
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DOUTORADO EM QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
DO SUL E UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUZINÁTIA RAMOS SOARES

**SUBSTÂNCIAS INDUTORAS DE NODULAÇÃO
EM RAÍZES DE FEIJOEIRO PRESENTES NO
EXSUDATO DE SEMENTES DE *MIMOSA*
*FLOCCULOSA***

CAMPO GRANDE – MS
MAIO/2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DOUTORADO EM QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL E UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

LUZINÁTIA RAMOS SOARES

**SUBSTÂNCIAS INDUTORAS DE NODULAÇÃO EM RAÍZES
DE FEIJOEIRO PRESENTES NO EXSUDATO DE SEMENTES
DE *MIMOSA FLOCCULOSA***

Tese apresentada ao Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química da Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Química, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob orientação do **Prof. Dr. Walmir Silva Garcez.**

**CAMPO GRANDE – MS
MAIO/2011**

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que ainda iremos ser... mas, graças a Deus, não somos mais o que éramos.”

Martin Luther King

Dedico este trabalho...

A meus pais, Luiz Ramos (*in memoriam*) e Benedita Mendes Ramos (*Dina*), que através do amor, sabedoria, discernimento e serenidade obtiveram sucesso na educação dos filhos, mesmo diante de todas as adversidades.

Ao meu amado esposo, Aloízio de Oliveira Soares, alicerce da nossa família, que soube entender as minhas ausências, mudanças de humor e chateações que passei neste período e que a cada tropeço, me deu forças para continuar.

Ao meu filho, Miguel Ramos Soares, meu bem mais valioso, motivo de muita alegria, entusiasmo e paixão pela vida.

Enfim, a toda minha família pela força, incentivo e colaboração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, infinitamente bom, que me concedeu o benefício deste aprendizado.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, pela oportunidade oferecida desde o início, ensinando-me os primeiros passos na fitoquímica durante a iniciação científica. Depois a oportunidade de realizar o mestrado e o doutorado sob sua orientação. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e, principalmente, pela confiança depositada em mim, essencial na formação profissional que adquiri ao longo desses anos de trabalho.

Ao meu esposo, Aloízio de Oliveira Soares, pelo seu apoio irrestrito, pela sua paciência, dedicação, compreensão e amor que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu filho, Miguel Ramos Soares, por “compreender” a importância deste trabalho, cedendo-me parte de nosso tempo de convivência para a sua realização.

À minha família, em especial a minha mãe, Benedita Mendes Ramos (Dina) e minha irmã Laudinéia Christian Ramos, pelo amor, incentivo, força e, principalmente, por cuidarem do meu filho, Miguel, nos momentos em que precisei ficar ausente.

À amiga, Patrícia de Oliveira Figueiredo, pela competência, agilidade e iniciativa durante realização das pesquisas de laboratório, também, pela atenção, carinho e, principalmente, pelas constantes demonstrações de amizade. Sua participação neste trabalho foi imprescindível!

Ao Dr. Fábio Martins Mercante, pesquisador da Embrapa CPAO, pelo trabalho em conjunto, supervisionando os ensaios biológicos, pela presteza e ajuda quando necessária.

Ao Vladimir Ilchenko, técnico da Embrapa CPAO, pela realização dos ensaios biológicos.

À Dra. Denise Brentan da Silva, pela obtenção dos espectros de massa de alta resolução.

Ao técnico Luiz Leonardo de Souza Viana e à Dra. Lidilhone Hamerski Carbonezi, pelas instruções e auxílio dispensados durante o manuseio do CLAE.

À Alene Cortes de Queiroz e Silva, bolsista de iniciação científica, com quem tive grande prazer de trabalhar durante mais de dois anos, pela amizade, presteza e ajuda quando necessária.

À Dra. Edilene Delphino Rodrigues, pela valorosa amizade, carinho, incentivo e pela prontidão que sempre teve para ajudar na formatação e fazer revisão crítica dessa tese.

À Maria José de Camargo, companheira de estudo e de laboratório desde a graduação, pela amizade durante todos esses anos convívio.

À técnica *MSc.* Luciana Marçal Ravaglia pela obtenção de parte dos espectros de RMN contidos nesta tese e pelas medidas de rotação óptica das substâncias.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa 1 (LP-1), que acompanharam o desenvolvimento desta tese, pelas conversas, ajuda e momentos de descontração.

Ao Dr. Joaquim Corsino e à Prof^ª. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez pela contribuição na minha formação.

Aos Secretários da Graduação e da Pós-Graduação do Departamento de Química, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À FUNDECT e a CAPES pelas Bolsas de Estudo concedidas e, também, pelo auxílio financeiro durante a realização desta tese.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, através do Programa de Capacitação de Docentes, por conceder quatro anos de afastamento integral para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o bom andamento desta tese.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE FLUXOGRAMAS	VI
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ESPECTROS	VII
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Cultura do Feijão x Fixação de Nitrogênio	1
1.1.1 - Troca de sinais moleculares na interação rizóbio-leguminosa	2
1.1.2 - Associação de estirpes de rizóbio com moléculas bioativas para melhoria da produtividade do feijoeiro.....	3
1.2 - O Cerrado brasileiro e a família Leguminosae	4
1.3 - O gênero <i>Mimosa</i> e a espécie <i>Mimosa flocculosa</i> Burkart	5
2 - OBJETIVOS	8
2.1 - Objetivos Gerais.....	8
2.2 - Objetivos Específicos.....	8
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	9
3.1 - Procedimento Experimental do Estudo Químico.....	9
3.1.1 - Material e equipamentos utilizados	9
3.1.2 - Obtenção do exsudato das sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> e do extrato metanólico.....	10
3.2 - Isolamento das substâncias 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	11
3.3 - Obtenção dos extratos metanólicos das fases butanólica e acetato de etila	12
3.4 - Isolamento das substâncias 7, 8 e 9.....	13
3.5 - Procedimento experimental do ensaio biológico	14
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 - Substância 1	17
4.2 - Substância 6	30
4.3 - Substância 5	40
4.4 - Substância 3	48
4.5 - Substância 8	52
4.6 - Substância 9	65
4.7 - Ensaio Biológico	71
5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

O processo de fixação biológica de nitrogênio consiste na associação de rizóbios (bactérias presentes no solo) com as raízes das leguminosas, numa relação de simbiose. Estas bactérias, quando em contato com as raízes da leguminosa, induzem a formação de nódulos e no interior destes ocorre o processo de aproveitamento do nitrogênio do ar. Resultados experimentais demonstraram incrementos na nodulação inicial do feijoeiro mediante a adição de exsudatos de sementes de determinadas leguminosas, como *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. Esta Tese contempla o estudo químico do exsudato de sementes da espécie *Mimosa flocculosa* e a avaliação dos efeitos deste exsudato e dos compostos químicos isolados na indução do gene *nodA* da estirpe de *Rhizobium tropici* modificado CIAT899/pGUS32. As sementes de *Mimosa flocculosa* foram submetidas às condições apropriadas para a obtenção do exsudato, o qual foi liofilizado e o resíduo extraído com MeOH, resultando no extrato metanólico do exsudato. Este foi submetido à separação de seus componentes por métodos cromatográficos, levando ao isolamento de nove substâncias, ³N-(2,6-dimetil-4-heptil)-uridina (**1**), uridina (**6**), 2,6-dimetil-4-(4-hidroxifenil)-heptano (**5**), valina (**3**) e os alcalóides aporfínicos (+)-6aS-6R-N-óxido ocoteína (**8**) e (+)-6aS-6S-N-óxido ocoteína (**9**) e três substâncias que não tiveram as suas estruturas elucidadas completamente (**2**, **4** e **7**). As substâncias **1** e **8** são inéditas na literatura e a **5** foi relatada apenas como produto de síntese. A avaliação da indução do gene *nodA* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) foi realizada frente às substâncias **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **8** e **9**. Foi observado um aumento gradual na atividade indutora da expressão do gene *nodA* com o aumento na concentração das substâncias, mas em pequenas quantidades. Ainda que estes resultados sejam inferiores ao potencial indutor do gene *nodA* da mistura de exsudatos de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa flocculosa* (1:3) todas as substâncias avaliadas foram consideradas indutoras.

ABSTRACT

The process of biological nitrogen fixation consists of the association of rhizobia (bacteria in the soil) with the roots of legumes, a symbiotic relationship. These bacteria, when in contact with the roots of legumes, induce the formation of nodules and within these, the process of utilization of nitrogen from the air takes place. Experimental results showed increases in initial nodulation of bean by the addition of seed exudates of some legumes such as *Mimosa flocculosa* and *Leucaena leucocephala*. This Thesis contemplates the study of chemical exudates from seeds of *Mimosa flocculosa* species and evaluation of the effects of exudate and the chemical compounds isolated in the induction of gene *nodA* of *Rhizobium tropici* CIAT899/pGUS32 modified. The seeds of *Mimosa flocculosa* were submitted to appropriate conditions in order to obtain the exudate, which was lyophilized and the residue extracted with MeOH, resulting in the methanolic extract of the exudate. This solution was then submitted to separation of its components by chromatographic methods, leading to the isolation of nine compounds, ³N-(2,6-dimethyl-4-heptyl)-uridine (**1**), uridine (**6**), 2,6-dimethyl-4-(4-hydroxyphenyl)-heptane (**5**), valine (**3**) and the aporphine alkaloids (+)-6a*S*-6*R*-ocoteine N-oxide (**8**) and (+)-6a*S*-6*S*-N-oxide ocoteine (**9**) and three substances (**2**, **4** and **7**) which structures were not fully elucidated. Compounds **1** and **8** are new compounds and **5** was reported only as a synthetic product. Evaluation of gene induction *nodA* strain CIAT 899 (pGUS 32) was carried out with substances **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **8** and **9**. The results indicated a gradual increase in activity that induces gene expression *nodA* with increasing concentration of substances, although with a lower potential of inducing gene *nodA* than that of the mixture of seed exudates of *Phaseolus vulgaris* and *Mimosa flocculosa* (1:3).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- $[\alpha]_D^T$ – Rotação óptica específica a T(°C)
ACN – Acetonitrila
AcOEt – Acetato de etila
CD₃OD – Metanol deuterado
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY – “Correlation spectroscopy”
d – Dupleto
D₂O – Água deuterada
dd – Duplo dupleto
ddl – Duplo dupleto largo
DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
dt – Duplo tripleto
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Avançada
EMBRAPA CPAO – Empresa Brasileira de Pesquisa Avançada - Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste
Gene *nod* – Genes da nodulação
HMBC – “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
HR-ESIMS – “High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry”
HSQC – “Heteronuclear Single Quantum Coherence”
Hz – Hertz
J – Constante de Acoplamento
m – Multipleteo
MeOH – Metanol P.A.
MHz – Megahertz
MM – Meio mínimo
n-BuOH – n-Butanol
NOESY – “Nuclear Overhauser effect spectroscopy”
ppm – Partes por milhão
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN 1D – Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN 2D – Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
rpm – Rotação por minuto
s – Singleto
SDS – Sódio dodecil sulfato
sl – Singleto largo
T – Temperatura
t – Tripleto
TMS – Tetrametilsilano
UM – Unidade Miller
UV – Ultravioleta
V – Volume
YM – Extrato de levedura malte
 δ – Deslocamento químico em partes por milhão
 λ – Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da troca de sinais moleculares na interação rizóbio-leguminosa (Spaink, 1994, modificado).....	3
Figura 2 -	Distribuição do gênero <i>Mimosa</i> dentro do Cerrado do Brasil (Simon e Proença, 2000-modificado).....	5
Figura 3 -	<i>Mimosa flocculosa</i> Burkart.....	6
Figura 4 -	Região de ocorrência da espécie <i>Mimosa flocculosa</i> Burkart.....	6
Figura 5 -	Flores de <i>Mimosa flocculosa</i> Burkart.....	7
Figura 6 -	Esquema da microplaca de 96 poços indicando o protocolo utilizado para a execução do ensaio de determinação da atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 , obtidas de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> , em 23, 90 e 115 h.....	15
Figura 7 -	Algumas correlações observadas no experimento de HMBC para o composto 1	20
Figura 8 -	Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9 , obtidas de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> , em 23 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).	71
Figura 9 -	Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9 , obtidas de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> , em 90 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).	72
Figura 10 -	Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9 , obtidas de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> , em 115 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).	72
Figura 11 -	Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899 (pGUS32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9 , obtidas de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> , em 23, 90 e 115 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de substâncias indutoras). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.....	73
Figura 12 -	Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes <i>nod</i> da estirpe CIAT 899(pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes <i>Phaseolus vulgaris</i> (F), <i>Mimosa flocculosa</i> (M) e <i>Leucena leucocephala</i> (L) (Mercante & Franco, 2000).....	74

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 -	Obtenção do exsudato das sementes de <i>Mimosa flocculosa</i>	10
Fluxograma 2 -	Obtenção e fracionamento do extrato metanólico do exsudato obtido do exsudato das sementes de <i>Mimosa flocculosa</i>	11
Fluxograma 3 -	Partição do exsudato das sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> e fracionamento do extrato metanólico da fase butanólica.	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frações obtidas da filtração da fração MFBM (375,9 mg).....	14
Tabela 2 -	Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H de 1 (300/75 MHz).	18
Tabela 3 -	Correlações observadas no experimento NOESY de 1 (300 MHz).	19
Tabela 4 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da parte glicosídica da substância 1 e do nucleosídeo uridina (Phillips <i>et al.</i> , 1997).....	20
Tabela 5 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1 e do nucleosídeo uridina (Phillips <i>et al.</i> , 1997) e correlações observadas no experimento HMBC de 1 (300/75 mHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	22
Tabela 6 -	Correlações observadas no experimento NOESY de 6 (300 MHz).	31
Tabela 7 -	Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H de 6 (300/75 MHz).	31
Tabela 8 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 6 e dados de RMN de ^{13}C da substância 1 (300/75 mHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	32
Tabela 9 -	Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H de 5 (300/75 MHz).	41
Tabela 10 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 5 (300/75 mHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	42
Tabela 11 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 3 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$) e da L - valina ($\text{D}_2\text{O} + \text{DCl}$).....	49
Tabela 12 -	Correlações observadas no experimento NOESY de 8 (300 MHz).	55
Tabela 13 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	57
Tabela 14 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 9 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$) e dados de RMN ^{13}C da (<i>rel.</i>)-6a-(S)-6-(S)- ocofeína-N-óxido (CDCl_3).	67

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 -	Dados de RMN ^1H de 1 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	23
Espectro 2 -	Dados de RMN ^{13}C de 1 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	24
Espectro 3 -	Experimento de HSQC de 1 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	25
Espectro 4 -	Experimento de HMBC de 1 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	26
Espectro 4a -	Expansão do espectro de HMBC de 1 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	26
Espectro 4b -	Expansão do espectro de HMBC de 1 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$)	27
Espectro 4c -	Expansão do espectro de HMBC de 1 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	27
Espectro 5 -	Experimento de COSY ^1H - ^1H de 1 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	28
Espectro 5a -	Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de 1 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	28
Espectro 6 -	Experimento de NOESY de 1 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	29
Espectro 7 -	Dados de RMN ^1H de 6 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	33
Espectro 8 -	Dados de RMN ^{13}C de 6 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	34
Espectro 9 -	Espectro de ^{13}C (DEPT 135°) de 6 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	35
Espectro 10 -	Experimento de HSQC de 6 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	36
Espectro 11 -	Experimento de HMBC de 6 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	37
Espectro 11a -	Expansão do espectro de HMBC de 6 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	37
Espectro 12 -	Experimento de COSY ^1H - ^1H de 6 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	38
Espectro 12a -	Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de 6 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	38
Espectro 13 -	Experimento de NOESY de 6 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	39
Espectro 14 -	Dados de RMN ^1H de 5 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	43
Espectro 15 -	Dados de RMN ^{13}C de 5 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	44
Espectro 16 -	Experimento de HSQC de 5 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	45
Espectro 16a -	Expansão do espectro de HSQC de 5 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	45
Espectro 17 -	Experimento de HMBC de 5 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	46
Espectro 18 -	Experimento de COSY ^1H - ^1H de 5 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	47
Espectro 18a -	Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de 5 (300 MHz, CD_3OD , TMS).	47
Espectro 19 -	Dados de RMN ^1H de 3 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	50

Espectro 20 -	Dados de RMN ^{13}C de 3 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	51
Espectro 21 -	Dados de RMN ^1H de 8 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	58
Espectro 22 -	Dados de RMN ^{13}C de 8 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	59
Espectro 23 -	Experimento de HSQC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	60
Espectro 23a -	Expansão do espectro de HSQC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	60
Espectro 24 -	Experimento de HMBC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	61
Espectro 24a -	Expansão do espectro de HMBC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	61
Espectro 24b -	Expansão do espectro de HMBC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	62
Espectro 25 -	Experimento de NOESY de 8 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	62
Espectro 25a -	Expansão do espectro de NOESY de 8 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).	63
Espectro 26 -	Espectro de massa (HRESIMS, modo positivo) de 8	64
Espectro 27 -	Dados de RMN ^1H de 9 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	68
Espectro 28 -	Dados de RMN ^{13}C de 9 (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	69
Espectro 29 -	Experimento de HSQC de 9 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	70
Espectro 30 -	Experimento de HMBC de 9 (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).....	70

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Cultura do Feijão x Fixação de Nitrogênio

O feijão é cultivado em mais de 100 países, porém 63% da produção mundial é obtida em apenas cinco, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

É inquestionável a importância do feijão na alimentação do brasileiro. A falta de estudos mais profundos e uma insistente divulgação da diminuição do consumo desse produto têm provocado algumas incertezas quanto ao futuro da produção e consumo desse alimento. O fato de que parte significativa da produção é realizada por pequenos produtores, que usam uma parcela da produção para seu sustento e vendem o excedente, os quais não usam tecnologia e, portanto, o fazem de maneira pouco eficiente, contribui para que o feijoeiro seja uma cultura estigmatizada como pouco competitiva em relação a outras culturas (Ferreira *et al.*, 2002).

