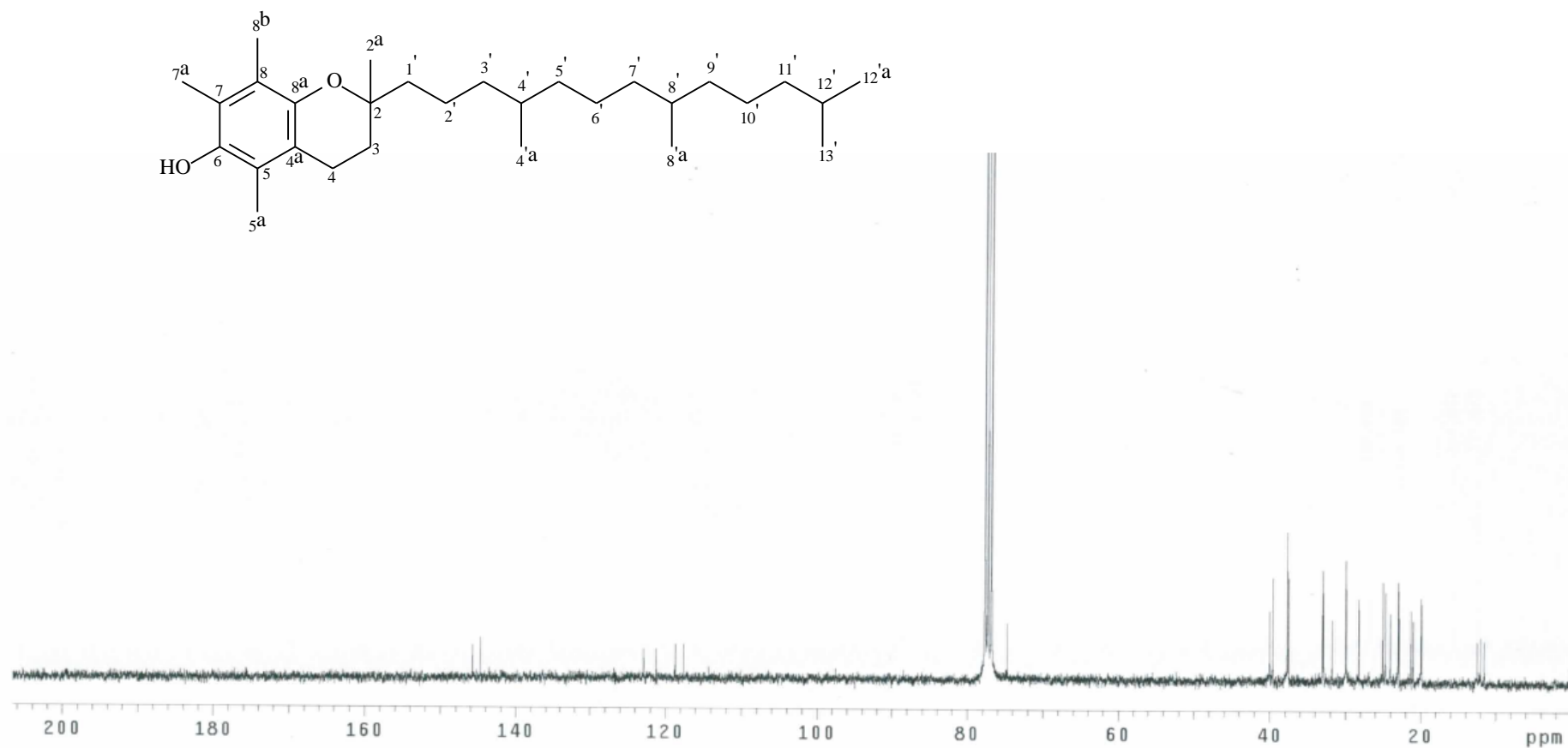
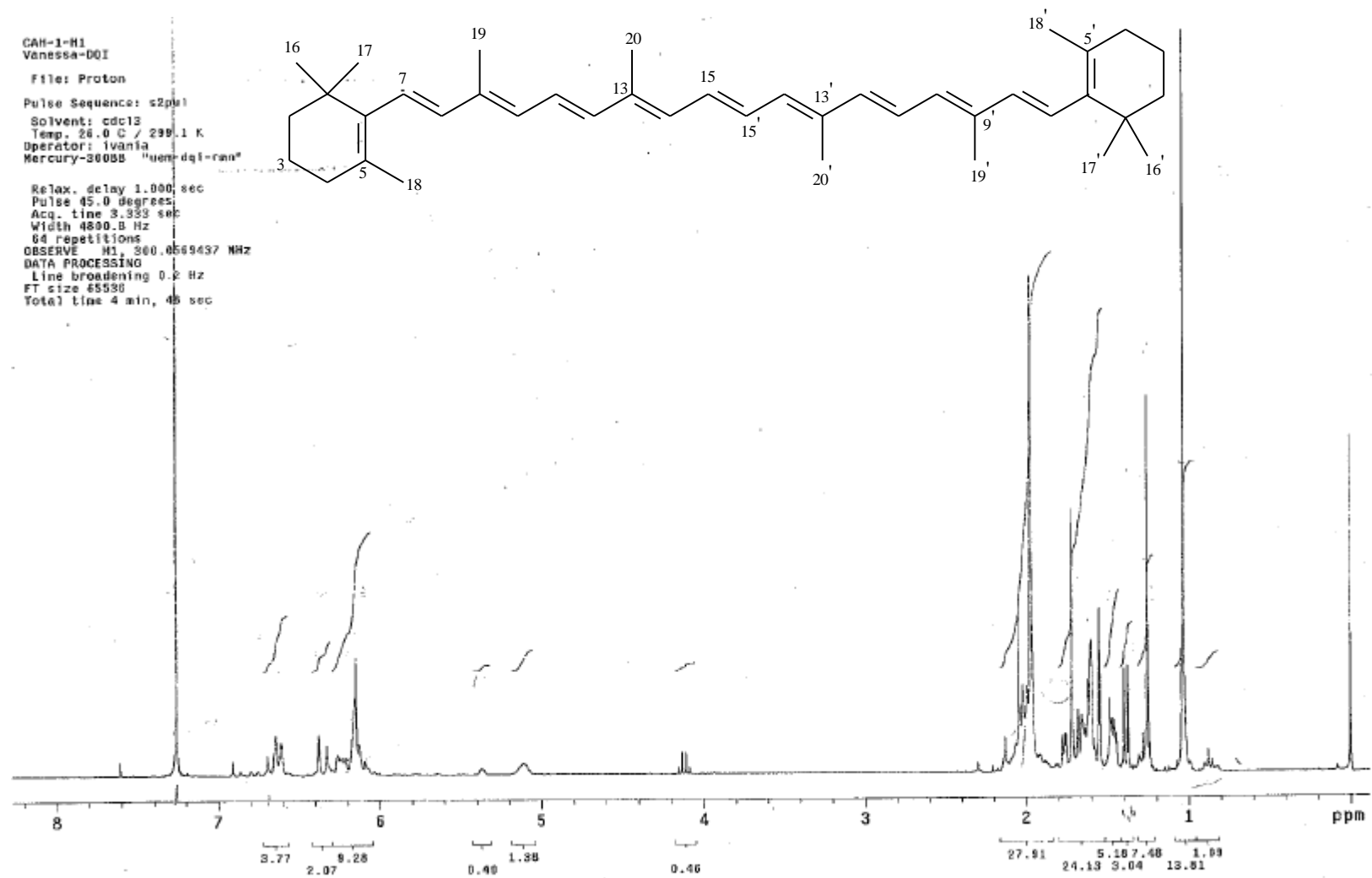