Outro motivo para a falta da competitividade da cultura do feijão diz respeito aos insumos necessários para o crescimento do feijão de boa qualidade. Os fertilizantes nitrogenados, fornecidos às culturas através da adubação com uréia, sulfato de amônia, esterco ou outras formulações do tipo NPK, apresentam baixa eficiência de aproveitamento pela cultura do feijoeiro, pois o nitrogênio pode ser perdido facilmente por lixiviação (NO_3^-) ou por desnitrificação (redução microbiológica do NO_3^- a N_2O e N_2) ou ainda ser volatilizado na forma de NH_3 . Em função disso, o suprimento de nitrogênio à cultura por essa via exige aplicações cada vez mais frequentes, representando um aumento significativo nos custos de produção.

A fixação biológica de nitrogênio por bactérias noduladoras associadas às raízes de leguminosas, incluindo o feijão, representa uma alternativa viável para o fornecimento de nitrogênio à cultura (Mercante, 1993).

No entanto, a inoculação do feijoeiro com bactérias noduladoras em condições de campo tem mostrado baixa frequência de resposta, o que tem sido

atribuída à baixa competitividade das bactérias inoculadas em relação às estirpes de rizóbio nativas dos solos, à suscetibilidade de ambos os parceiros simbióticos a estresses ambientais (como deficiência hídrica e temperatura elevada do solo), ao ataque de pragas, a doenças e ao ciclo curto da cultura (Mercante, 1993).

Alguns estudos realizados no Brasil detectaram um elevado nível de diversidade entre isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Mercante *et al.*, 1998; Straliozzo *et al.*, 1999). Entre as espécies descritas capazes de nodular e fixar nitrogênio em feijoeiros incluem-se: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Frey & Blum, 1994), *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger *et al.*, 1997).

A espécie *R. tropici* apresenta as características de estabilidade genética, tolerância à toxidez de alumínio, a temperaturas e a acidez elevadas e a altos níveis de antibióticos, sendo, portanto, uma espécie com potencial para a obtenção de estirpes com menor alteração das características simbióticas (Flores *et al.*, 1988; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Hungria *et al.*, 1993; Mercante, 1993). Assim, na “VI Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* – RELARE”, realizada em 1994, decidiu-se que apenas a espécie *Rhizobium tropici* deveria ser recomendada para inoculantes comerciais brasileiros (Hungria & Araujo, 1994).

1.1.1 - Troca de sinais moleculares na interação rizóbio-leguminosa

A formação de nódulos radiculares é um processo complexo controlado pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira (**Figura 1**). As raízes desta exsudam para o meio uma série de substâncias (carboidratos, aminoácidos e flavonoides) que funcionam como “quimioatraentes” para a bactéria, promovendo a colonização da rizosfera.

O contato dessas substâncias com a bactéria também é responsável por desencadear a expressão coordenada de uma série de genes da nodulação, referidos como genes *nod*. Os genes *nodABC*, conhecidos como genes “comuns” da nodulação, são encontrados em todas as espécies de rizóbio e requeridos para

a biossíntese de moléculas de lipo-quito-oligossacarídeos (LCOs), coletivamente chamados Fatores Nod. Este processo é controlado pelo produto do gene regulatório *nodD* (proteína NodD), que interage com as substâncias exsudadas. Na presença desses indutores, a proteína NodD se liga a sequências de DNA (*nod* “boxes”) que precedem os genes *nod* a serem ativados, atuando, dessa maneira, como um ativador transcricional.

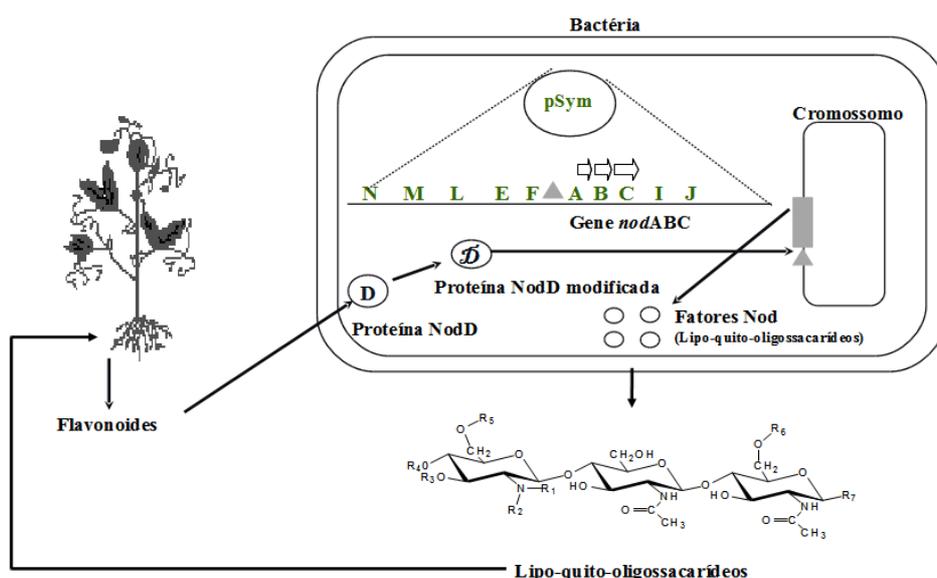


Figura 1 - Esquema da troca de sinais moleculares na interação rizóbio-leguminosa (Spaink, 1994, modificado).

Os Fatores Nod produzidos são os sinais que a bactéria envia para a planta hospedeira provocando encurvamento de seus pelos radiculares, infecção e formação dos nódulos. No interior destes, a bactéria vive numa forma diferenciada (bacteróide) e fixa o nitrogênio pela redução do nitrogênio atmosférico à amônia (Mercante *et al.*, 2002).

1.1.2 - Associação de estirpes de rizóbio com moléculas bioativas para melhoria da produtividade do feijoeiro

A recomendação de inoculantes para o feijoeiro com estirpes de *R. tropici* tem contribuído significativamente para o aumento da fixação de N_2 nessa cultura, contudo, além da seleção de estirpes de rizóbio com potencial simbiótico

mais elevado, outros estudos têm demonstrado a possibilidade de se obter avanços significativos na interação com o feijoeiro, utilizando-se, adicionalmente, moléculas bioativas presentes nos exsudatos de determinadas espécies leguminosas (Firmin *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986; Hungria *et al.*, 1991a, b). Dentre estas substâncias, alguns flavonóides como a 7,4'-diidroxiflavona, luteolina, campferol, apigenina, quercetina, 7,4'-diidroxiflavanona, morina, hesperitina, naringenina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, foram identificados como indutores dos genes da nodulação em diferentes sistemas planta-rizóbio (Rolfe, 1988).

Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de se obter avanços significativos na interação rizóbio-feijoeiro, utilizando-se, adicionalmente, moléculas bioativas presentes nos exsudatos de determinadas espécies leguminosas, como *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala* (Mercante & Franco, 2000).

1.2 - O Cerrado brasileiro e a família Leguminosae

O Cerrado ocupa a maior parte do interior do Brasil e pequenas áreas adjacentes na Bolívia e Paraguai, cobrindo aproximadamente dois milhões de Km² de território. É considerado o segundo maior bioma da América do Sul, superado apenas pela floresta Amazônica (Ratter *et al.*, 1997; Simon & Proença, 2000) e possui uma abundante e exclusiva biodiversidade, especialmente no que diz respeito à sua flora (Myers *et al.*, 2000), tendo a Leguminosae como uma das principais famílias e com maior variedade de espécies (Silva *et al.*, 2010).

Leguminosae compreende 730 gêneros e 19.500 espécies e é tradicionalmente dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Lewis *et al.*, 2005 *apud* Silva, 2010). Muitas de suas espécies são utilizadas em todo o mundo na forma de alimentos, possuindo grande valor nutricional, e também como insumos medicinais. Cerca de 50 espécies são responsáveis por suprir 90% da demanda mundial de legumes (*site* Royal Botanic Gardens, Kew).

Dentre as várias espécies de leguminosas existentes estão: *Phaseolus vulgaris* L., conhecida popularmente como feijoeiro, e *Mimosa flocculosa*, conhecida como Bracatinga-de-Campo-Mourão, objeto de estudo nesta tese.

1.3 - O gênero *Mimosa* e a espécie *Mimosa flocculosa* Burkart

O gênero *Mimosa* pertence à Família Leguminosae e à subfamília Mimosoideae, compreendendo cerca de 500 espécies (Simon & Proença, 2000). É predominantemente americano, sendo encontrado em todas as regiões quentes, desde o sul dos Estados Unidos até o Uruguai e centro da Argentina, além de apresentar alguns representantes na África e Ásia (Burkart, 1952 *apud* Marchiori, 1993). A região central do Brasil é o maior centro de diversificação para o gênero *Mimosa* (**Figura 2**), sendo encontradas muitas espécies na Caatinga e no Cerrado (Lewis, 1987 *apud* Simon & Proença, 2000; Barneby, 1991 *apud* Simon & Proença, 2000).

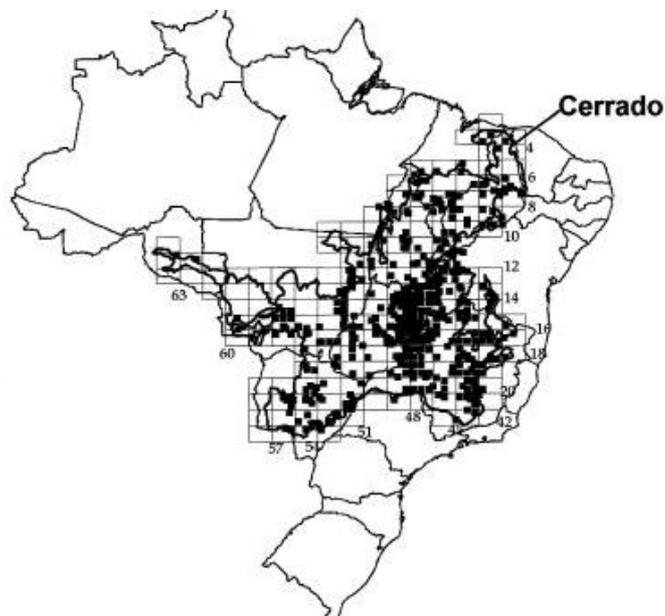
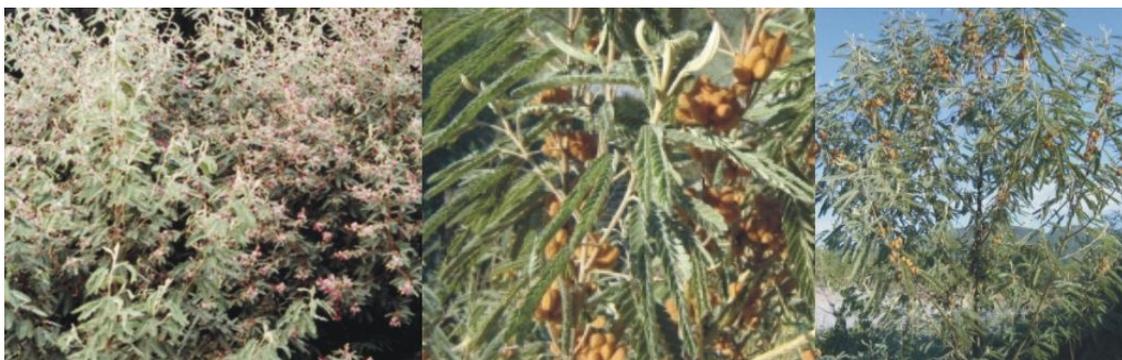


Figura 2 - Distribuição do gênero *Mimosa* dentro do Cerrado do Brasil (Simon e Proença, 2000-modificado).

Muitas espécies de *Mimosa* são conhecidas popularmente como bracatinga. O nome popular bracatinga vem do guarani *abaracaatinga* (Hoehne,

1930 *apud* Carvalho, 2011): *aba* = árvore ou mata; *ra* = peras ou plumas; *caa* = árvore ou mata; *tinga* = branco, ou seja, árvore ou mata de muitas plumas brancas (Aguiar, 2004). As espécies apresentam-se como ervas ou arbustos e raramente são árvores; possuem folhas bipinadas, sensíveis ao toque, flores pequenas, aglomeradas, hermafroditas, nas cores branca, rósea ou amarela e frutos com 3 a 4 sementes (Aguiar, 2004).

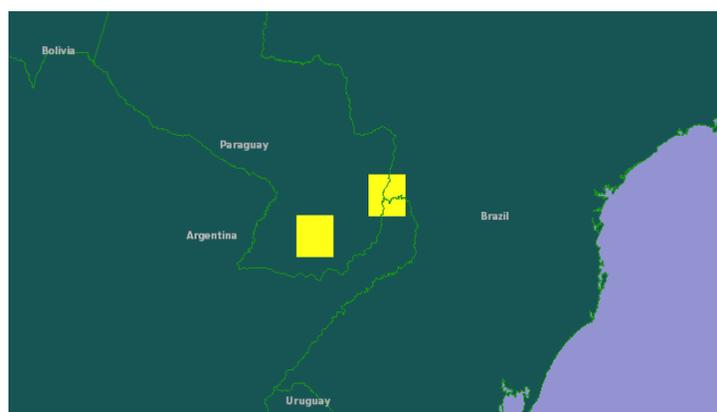
Mimosa flocculosa Burkart, popularmente conhecida como Bracatinga-de-Campo-Mourão, é uma árvore de porte pequeno que ocorre como invasora no oeste e sudoeste do Paraná e no Paraguai (**Figura 3 e 4**) e apresenta boa tolerância ao frio, nada sofrendo em temperaturas de até -6°C e várias geadas por ano (Carvalho, 1989 *apud* Zanon, 1992).



Folheto informativo EMBRAPA, 2002

Fotos: Fabiano Andrade

Figura 3 - *Mimosa flocculosa* Burkart



Disponível em: [HTTP://www.mobot.org](http://www.mobot.org)

Figura 4 - Região de ocorrência da espécie *Mimosa flocculosa* Burkart

O desenvolvimento rápido da árvore, sua copa densa e clara e a profusão de flores roxas propiciam o seu uso no paisagismo (**Figura 5**). A espécie é

também recomendada para a recomposição de ambientes de mata ciliar (ou de galeria), que margeiam rios e demais cursos d'água de determinadas formações florestais (Hoeflich, 2011b).



Folheto informativo
EMBRAPA, 2002

Fotos: Tácio Philip

Figura 5 - Flores de *Mimosa flocculosa* Burkart

A *Mimosa flocculosa* é uma espécie de leguminosa que apresenta em suas raízes associações com alguns grupos de bactérias. Tal fato é relevante, uma vez que esta associação possibilita à planta realizar a fixação biológica do nitrogênio, essencial para a recuperação ambiental em solos degradados ou com poucos sais de nitrogênio presentes (Hoeflich, 2011a).

Resultados experimentais obtidos por Mercante & Franco (2000) demonstraram a possibilidade de se obter incrementos na nodulação inicial do feijoeiro, através da adição de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa*, que poderiam resultar em ganhos significativos no rendimento da cultura do feijoeiro, maximizando o processo simbiótico. Contudo, existe uma necessidade iminente de se proceder à caracterização e identificação dos compostos indutores da expressão dos genes da nodulação do rizóbio presentes no exsudato de tal espécie leguminosa, para que possam ser utilizados em cultivos comerciais.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

Este trabalho se insere no projeto de estudo de exsudatos de plantas com capacidade de induzir a nodulação em leguminosas.

2.2 - Objetivos Específicos

Isolar as substâncias presentes em exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa*, identificando-as e/ou elucidando suas estruturas;

Avaliar os efeitos do exsudato de *Mimosa flocculosa* e das substâncias dele isoladas na capacidade indutora dos genes da nodulação da cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899/pGUS32, através da atividade da enzima β -glucuronidase, utilizando-se como substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucuronídeo.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Procedimento Experimental do Estudo Químico

3.1.1 - Material e equipamentos utilizados

As sementes de *Mimosa flocculosa* foram coletadas no mês de setembro de 2002, no município de Colombo, Paraná, por pesquisadores da EMBRAPA.