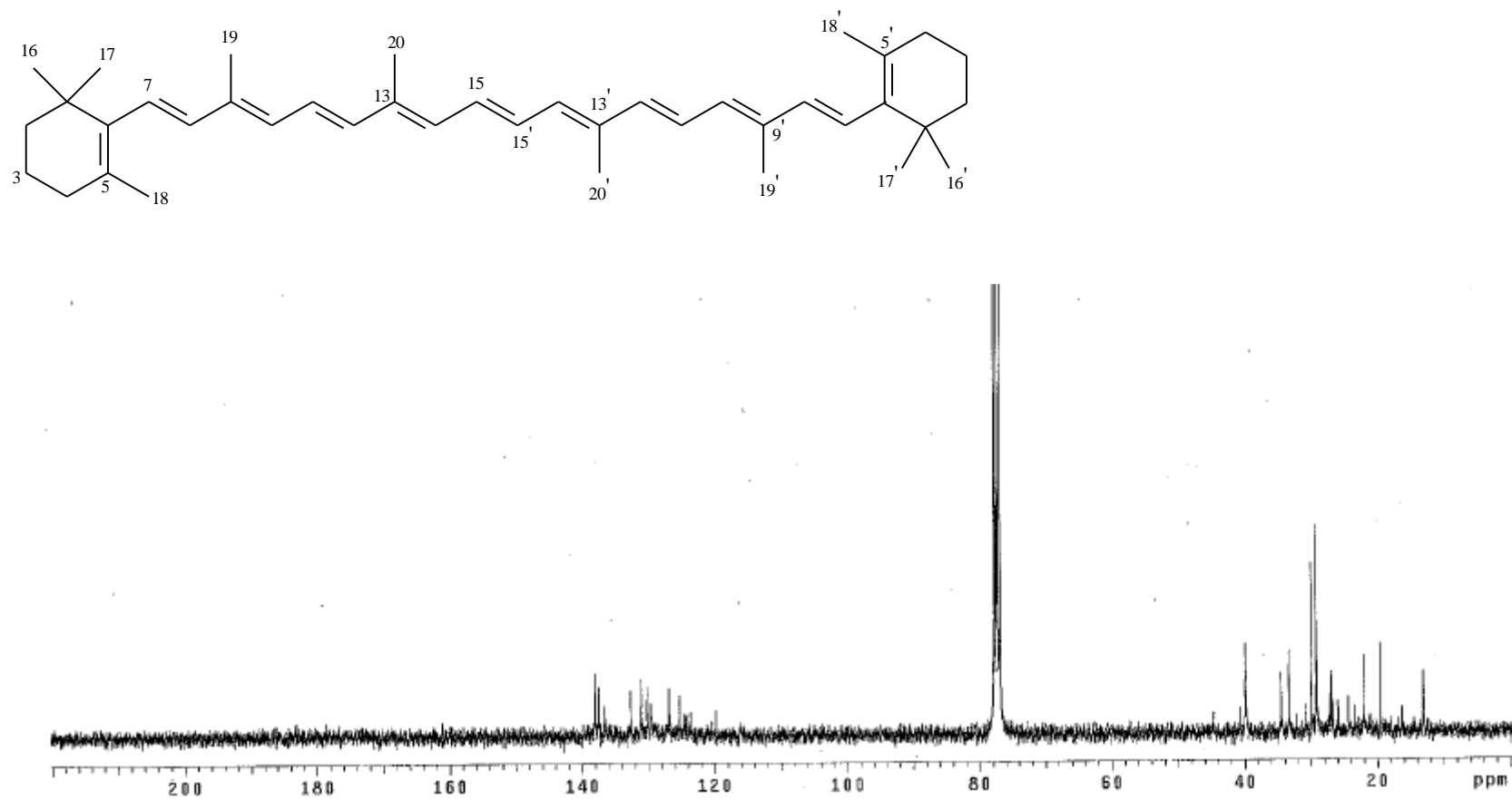
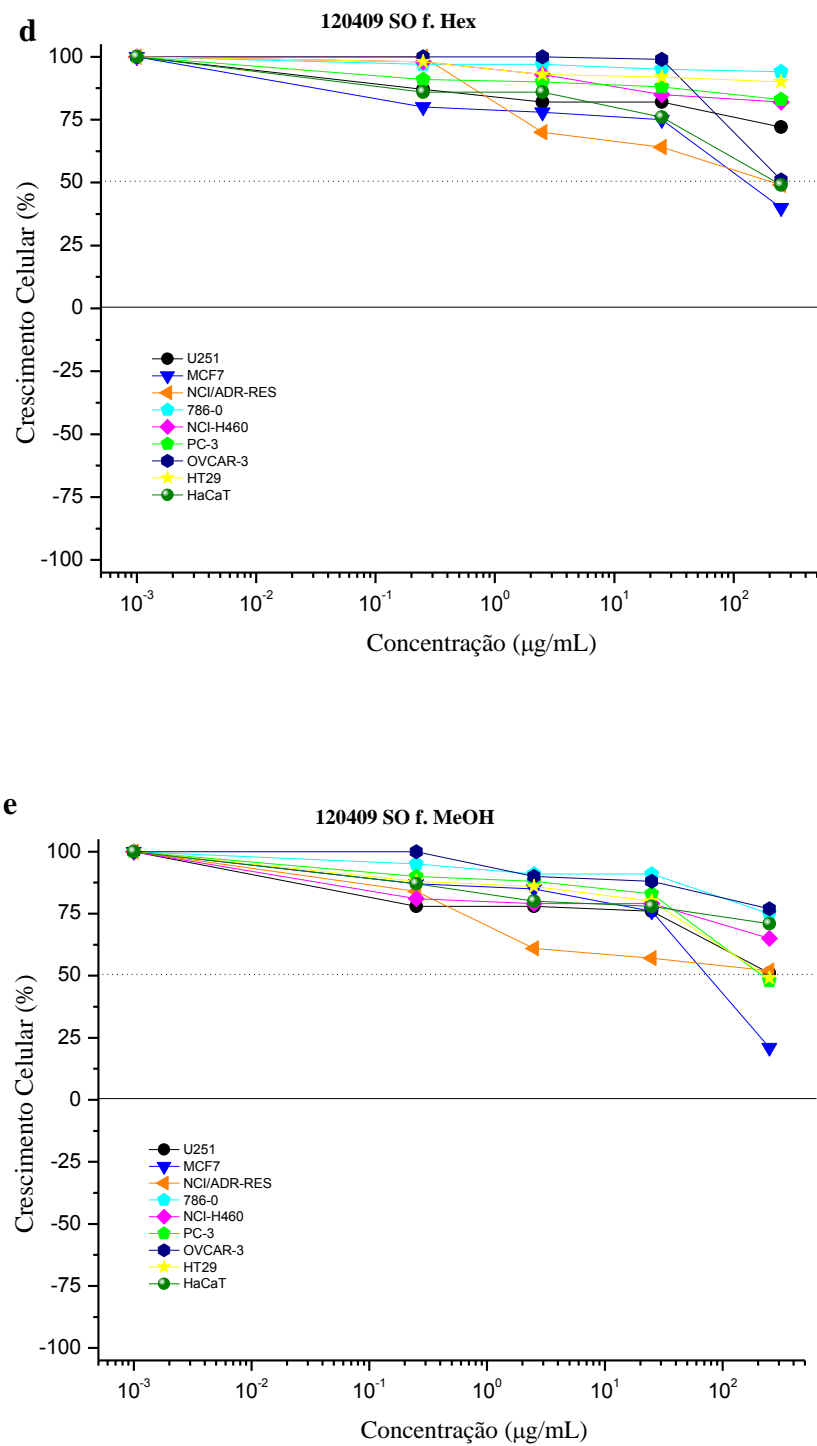
**Figura 105:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz) para o composto **S6**