Foram utilizadas para extração e partição solventes de grau PA das marcas Merck, Vetec, QM ou Synth. Para análises por CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico marca Merck.

Nas separações por CLAE foram utilizadas:

- Cromatógrafo líquido Shimadzu LC 6AD, adequado para técnicas analíticas e semi-preparativas, com sistema controlador e três bombas e detector UV-Visível variável Shimadzu SPD 6 AV.
- Colunas de fase reversa C-18 (base de sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 µm, dimensões de 4,6 Ø x 25 mm (pré-coluna), 4,6 Ø x 250 mm (analítica) e 14 Ø x 250 mm (semi-preparativa) [Phenomenex].

Os espectros de RMN 1D e 2D foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os solventes utilizados foram CD_3OD ou D_2O , de acordo com a solubilidade de cada amostra. Como referências internas foram utilizadas os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente deuterado para RMN de ^1H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ^{13}C .

As medidas de rotação óptica foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer 341.

A obtenção dos espectros de massa de alta resolução foi realizada pela Dra. Denise Brentan da Silva no Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, utilizando

ionização por “*electrospray*” HR-ESIMS no modo positivo no espectrômetro UltrOTOF-Q (Bruker Daltonics).

3.1.2 - *Obtenção do exsudato das sementes de Mimosa flocculosa e do extrato metanólico*

As sementes (50,0 g) de *Mimosa flocculosa* foram escarificadas com H₂SO₄ concentrado por 5 minutos em repouso e, após a decantação do ácido, lavadas exaustivamente com água. Posteriormente, estas sementes foram tratadas com álcool absoluto por 30 segundos, imersas em hipoclorito de sódio (30%) por três minutos e lavadas com água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas em erlenmeyer de 2 litros esterilizado e com tampa contendo 1000 mL de água destilada esterilizada e mantidas 24 horas no escuro a 30°C, sob leve agitação (80 rpm). Após este período, o material foi filtrado e a solução distribuída em balões, congelada e liofilizada. Deste procedimento, obteve-se um material sólido com aspecto esponjoso, que foi submetido à extração a frio com MeOH, obtendo-se o extrato metanólico do exsudato (MFM, 478,8 mg) [**Fluxogramas 1 e 2**].

Sementes de *Mimosa flocculosa* (50 g)

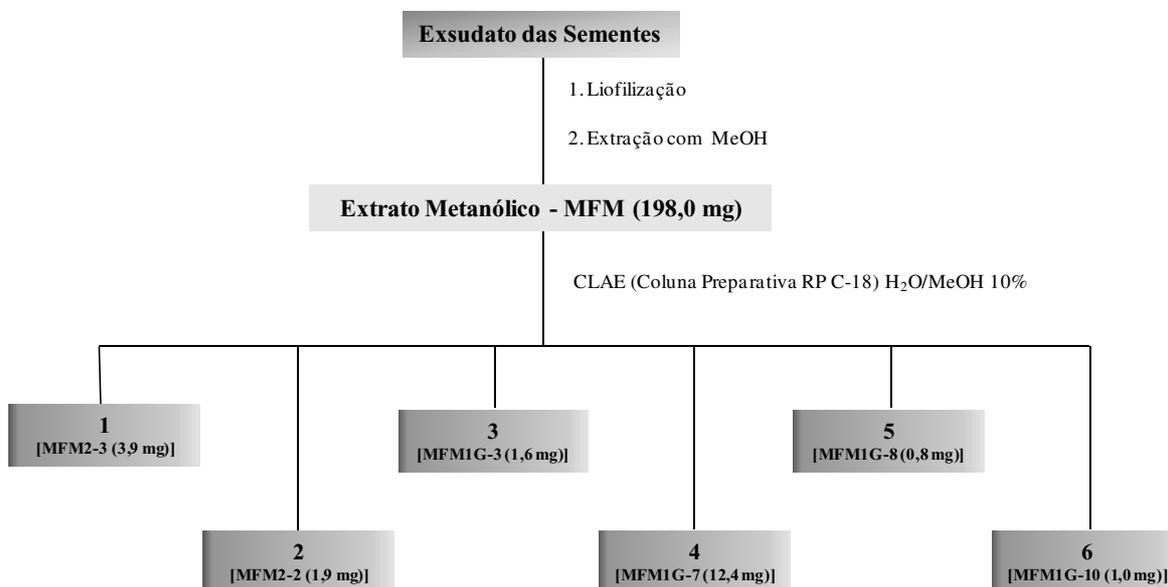
1. Ácido sulfúrico concentrado (5 min);
2. Lavagem com água destilada esterilizada;
3. Tratamento com álcool P.A (30 s);
4. Imersão em hipoclorito de sódio (3 min);
5. Lavagem com água destilada esterilizada;
6. Suspensão em 1L de água destilada esterilizada (24h no escuro sob leve agitação).

Exsudato das Sementes

Fluxograma 1 - Obtenção do exsudato das sementes de *Mimosa flocculosa*.

3.2 - Isolamento das substâncias 1, 2, 3, 4, 5 e 6

O extrato metanólico do exsudato, com concentração de 2,0 mg/mL, foi analisado por CLAE em uma coluna cromatográfica analítica (254 nm, injeção de 10 µL e fluxo de 0,6 mL/min). Posteriormente, parte do extrato metanólico (198,0 mg) foi submetida à separação de seus componentes através de uma coluna cromatográfica de fase reversa (C-18) preparativa [254 nm, injeção de 300 µL por vez e fluxo de 12 mL/min], onde a mistura H₂O/MeOH 9:1 foi utilizada como eluente. Através deste processo foram isoladas seis substâncias: **1** (3,9 mg), **2** (1,9 mg), **3** (1,6 mg), **4** (12,4 mg), **5** (0,8 mg) e **6** (1,0 mg), [Fluxograma 2]. Durante o experimento, foram observadas alterações nos picos do cromatograma da amostra, indicando que parte do material injetado estava ficando retido na coluna. Suspeitou-se de que a presença de grande quantidade de substâncias apolares na amostra seria responsável pelo problema. Em função disso, foi realizada a limpeza da coluna (eluição com MeOH durante 5 minutos) entre as injeções.

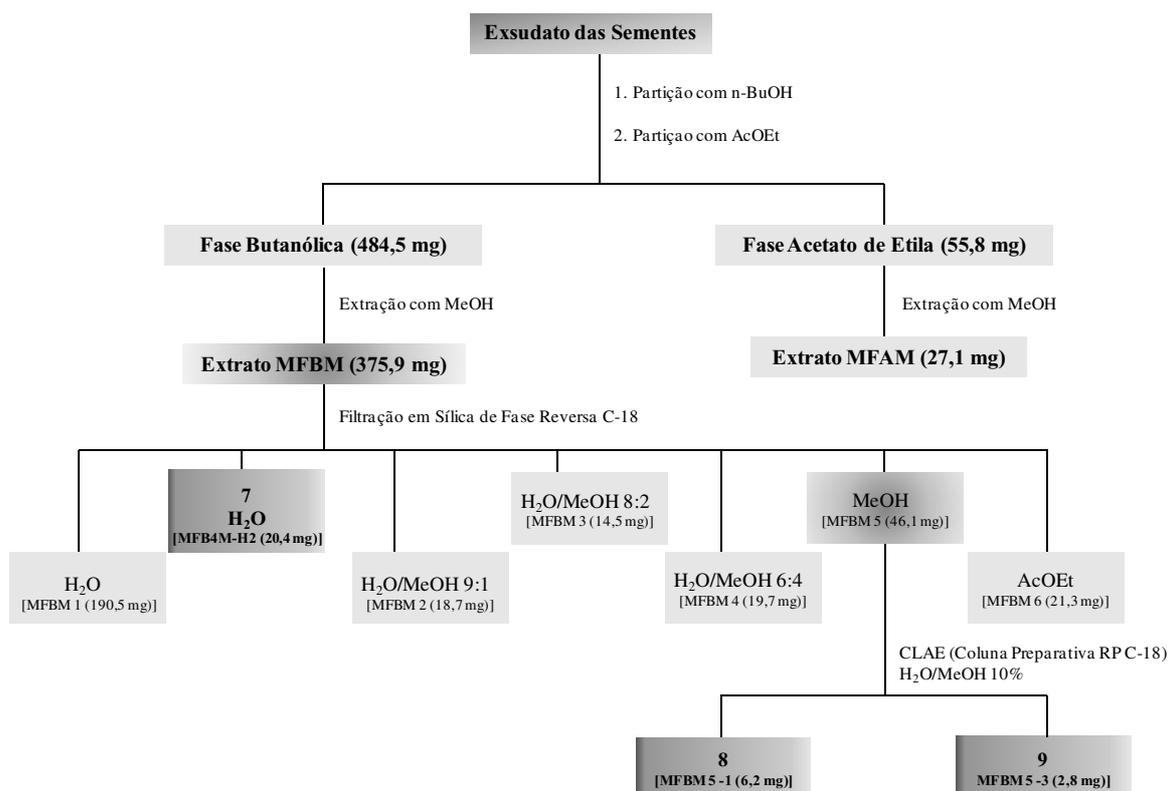


Fluxograma 2 - Obtenção e fracionamento do extrato metanólico do exsudato obtido do exsudato das sementes de *Mimosa flocculosa*.

3.3 - Obtenção dos extratos metanólicos das fases butanólica e acetato de etila

A limpeza da coluna entre as injeções mostrou-se eficiente para a eliminação dos interferentes, mas tornou o processo muito lento, inviabilizando a aplicação desta metodologia com o restante do extrato metanólico do exsudato.

Desta forma, um novo exsudato (600,0 mL) foi obtido e submetido à partição com n-butanol (500,0 mL) e acetato de etila (500,0 mL). Estas fases foram concentradas sob pressão reduzida dando origem às frações butanólica (484,5 mg) e acetato de etila (55,8 mg), que posteriormente foram submetidas à extração a frio com MeOH. Através deste processo obteve-se o extrato metanólico da fase butanólica [MFBM (375,9 mg)] e o extrato metanólico da fase acetato de etila [MFAM (27,1 mg)] [Fluxograma 3].



Fluxograma 3 - Partição do exsudato das sementes de *Mimosa flocculosa* e fracionamento do extrato metanólico da fase butanólica.

3.4 - Isolamento das substâncias 7, 8 e 9

Visando a eliminação das substâncias interferentes, a fração [MFBM (375,9 mg)] foi submetida à filtração em sílica de fase reversa C-18 [40-60 μm (96,0 g)], realizada em funil de vidro sinterizado sob pressão reduzida, e deste processo foram obtidas sete frações de acordo com a **Tabela 1**. Alíquotas (2 mg/mL) destas foram submetidas à análise por CLAE em uma coluna cromatográfica de fase reversa (C-18) analítica, comprimento de onda (λ) de 210/254 nm, volume (V) de injeção 10 μL e fluxo de 0,7 mL/min para obtenção do gradiente exploratório em ACN:H₂O (ACN 5% a 100%). A fração MFBM-1.1 (22,3 mg) indicou tratar-se de apenas uma substância, **7** [**Fluxograma 3**]. Em função de suas massas e/ou menor número de picos, as frações MFBM-1, MFBM-4 e MFBM-5 foram submetidas à separação de seus componentes através de uma coluna cromatográfica preparativa, nas condições descritas abaixo.

MFBM-1 \Rightarrow H₂O:ACN (98:2), λ = 210 nm, V = 3000 μL e fluxo de 14 mL/min.

MFBM-4 \Rightarrow H₂O:ACN (75:25), λ = 210 nm, V = 3000 μL e fluxo de 14 mL/min.

MFBM-5 \Rightarrow H₂O:MeOH (40:60), λ = 254 nm, V = 3000 μL e fluxo de 14 mL/min.

Através desses processos, foram isoladas as substâncias **8** [MFBM5-1 (6,2 mg)] e **9** [MFBM5-3 (2,8 mg)] [**Fluxograma 3**].

Tabela 1 - Frações obtidas da filtração da fração MFBM (375,9 mg).

FRAÇÃO	ELUENTE	VOLUME (mL)	MASSA (mg)
MFBM - 1	H ₂ O	100	190,5
MFBM - 1.1	H ₂ O	50	20,4
MFBM - 2	H ₂ O/MeOH 9:1	100	18,7
MFBM - 3	H ₂ O/MeOH 8:2	100	14,5
MFBM - 4	H ₂ O/MeOH 6:4	100	19,7
MFBM - 5	MeOH	150	46,1
MFBM - 6	AcOEt	150	21,3

3.5 - Procedimento experimental do ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado na Embrapa – CPAO (Dourados) sob a supervisão do Dr. Fábio Martins Mercante.

A capacidade indutora dos genes da nodulação de rizóbio foi avaliada pela atividade da enzima β -glucuronidase, cuja síntese é codificada pelo gene *gusA*, utilizando-se como substrato, *p*-nitrofenil- β -D-glucuronídeo, na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi avaliada a expressão dos genes *nod* da estirpe de *R. tropici* (CIAT 899), contendo a fusão *nodA:gusA* (inserção do plasmídeo pGUS32).

Para as análises da expressão dos genes da nodulação foram montadas três microplacas com 96 poços (uma para cada medida de atividade enzimática em função do tempo). Foram adicionados 20 μL da cultura de bactéria suspensa em meio de cultura YM (extrato de levedura-malte modificado pela substituição do extrato de levedura por 1 g/L de NH_4NO_3) e 180 μL das substâncias-teste, diluídas em meio mínimo (MM), em concentrações variadas (10,00; 5,00; 2,50; 1,25; 0,62; 0,31 e 0,15 μM). Os poços da linha **A** foram destinados às amostras na concentração de 10,00 μM , os poços da linha **B** às amostras na concentração de 5,00 μM e assim sucessivamente, sendo que os poços da linha **G** foram destinados às amostras na concentração de 0,15 μM . A linha **H** da microplaca foi destinada ao branco do experimento e consistia na adição de 20 μL da cultura de bactéria

suspendida em meio YM e 180 μL de MM, não sendo adicionadas nestes poços as substâncias-teste. Cada amostra foi avaliada em hexaplicata, de modo que, para cada concentração de amostra, foram utilizados os poços das colunas 1 a 6 ou 7 a 12 (**Figura 6**).

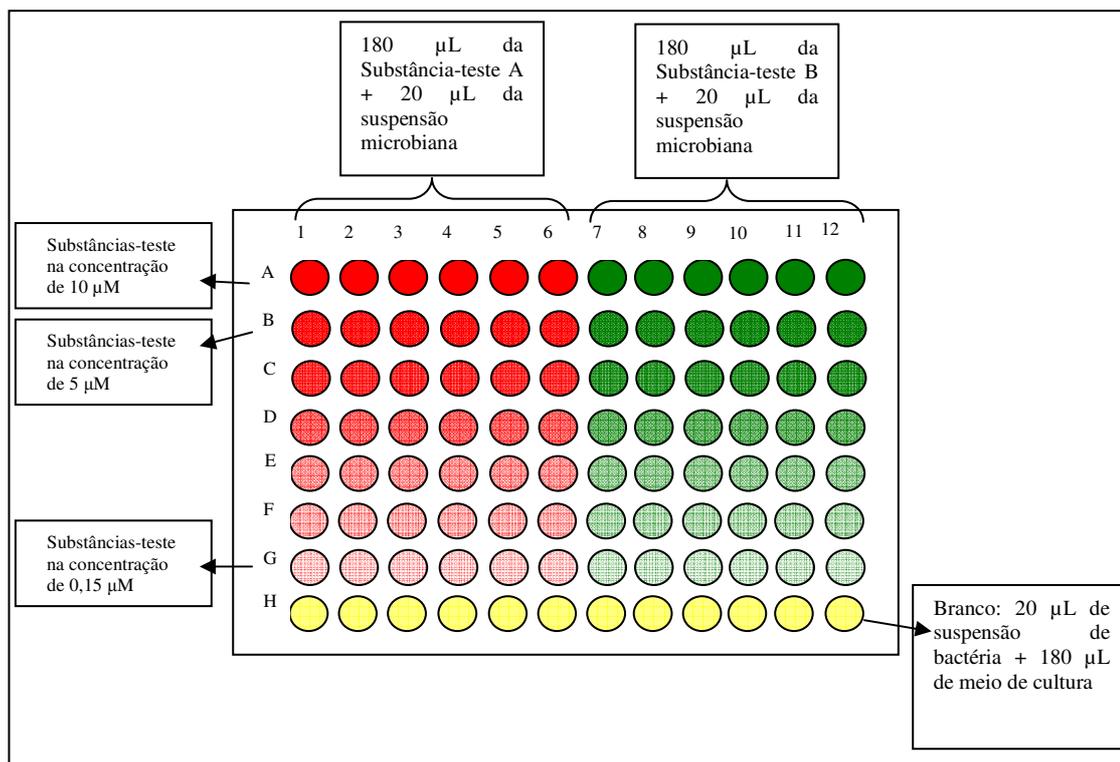


Figura 6 - Esquema da microplaca de 96 poços indicando o protocolo utilizado para a execução do ensaio de determinação da atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias **1, 3, 4, 5, 6, 8 e 9**, obtidas de sementes de *Mimosa flocculosa*, em 23, 90 e 115 h.

As placas foram incubadas à temperatura de 35°C. Após os períodos de 23, 90 e 115 horas de incubação, as reações foram realizadas pela adição de 100 μL do “tampão GUS” [50 mM Na_2HPO_4 , 10 mM β -mercaptoetanol, 0,1% Triton 100, 1 mM Na_2EDTA , 0,1% SDS (sódio dodecil sulfato), pH 7,0]. Após o período de uma hora de reação, esta foi paralisada pela adição de 100 μL de Na_2CO_3 1 m. As absorvâncias foram medidas a 405 e 595 nm, sendo então realizada a média aritmética das mesmas. As absorvâncias foram convertidas em unidades de Miller (UM) pela fórmula:

$$UM = [OD_{405} - 1,75 (OD_{595-2})]/(T \times V \times OD_{595-1})$$

onde, OD_{405} = leitura após a adição de Na_2CO_3 1 m, OD_{595} = células, T = tempo de reação em minutos e V = volume da cultura induzida em mL (o volume na placa, antes de adicionar o GUS-Buffer)

As leituras das reações foram realizadas pelo Software ADAP versão 1.6/Anthos Labtec.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo do exsudato de sementes de *Mimosa flocculosa*, obtido em solução aquosa mediante pré-tratamento das sementes. Após evaporação da água, resultou um resíduo, o qual foi investigado em termos de metabólitos secundários presentes. Para a apresentação destes resultados as substâncias obtidas foram agrupadas por semelhança estrutural, portanto não segue a ordem de obtenção das mesmas.

4.1 - Substância 1

A substância **1**, isolada da fração codificada como MFM2-3 [Item 3.3; Fluxograma 2], apresentou-se como um óleo de coloração amarela.

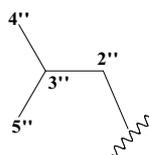
No espectro de RMN de ^1H de **1** [Espectro 1; Tabela 5] foram observados dois dubletos em δ 5,68 e 8,00 ($J = 8,1\text{Hz}$), relativos a hidrogênios vicinais ligados a carbonos de dupla ligação *cis*, um dubleto em δ 5,89 ($J = 4,5\text{Hz}$), um conjunto de sinais entre δ 4,17 e 3,72, referentes a hidrogênios, carbinólicos e sinais entre δ 1,78 e 0,98.

O espectro de RMN de ^{13}C e/ou o experimento de HSQC de **1** apresentou quatorze sinais [Espectros 2 e 3; Tabela 5], sendo dois atribuídos a carbonos metínicos de dupla ligação (δ 142,7 e 102,7), um em δ 166,0, atribuído a carbonila, e outro em δ 152,5 e mais cinco referentes a carbonos carbinólicos (δ 90,7, 86,4, 75,7, 71,3 e 62,3). Na região de núcleos mais protegidos do espectro foram observados dois sinais relativos a dois CH (δ 53,9 e 25,8), a um CH_2 (δ 41,4) e a duas metilas (δ 22,1 e 23,1).

O conjunto dos quatro carbonos referentes aos sinais com maior deslocamento químico, juntamente com as informações obtidas do espectro de RMN de ^1H [Espectro 1; Tabela 5], sugerem a presença de um núcleo formado pela base nitrogenada uracila.



Ainda no espectro de RMN de ^{13}C [Espectro 2; Tabela 5] foi observado que alguns sinais apresentaram intensidade duplicada: duas metilas em δ 22,1 e 23,1, um CH a δ 25,8 e um CH_2 a δ 41,5. Esse conjunto sugere, portanto, uma estrutura parcial simétrica, mostrada a seguir:



Essas propostas de estruturas parciais são compatíveis com as informações fornecidas pelas correlações existentes no espectro COSY ^1H - ^1H de **1** [Espectros 5 e 5a; Tabela 2].

Tabela 2 - Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H de **1** (300/75 MHz).

H	δ ^1H	COSY
5	5,68	H-6
6	8,00	H-5
1'	5,89	H-2'
2'	4,17	H-1'
3'	4,14	H-5'a; H-5'b
4'	3,99	H-3'
5'a	3,72	H-3'; H-5'b
5'b	3,83	H-3'; H-5'a
1''	3,67	H-13a; H-2''b
2''a	1,62	H-1''; H-2''b
2''b	1,78	H-1''; H-2''a
3''	1,77	H-4''; H-5''
4''	0,98	H-3''
5''	1,00	H-3''

Considerando que no experimento HMBC [Espectros 4, 4a, 4b e 4c; Tabela 5] foi observada a correlação entre o hidrogênio (δ 3,67) ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 53,9 (C-1'') e o carbono C-2'' (δ 41,4) e que no experimento NOESY [Espectro 6; Tabela 3] também foi observada a correlação desse mesmo hidrogênio (δ 3,67) com os correspondentes aos sinais em δ 0,98 (H-4''), 1,00 (H-5''), 1,62 (H-2''a) e 1,78 (H-2''b) pode-se propor a estrutura parcial abaixo para o grupo ligado ao N-1 ou N-3 do núcleo formado pela base nitrogenada uracila.

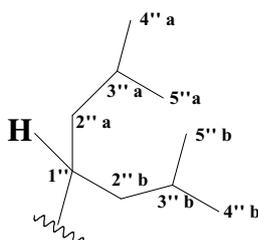


Tabela 3 - Correlações observadas no experimento NOESY de **1** (300 MHz).

H	δ ¹ H	NOESY
5	5,68	H-6
6	8,00	H-3'; H-5
1'	5,89	H-2'
2'	4,17	H-1'; H-4'
3'	4,14	H-6
4'	3,99	H-2'; H-5'a; H-5'b
5'a	3,72	H-4'
5'b	3,83	H-4'
1''	3,67	H-2''a; H-2''b; H-4''; H-5''
2''a	1,62	H-1''
2''b	1,78	H-1''
4''	0,98	H-1''
5''	1,00	H-1''

O conjunto de sinais em δ_C 90,7 (C-1'), 86,4 (C-4'), 75,7 (C-2'), 71,3 (C-3') e 62,3 (C-5'), com exceção do primeiro, é característico de uma pentose na forma furanose, tendo como possibilidades quatro açúcares: arabinose, lixose, ribose e xilose. A comparação dos valores de δ mencionados acima com os

registrados para estas substâncias mostraram uma boa correlação com os dados registrados para a ribofuranose, [Tabela 4]. No entanto, o valor atribuído a C-1' (δ_C 90,7) é inferior ao valor normal para este carbono (δ_C 107,0), sendo, porém, compatível com o valor observado para a ribofuranosilamina (δ_C 90,7). Este dado indica que o açúcar se liga à base nitrogenada uracila, formando o nucleosídeo uridina. A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (Phillips *et al.*, 1997) [Tabela 4] da uridina com parte dos dados de **1**, mostra que esta contém na sua estrutura este nucleosídeo. Desta forma, a estrutura de **1** se constitui de um núcleo uracila ligado à ribofuranose e ao grupo alquil acima definido através dos dois nitrogênios da base nitrogenada.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da parte glicosídica da substância **1** e do nucleosídeo uridina (Phillips *et al.*, 1997).

C	1	(Phillips <i>et al.</i> , 1997)	1	(Phillips <i>et al.</i> , 1997)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$
1'	90,7	90,7	5,89 (1H, <i>d</i> , 4,5 Hz)	5,89 (1H, <i>d</i> , 3,66 Hz)
2'	75,7	75,8	4,17 (1H, <i>t</i> , 5,1 Hz)	4,16 – 3,99 (1H, <i>m</i>)
3'	71,4	71,3	4,14 (1H, <i>t</i> , 5,3 Hz)	4,16 – 3,99 (1H, <i>m</i>)
4'	86,4	86,3	3,99 (1H, <i>dd</i> , 6,6 e 3,0)	4,16 – 3,99 (1H, <i>m</i>)
5'	62,3	62,3	3,72 (1Ha, <i>dd</i> , 12,2 e 3,2 Hz)	3,74 (1H, <i>dd</i> , 12,2 e 2,4 Hz)
			3,83 (1Hb, <i>dd</i> , 12,2 e 2,6 Hz)	3,89 (1H, <i>dd</i> , 12,2 e 2,4 Hz)

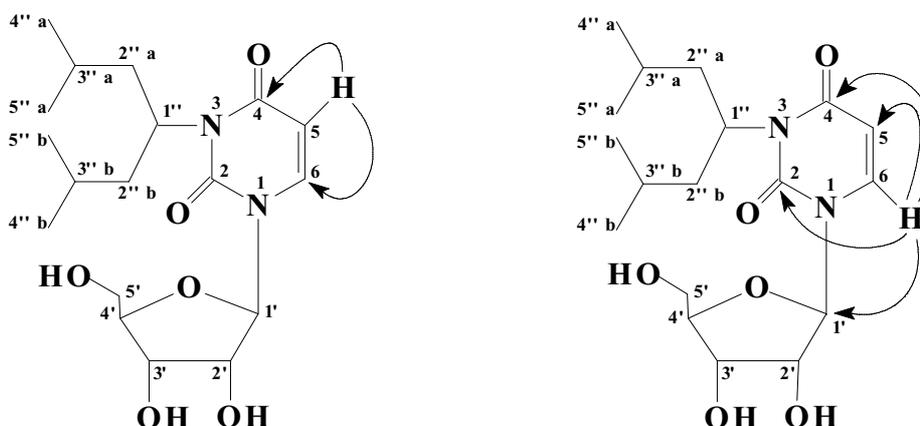


Figura 7 - Algumas correlações observadas no experimento de HMBC para o composto **1**.

A localização da ribofuranose foi definida pela correlação do hidrogênio H-6 (δ 8,00) com C-1' (δ 90,7) no experimento HMBC [Espectros 4, 4a, 4b e 4c; Tabela 5]. Neste também foram observadas as correlações do H-6 (δ 8,00) com os carbonos C-4 (δ 166,7), C-5 (δ 102,7) e C-2 (δ 152,5) e do hidrogênio H-5 (δ 5,68) com os carbonos C-6 (δ 142,7) e C-4 (δ 166,7) sendo a última mais fraca.

A localização do açúcar foi confirmada através do experimento de NOESY [Espectro 6; Tabela 3] que mostra, entre outras, correlações entre o hidrogênio correspondente ao sinal em δ 8,00 (H-6) e o H-2' (δ 4,17). Para que esta correlação ocorra é necessário que o açúcar se localize nas proximidades de H-6, o que é possível se estiver ligado ao N-1 e, portanto, o grupo alquila deve se encontrar ligado ao N-3. Os valores de RMN ^1H e ^{13}C (δ_{H} 3,67 e δ_{C} 53,9) são compatíveis com a ligação de C-1' a Nitrogênio. Este conjunto de dados permite, portanto, propor para a substância **1** a estrutura abaixo, que corresponde à substância denominada de **^3N -(2,6-dimetil-4-heptil)-uridina**. Ainda não há relatos desta substância na literatura, tratando-se, portanto, de um composto inédito.

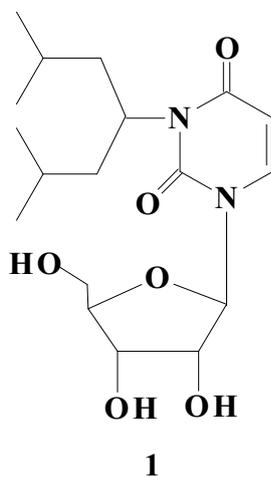
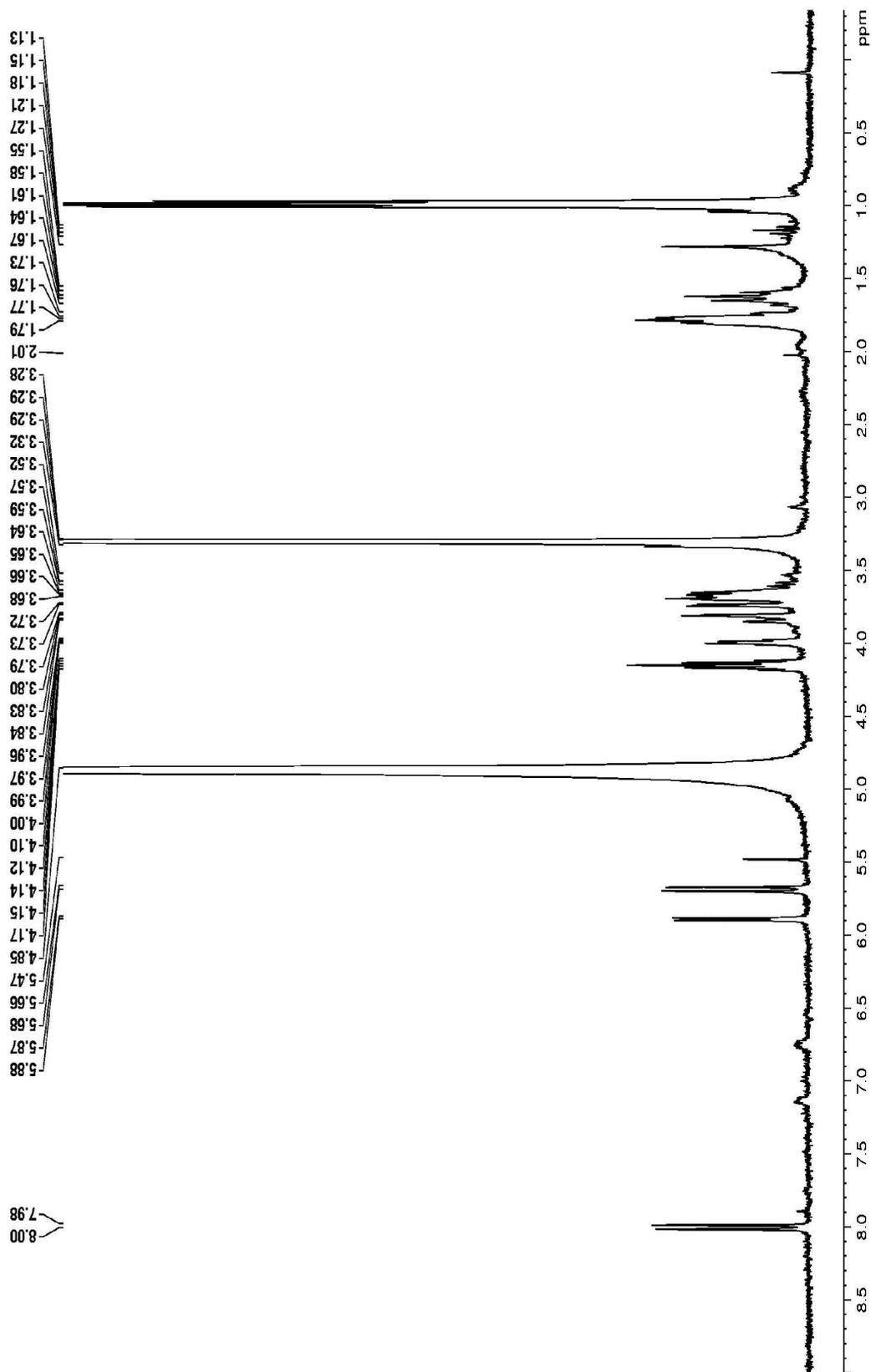
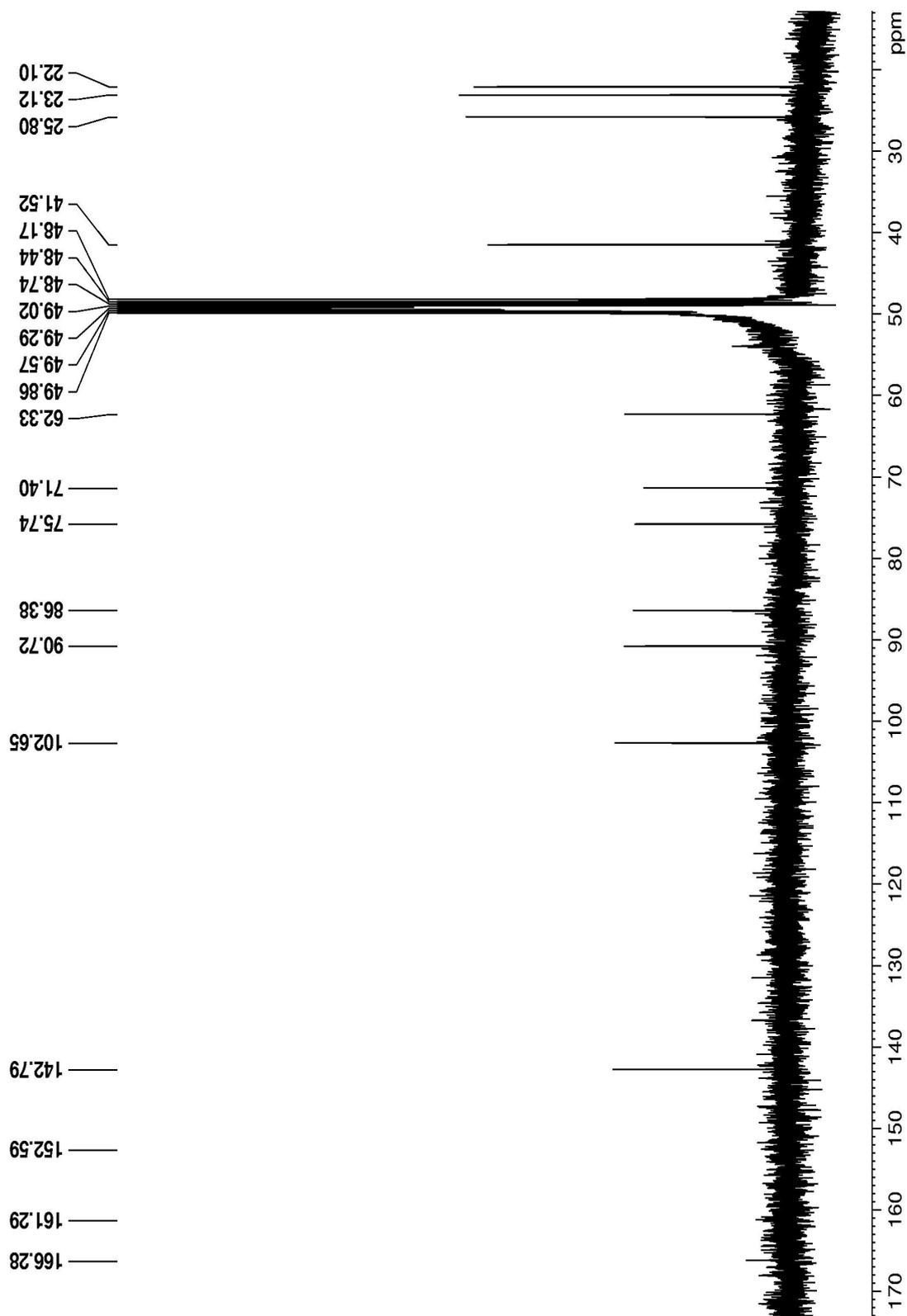


Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **1** e do nucleosídeo uridina (Phillips *et al.*, 1997) e correlações observadas no experimento HMBC de **1** (300/75 mHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).