Figura 107: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300,06 MHz) para o composto S11

**Figura 108:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz) para o composto **S11**

**Figura 110:** Porcentagem de crescimento de células tumorais e não tumorais humanas versus a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio de avaliação de atividade antiproliferativa para (d) fração hexânica, (e) fração metanólica.



**Tabela 24:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*S*)-*N*-(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona **1a**

<b>C</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	<b><math>\delta^1\text{H}</math> (multiplicidade, J Hz)</b>
2	177,2	-
3	49,2	4,60 (dd,9,3; 10,8)
4	29,6	2,24 (m) 2,72 (m)
5	67,2	4,28(ddd, 9,0; 1,8) 4,47(ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	169,4	-
2'	48,2	3,47 (s)
3'	206,4	-
4'	43,6	2,53(t, 6,0)
5'	23,2	1,59(m)
6'	32,3	1,29 (m)
7'	24,1	1,29 (m)
8'	14,3	0,88 (t, 6,0)

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 25:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-decanoil)-homoserina lactona **3a**

<b>C</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	<b><math>\delta^1\text{H}</math> (multiplicidade, J Hz)</b>
2	175,0	-
3	49,0	4,58 (dd,9,3; 10,8)
4	30,0	2,23 (m) 2,74 (m)
5	66,1	4,28 (ddd, 9,0; 1,8) 4,48 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	166,6	-
2'	48,0	3,47 (s)
3'	206,8	-
4'	44,1	2,53(t, 6,0)
5'	23,5	1,56(m)
6'	34,1	1,29 (m)
7'	29,1	1,29 (m)
8'	31,8	1,29 (m)
9'	22,8	1,29 (m)
10'	14,3	0,88 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 26:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona **4a**