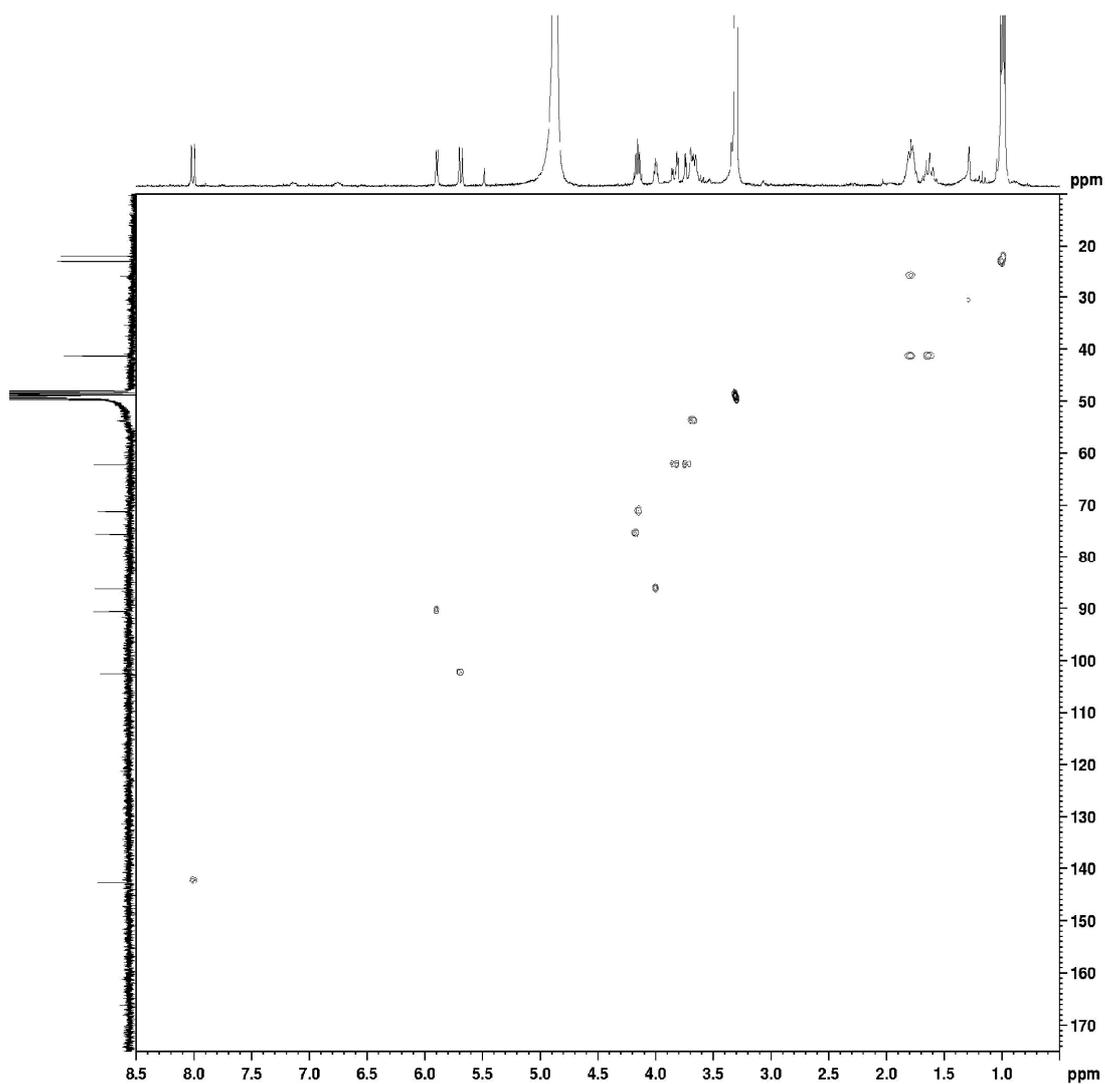
C	(Phillips <i>et al.</i> , 1997)	1		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H→C)
2	152,5	152,5	-	-
4	166,2	166,0	-	-
5	102,6	102,7	5,68 (1H, <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-4; C-6
6	142,7	142,7	8,00 (1H, <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-4; C-5; C-2; C-1'
1'	90,7	90,7	5,89 (1H, <i>d</i> , 4,5 Hz)	C-2; C-6; C-2'
2'	75,8	75,7	4,17 (1H, <i>t</i> , 5,1 Hz)	C-1'; C-4'
3'	71,3	71,4	4,14 (1H, <i>t</i> , 5,3 Hz)	C-1'; C-5'
4'	86,3	86,4	3,99 (1H, <i>dd</i> , 6,6 e 3,0)	-
5'	62,3	62,3	3,72 (1Ha, <i>dd</i> , 12,2 e 3,2 Hz)	-
			3,83 (1Hb, <i>dd</i> , 12,2 e 2,6 Hz)	C-4'
1''	-	53,9	3,67 (1H, <i>m</i>)	C-2''; C-3''
2''	-	41,5	1,62 (1Ha, <i>dt</i> , 18,1 e 9,8 Hz)	C-1''; C-3''; C-4''; C-5''
			1,78 (1Hb, sobreposto)	C-1''; C-3''; C-4''; C-5''
3''	-	25,8	1,77 (1H, sobreposto)	C-2''
4''	-	22,1	0,98 (3H, <i>d</i> , 5,7 Hz)	C-2''; C-3''; C-5''
5''	-	23,1	1,00 (3H, <i>d</i> , 5,7 Hz)	C-2''; C-3''; C-4''



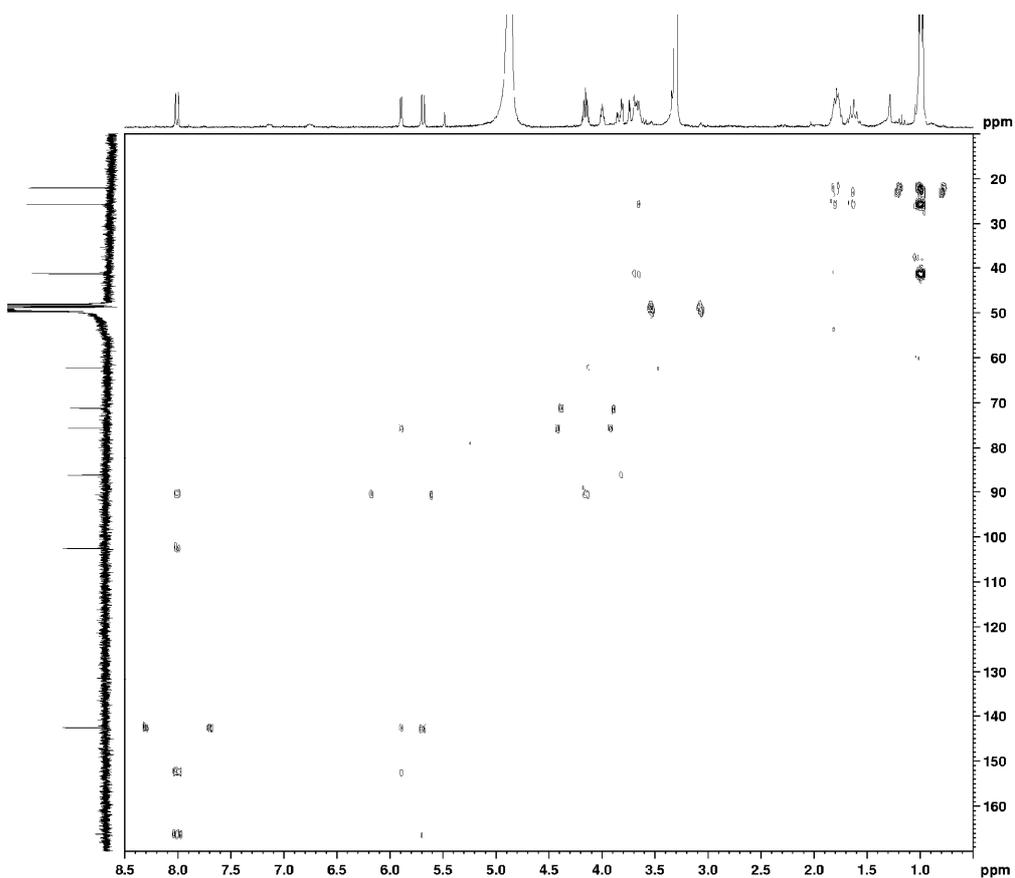
Espectro 1 - Dados de RMN ^1H de **1** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



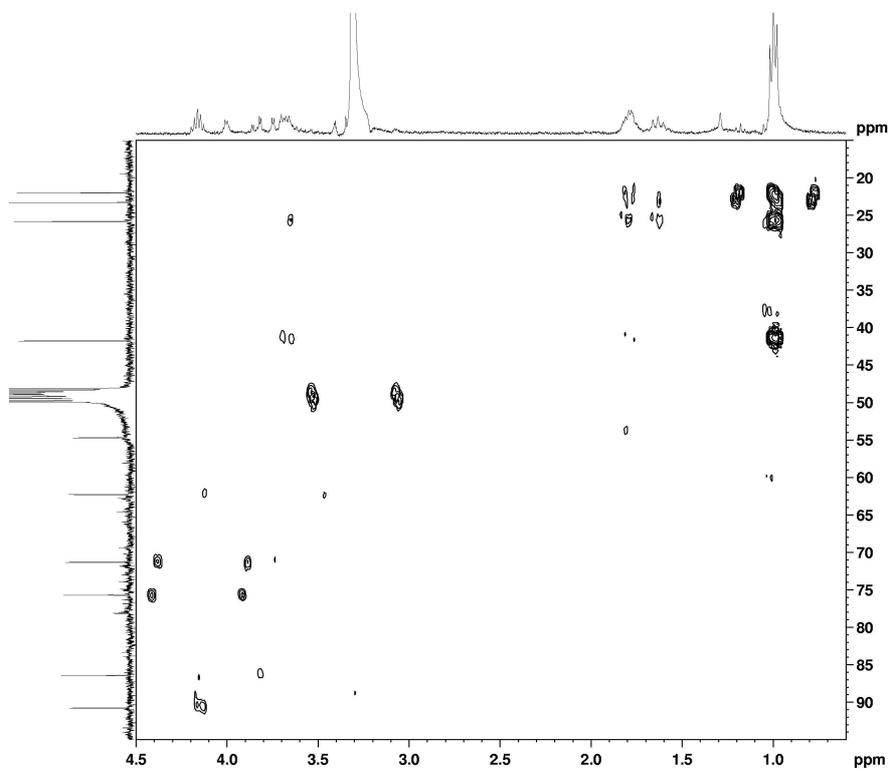
Espectro 2 - Dados de RMN ^{13}C de **1** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



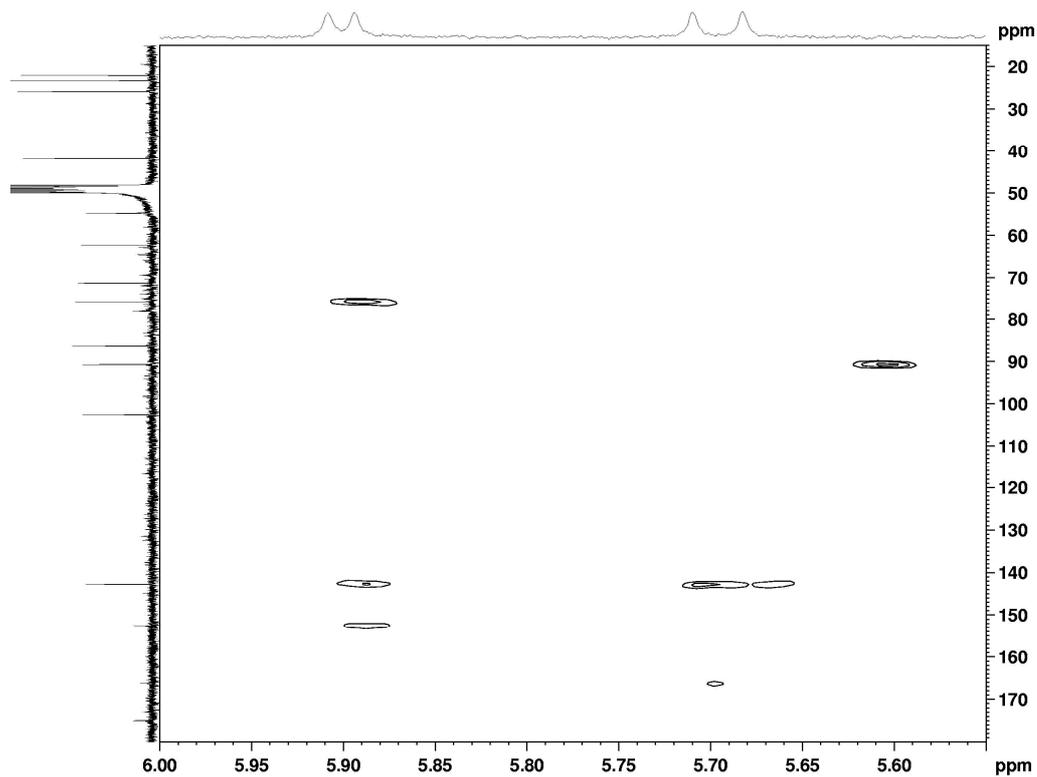
Espectro 3 - Experimento de HSQC de **1** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



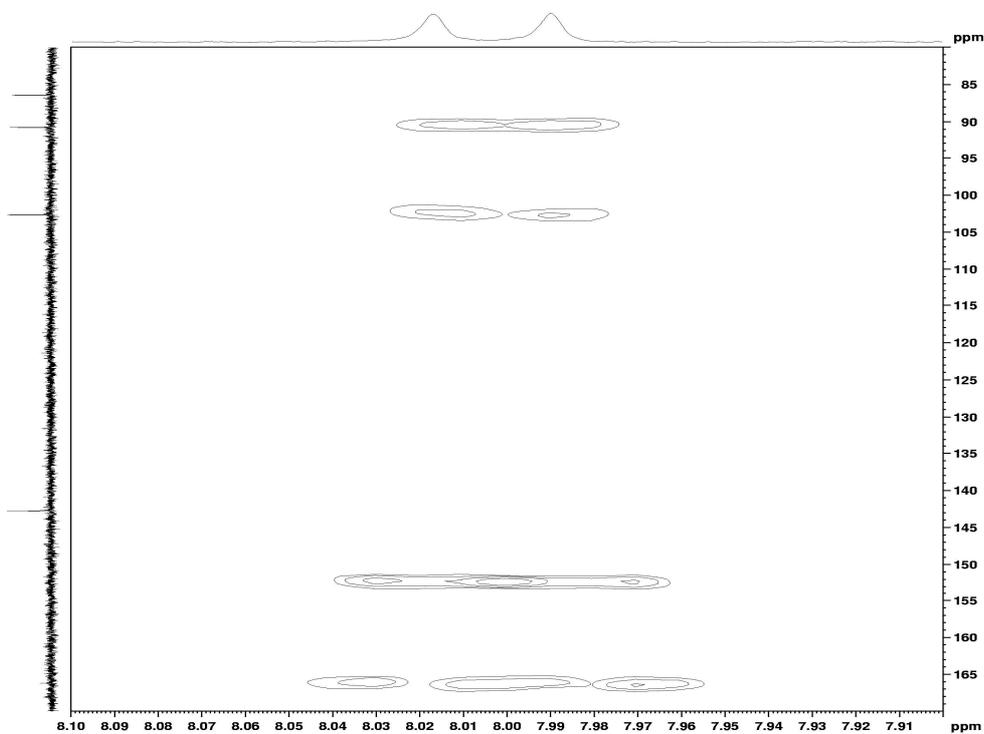
Espectro 4 - Experimento de HMBC de **1** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



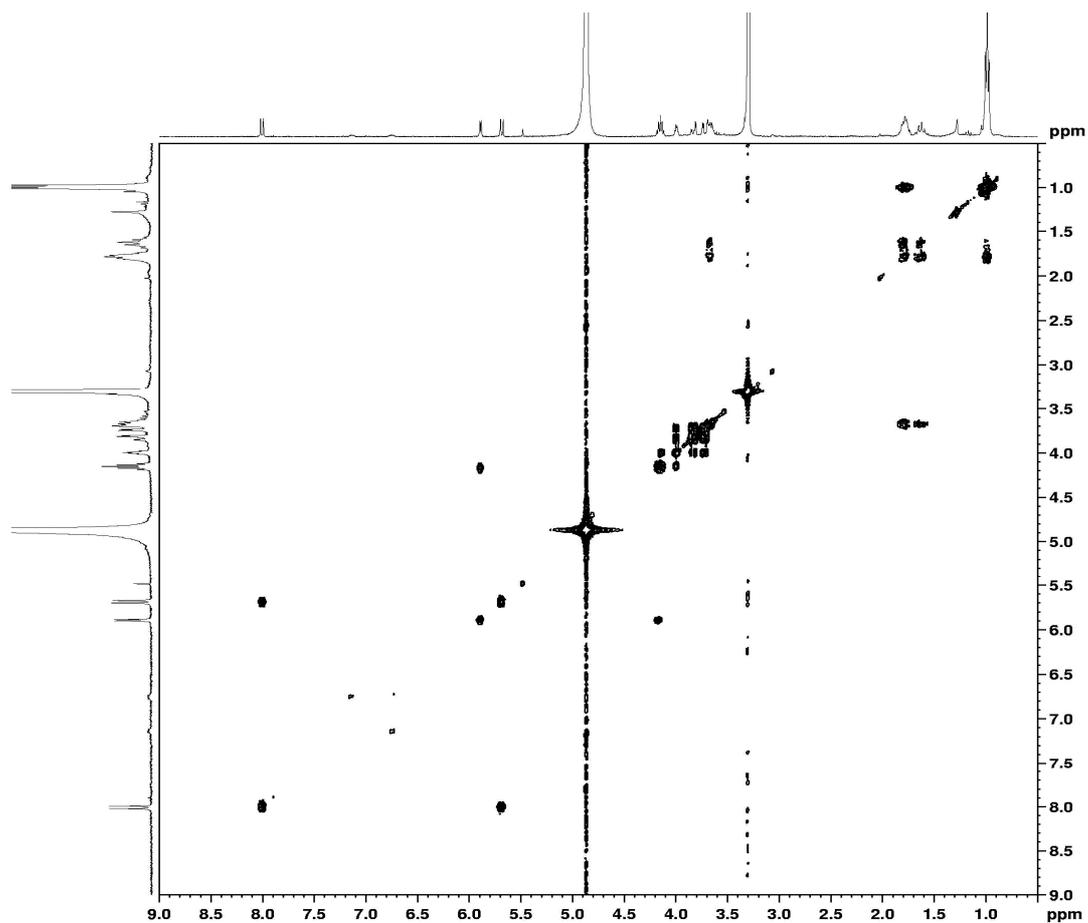
Espectro 4a - Expansão do espectro de HMBC de **1** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



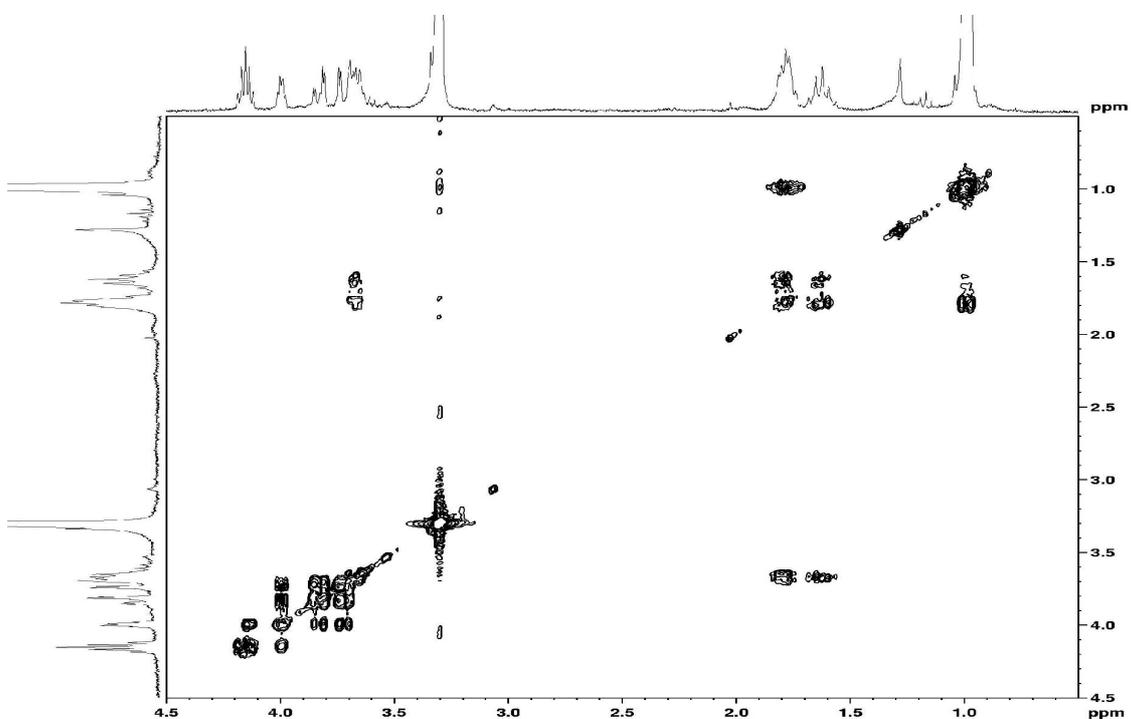
Espectro 4b - Expansão do espectro de HMBC de **1** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



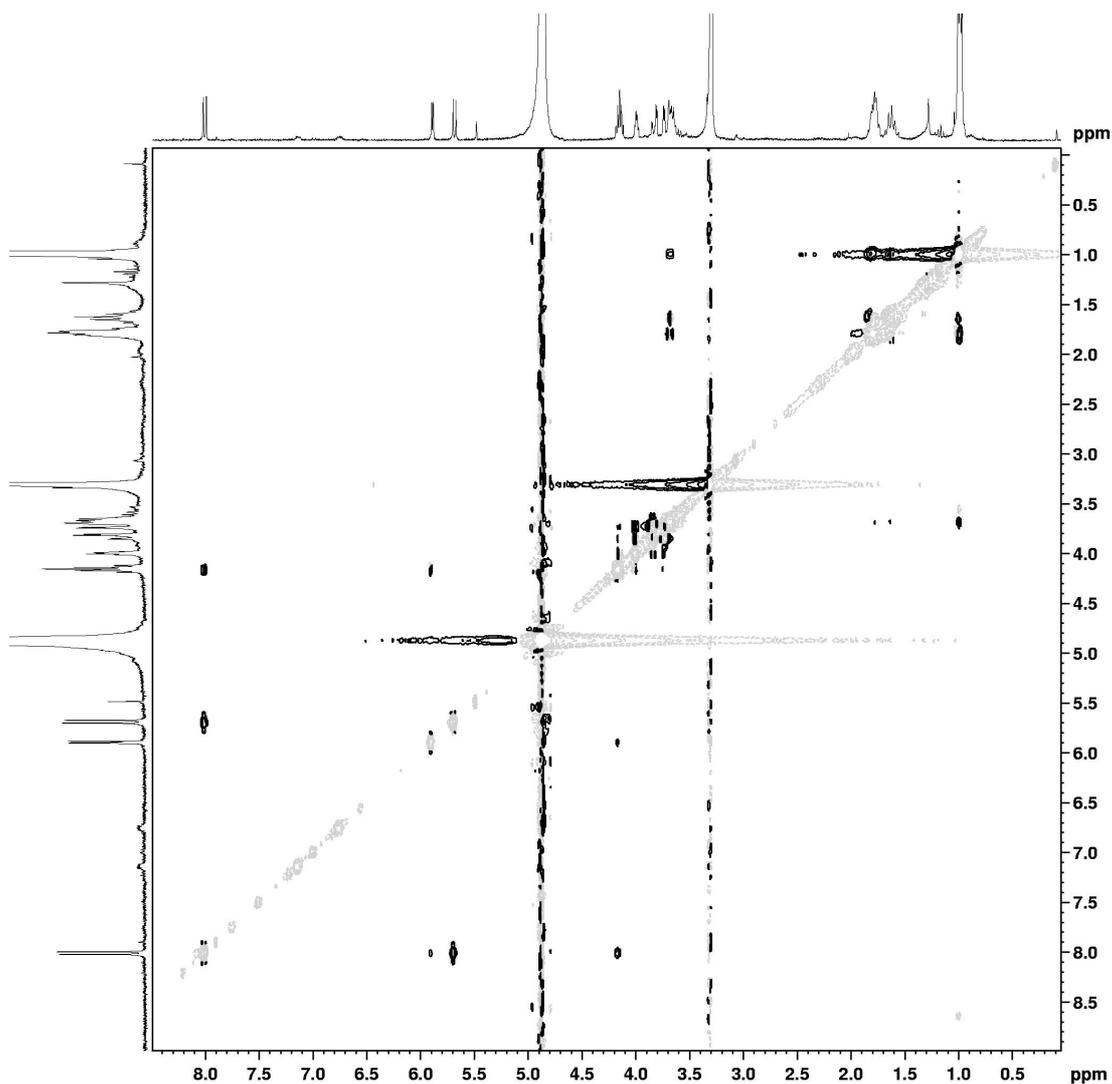
Espectro 4c - Expansão do espectro de HMBC de **1** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 5 - Experimento de COSY ^1H - ^1H de **1** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 5a - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de **1** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



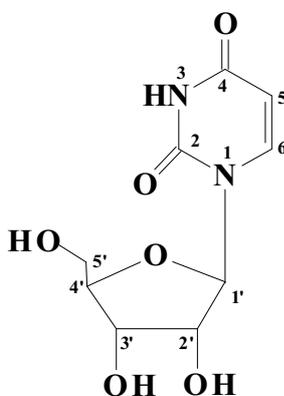
Espectro 6 - Experimento de NOESY de **1** (300 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).

4.2 - Substância 6

A substância **6**, isolada da fração codificada como MFM1 g-10 [Item 3.3; Fluxograma 2], apresentou-se como um óleo de coloração amarela.

No espectro de RMN de ^1H de **6** [Espectro 7; Tabela 8] foram observados dois dubletos relativos a hidrogênios vicinais ligados a carbonos de ligação dupla em δ 5,68 e 8,00 ($J = 8,1\text{Hz}$), um dubleto em δ 5,89 ($J = 4,4\text{Hz}$) e um conjunto de sinais referentes a hidrogênios carbinólicos entre δ 4,17, e 3,72. Destaca-se neste espectro o padrão dos sinais relativos aos hidrogênios olefínicos e carbinólicos muito semelhante aos observados para os hidrogênios do nucleosídeo uridina da substância **1**.

O espectro de RMN de ^{13}C e/ou o experimento DEPT 135° de **6** [Espectros 8 e 9; Tabela 8] apresentou nove sinais, sendo cinco referentes a carbonos carbinólicos (δ 90,7, 86,4, 75,7, 71,3 e 62,3), os quais são compatíveis com os dados registrados para a ribofuranosilamina. Os outros quatro sinais são facilmente atribuídos aos carbonos do núcleo formado pela base nitrogenada uracila (δ 166,0, 152,5, 142,7 e 102,7). Estas informações indicam que a substância **6** é formada apenas pela união da ribofuranose à base nitrogenada uracila, como na estrutura parcial do composto **1**. Desta forma, propomos a estrutura de **6** como sendo a do **nucleosídeo uridina**, mostrada abaixo.



6

As informações fornecidas pelas correlações existentes Experimento de HMBC [Espectros 11 e 11a; Tabela 8] de **6** confirmaram a proposta estrutural. Neste experimento foi possível observar correlações intensas do hidrogênio H-6 (δ 8,00) com o carbono C-2 (δ 152,5) e do hidrogênio H-2' (δ 4,17) com o carbono C-4' (δ 86,4). Foram observadas também correlações menos intensas como a de H-6 (δ 8,00) com o C-4 (δ 166,0) e de H-5 (δ 5,69) com o carbono C-6 (δ 142,7).

Tabela 6 - Correlações observadas no experimento NOESY de **6** (300 MHz).

H	δ ¹ H	NOESY
5	5,69	H-6
6	8,00	H-3'; H-5
1'	5,89	H-2'
2'	4,17	H-1'
3'	4,13	H-6

Através do experimento NOESY da substância **6** [Espectro 13; Tabela 6] foram observadas as correlações entre o hidrogênio H-6 (δ 8,00) e os hidrogênios em δ 5,69 (H-5) e δ 4,13 (H-3') e entre o hidrogênio H-1' (δ 5,89) e o hidrogênio em δ 4,17 (H-2'), indicando que estes estão do mesmo lado na estrutura.

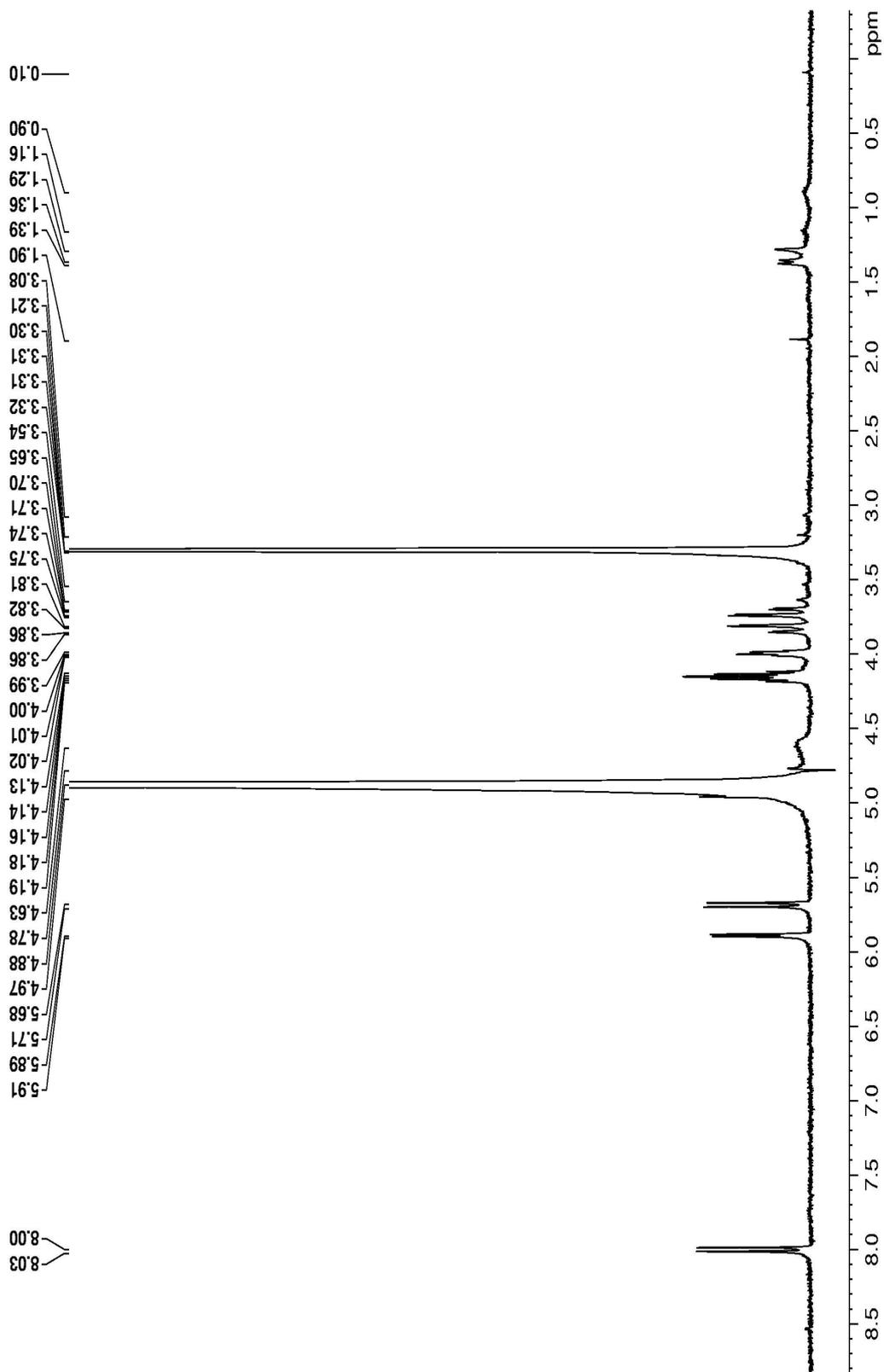
Tabela 7 - Correlações observadas no espectro COSY ¹H-¹H de **6** (300/75 MHz).