<b>C</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	<b><math>\delta^1\text{H}</math> (multiplicidade, J Hz)</b>
2	175,4	-
3	49,3	4,59 (dd,9,3; 10,8)
4	29,3	2,24 (m) 2,69 (m)
5	66,3	4,27 (ddd, 9,0; 1,8) 4,45 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	167,0	-
2'	48,8	3,45 (s)
3'	206,7	-
4'	43,1	2,51 (t, 6,0)
5'	23,7	1,55(m)
6'	32,2	1,24 (m)
7'	29,6	1,24 (m)
8'	32,1	1,24 (m)
9'	29,7	1,24 (m)
10'	29,8	1,24 (m)
11'	22,7	1,24 (m)
12'	14,4	0,86 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 27:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(3-oxo-tetradecanoil)-homoserina lactona **5a**

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J Hz)
2	175,5	-
3	49,5	4,48 (dd,9,3; 10,8)
4	33,6	2,16 (m) 2,55 (m)
5	66,1	4,18 (ddd, 9,0; 1,8) 4,37 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	167,1	-
2'	49,5	3,75 (s)
3'	206,1	-
4'	43,5	2,51 (t, 6,0)
5'	23,3	1,46 (m)
6'	29,3	1,14 (m)
7'	29,3	1,14 (m)
8'	29,3	1,14 (m)
9'	29,3	1,14 (m)
10'	29,3	1,14 (m)
11'	29,3	1,14 (m)
12'	31,8	1,14 (m)
13'	22,6	1,14 (m)
14'	13,9	0,76 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 29:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(hexanoil)-homoserina lactona **1b**

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J Hz)
2	175,8	-
3	49,4	4,58 (dd,9,3; 10,8)
4	31,6	2,15 (m) 2,85 (m)
5	66,3	4,26 (ddd, 9,0; 1,8) 4,47 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	174,8	-
2'	36,3	2,25 (t)
3'	25,3	1,65 (m)
4'	30,8	1,31 (m)
5'	22,6	1,31 (m)
6'	14,1	0,89 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Tabela 30:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para (*R*)-*N*-(decanoil)-homoserina lactona **3b**

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J Hz)
2	176,1	-
3	49,5	4,57 (dd,9,3; 10,8)
4	30,7	2,15 (m) 2,80 (m)
5	66,5	4,28 (ddd, 9,0; 1,8) 4,45 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	174,3	-
2'	36,5	2,24 (t )
3'	25,8	1,62 (m)
4'	28,0	1,25 (m)
5'	29,6	1,25 (m)
6'	29,7	1,25 (m)
7'	29,8	1,25 (m)
8'	32,2	1,25 (m)
9'	23,0	1,25 (m)
10'	14,5	0,87 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,

**Tabela 31:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para (*R*)-*N*-(dodecanoil)-homoserina lactona **4b**

<b>C</b>	<b><math>\delta^1\text{H}</math> (multiplicidade, J Hz)</b>
2	-
3	4,57 (dd,9,3; 10,8)
4	2,15 (m) 2,80 (m)
5	4,28 (ddd, 9,0; 1,8) 4,45 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	-
2'	2,24 (t )
3'	1,62 (m)
4'	1,25 (m)
5'	1,25 (m)
6'	1,25 (m)
7'	1,25 (m)
8'	1,25 (m)
9'	1,25 (m)
10'	0,87 (t, )
11'	
12'	

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 32:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para (*S*)-*N*-(decanoil)-homoserina lactona **5b**

<b>C</b>	<b><math>\delta</math> <math>^1\text{H}</math> (multiplicidade, J Hz)</b>
2	-
3	4,57 (dd,9,3; 10,8)
4	2,14 (m) 2,84 (m)
5	4,29 (ddd, 9,0; 1,8) 4,47 (ddd,10,8; 9,3; 6,6)
1'	-
2'	2,25 (t )
3'	1,62 (m)
4'	1,27 (m)
5'	1,27 (m)
6'	1,27 (m)
7'	1,27 (m)
8'	1,27 (m)
9'	1,27 (m)
10'	0,88 (t, )

( $\delta$ -ppm; 75,5MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  e 300,06MHz para RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