H	δ ¹ H	COSY
5	5,69	H-6
6	8,00	H-5
1'	5,89	H-2'
2'	4,17	H-1'
3'	4,13	H-4'
4'	3,99	H-3'; H-5'a; H-5'b
5'a	3,72	H-4'; H-5'b
5'b	3,83	H-4'; H-5'a

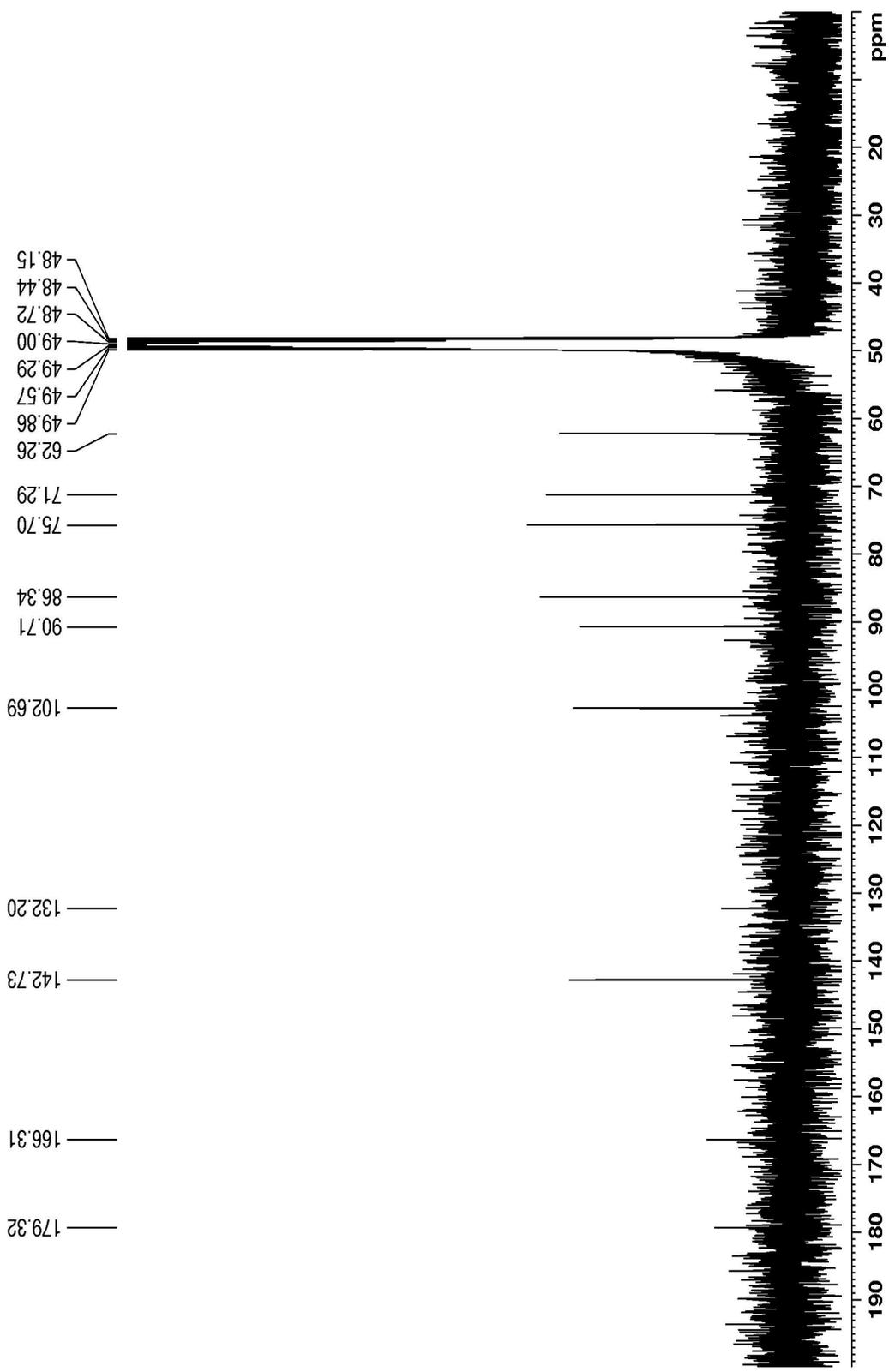
No experimento COSY ^1H - ^1H [Espectro 12 e 12a; Tabela 7] foram observadas as correlações do hidrogênio H-6 (δ 8,00) com o sinal em δ 5,69 (H-5) e do hidrogênio H-1' (δ 5,89) com o sinal em δ 4,17 (H-2'), além das correlações dos hidrogênios H-5' (δ 3,72 e 3,83) com o sinal em δ 3,99 (H-4'). Todas essas informações fornecem subsídios que fundamentam a proposta de estrutura para a substância 6. Além disso, a rotação óptica medida para 6 foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{23} + 2,0$ (MeOH, c 0,1), compatível com valor relatado por Hisamoto *et al* (2003) para a uridina.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 6 e dados de RMN de ^{13}C da substância 1 (300/75 mHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).

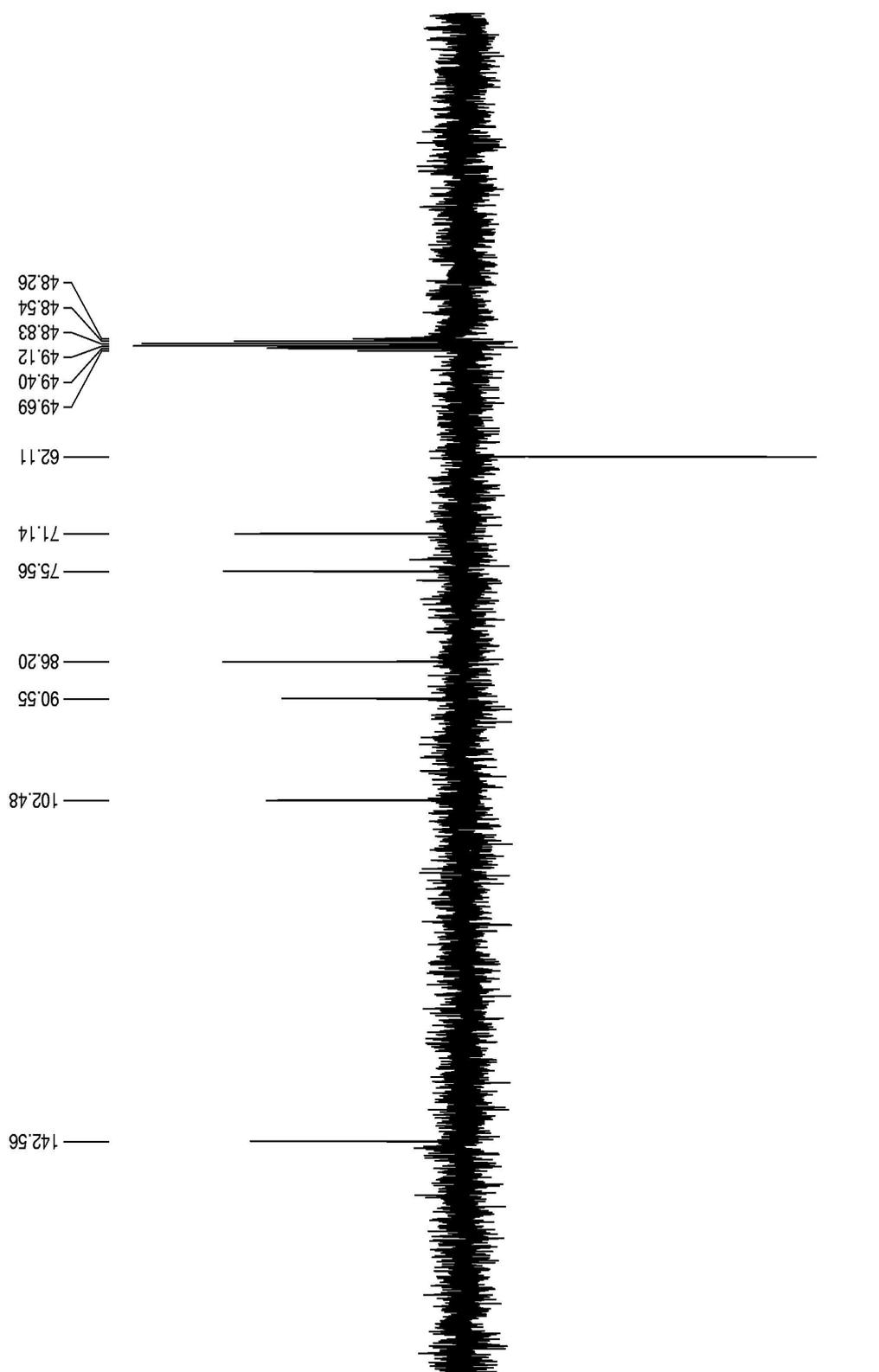
C	1	6		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H \rightarrow C)
2	152,5	152,5	-	-
4	166,0	166,0	-	-
5	102,7	102,7	5,69 (1H, <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-4; C-6
6	142,7	142,7	8,00 (1H, <i>d</i> , 8,1 Hz)	C-4; C-5; C-2; C-1'
1'	90,7	90,7	5,89 (1H, <i>d</i> , 4,4 Hz)	C-2; C-6; C-2'
2'	75,7	75,7	4,17 (1H, <i>t</i> , 5,3 Hz)	C-4'
3'	71,4	71,3	4,13 (1H, <i>t</i> , 5,3 Hz)	C-1'; C-5'
4'	86,4	86,4	3,99 (1H, <i>dd</i> , 6,8 e 2,9)	-
5'	62,3	62,3	3,72 (1Ha, <i>m</i>) 3,83 (1Hb, <i>m</i>)	C-3'; C-4'
1''	53,9	-	-	-
2''	41,4	-	-	-
3''	25,8	-	-	-
4''	22,1	-	-	-
5''	23,1	-	-	-



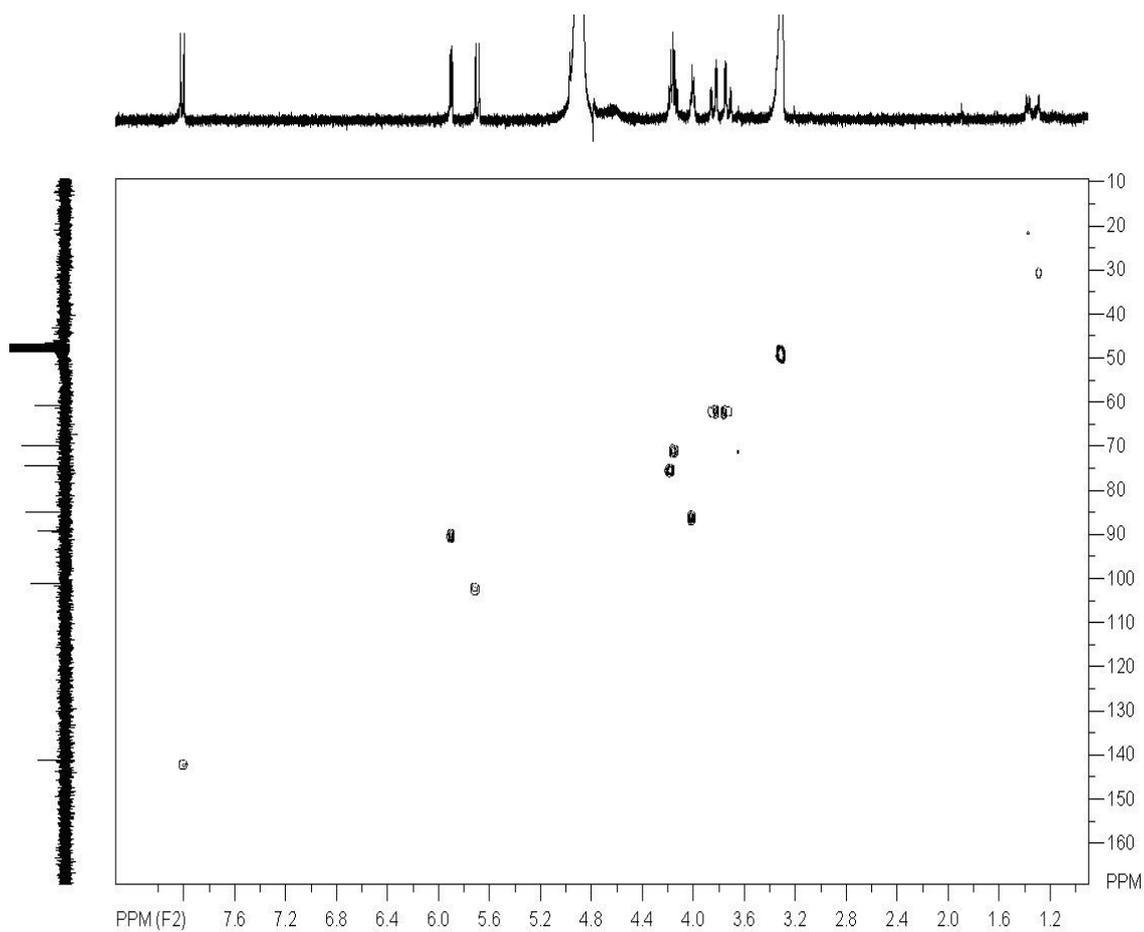
Espectro 7 - Dados de RMN ¹H de 6 (300 MHz, CD₃OD, TMS δ = 0).



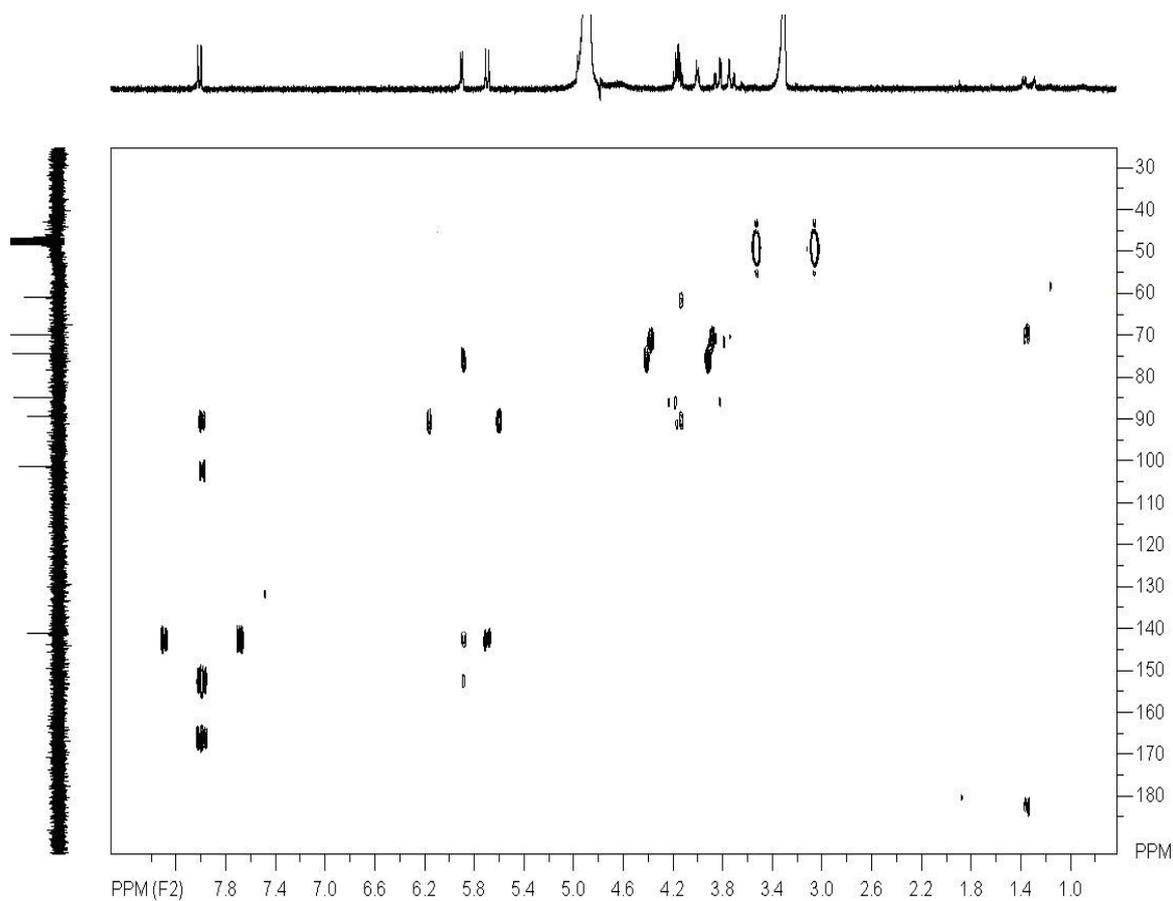
Espectro 8 - Dados de RMN ¹³C de **6** (75 MHz, CD₃OD, TMS δ = 0).



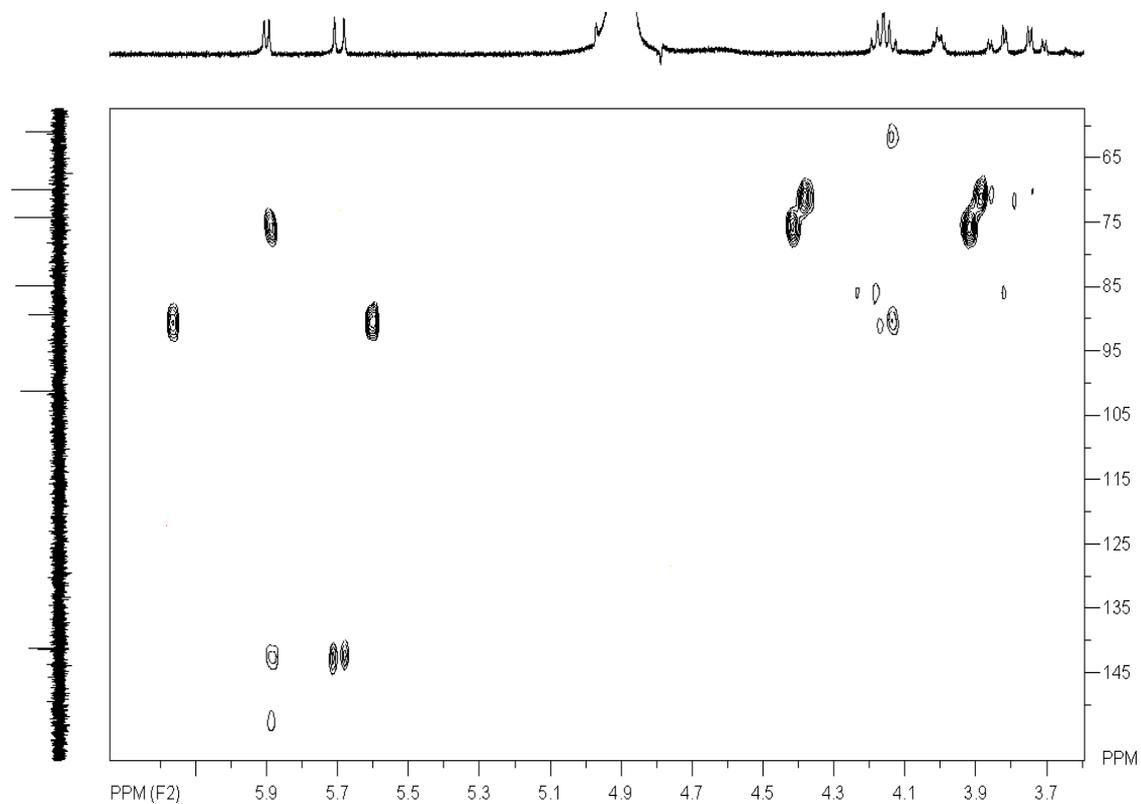
Espectro 9 - Espectro de ^{13}C (DEPT 135°) de **6** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



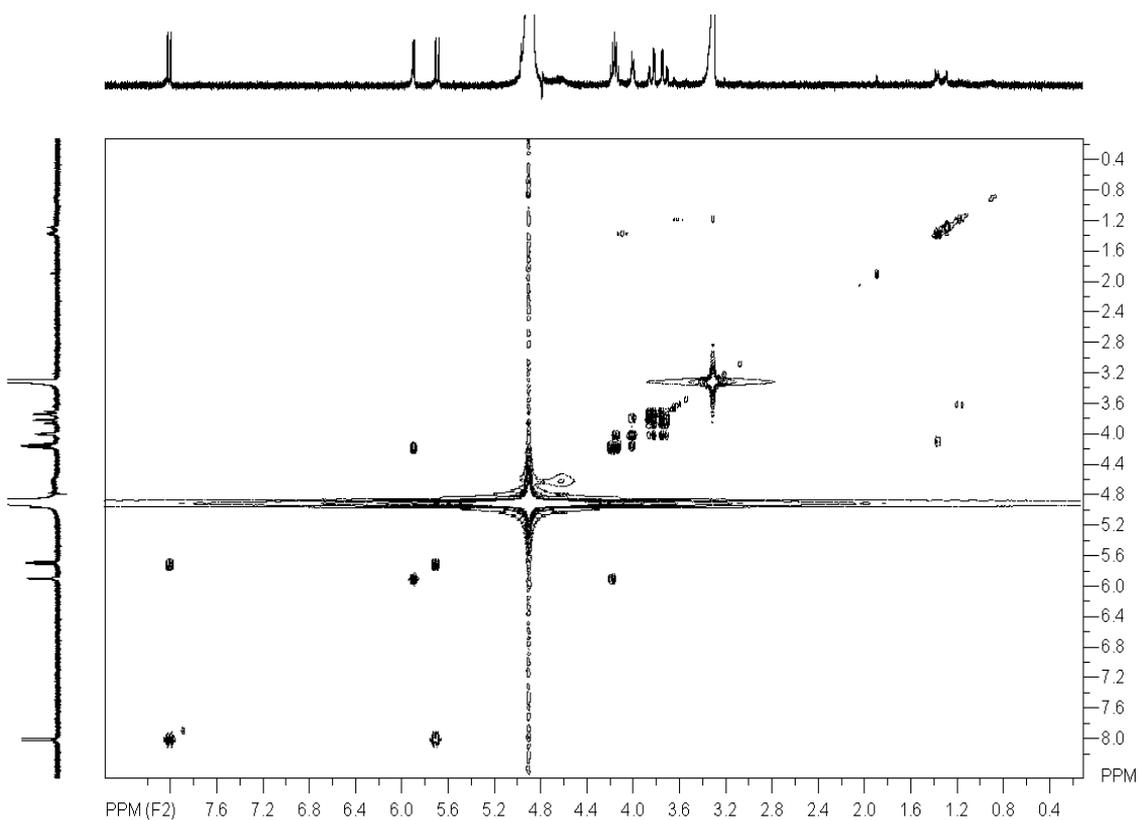
Espectro 10 - Experimento de HSQC de **6** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



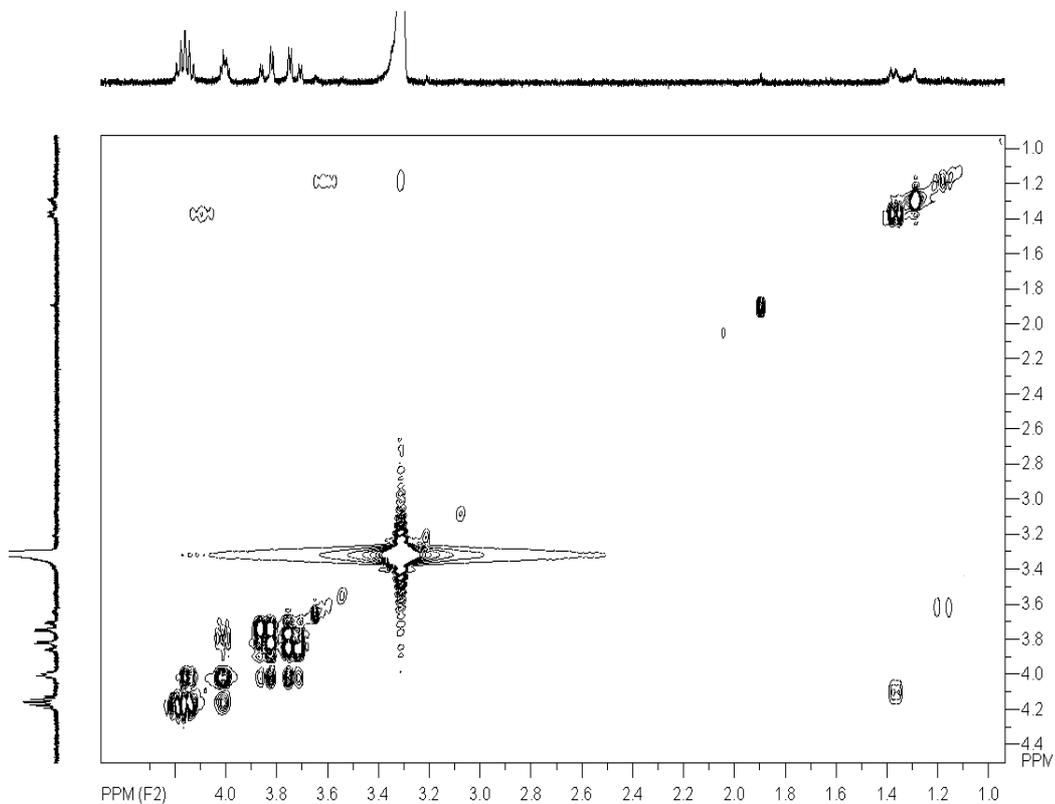
Espectro 11 - Experimento de HMBC de **6** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



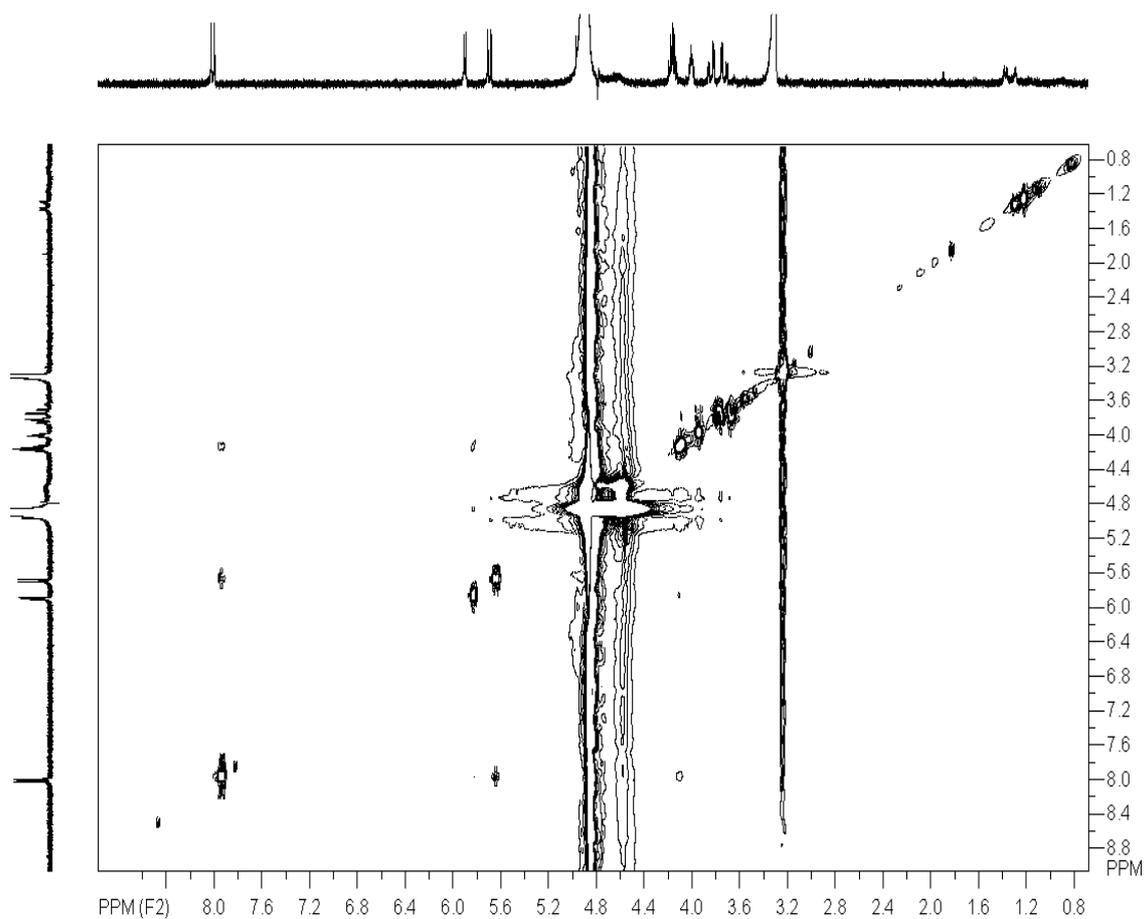
Espectro 11a - Expansão do espectro de HMBC de **6** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 12 - Experimento de COSY ^1H - ^1H de **6** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 12a - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de **6** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 13 - Experimento de NOESY de **6** (300 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).

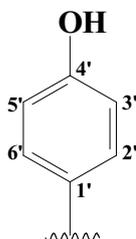
4.3 - Substância 5

A substância **5**, isolada da fração codificada como MFM1 g-8 [Item 3.3; Fluxograma 2], apresentou-se oleosa e com coloração amarela.

O espectro de RMN de ^1H de **5** [Espectro 14; Tabela 10] apresentou dois dubletos em δ 0,96 e 0,98 ($J = 5,40\text{Hz}$) referentes a dois grupos metílicos, dois duplos dubletos em δ 1,64 ($J = 17,3$ e $8,4\text{Hz}$) e 1,74 ($J = 17,3$ e $5,2\text{ Hz}$) e dois dubletos relativos à hidrogênios ligados a anel aromático em δ 6,82 ($J = 8,2\text{Hz}$) e 7,16 ($J = 8,2\text{Hz}$), referentes a dois hidrogênios cada.

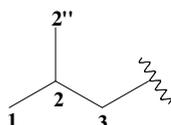
O espectro de RMN de ^{13}C e/ou o experimento HSQC apresentou nove sinais [Espectros 15, 16 e 16a; Tabela 10], dos quais quatro se referem aos carbonos de um anel aromático *para*-substituído, sendo um deles ligado a oxigênio (δ 155,6). Dos outros cinco sinais, quatro apresentaram intensidades duplicadas, portanto referentes a dois carbonos cada: um relativo a CH (δ 24,4), um relativo a carbono secundário (δ 40,2) e dois a metilas (δ 20,8 e 22,0); o último sinal, relativo a apenas um carbono (CH) aparece em δ 53,5.

Considerando que a estrutura de **5** é constituída de um anel aromático *para*-substituído com um carbono oxigenado e, ainda, com base na feição apresentada pelo espectro de RMN de ^1H [Espectro 14; Tabela 10] e nas informações contidas nos espectros de RMN de ^{13}C , [Espectro 15; Tabela 10], foi possível propor a estrutura parcial abaixo, na qual o substituinte alifático, correspondente a uma estrutura simétrica, encontra-se ligado ao C-1'.



No experimento HMBC [Espectro 17; Tabela 10] observou-se uma correlação bastante intensa entre os hidrogênios metílicos (δ_{H} 0,96 e δ_{H} 0,98)

ligados aos carbonos correspondentes aos sinais em δ_C 20,8 (C-1/7) e em δ_C 22,0 (C-2''/6''), respectivamente, com o carbono metínico C-3/5 (δ_C 40,2) e uma menos intensa com o metileno C-2/6 (δ_C 24,4). Estas observações, aliadas a outras constantes na **Tabela 9**, levam a propor a estrutura parcial abaixo para constituinte de **5**.



Também foram observadas correlações entre o hidrogênio (δ_H 3,63) ligado ao carbono metínico (não duplicado) referente ao sinal em δ_C 53,5 (C-4) e os carbonos C-3/5 (δ_C 40,2) e C-2/6 (δ_C 24,4), sendo a última de menor intensidade. A integração deste último dado com as informações mencionadas anteriormente, juntamente com as correlações observadas no espectro COSY 1H - 1H de **5** [**Espectros 18 e 18a**; **Tabela 9**] pode ser racionalizada na ampliação da estrutura parcial de **5**:

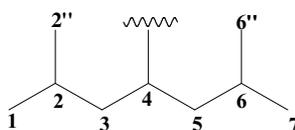


Tabela 9 - Correlações observadas no espectro COSY 1H - 1H de **5** (300/75 MHz).

H	δ^1H	COSY
1/7	0,96	H-2/6
2/6	1,74	H-1/7; H-2''/6''
3a/5a	1,64	H-4
4	3,63	H-3/5a
2'/6'	6,82	H-3'/5'
3'/5'	7,16	H-2'/6'
2''/6''	0,98	H-2/6

A ligação desta última unidade, através do carbono metínico central, com o anel aromático foi confirmada através do experimento HMBC [**Espectro 17**; **Tabela 10**], o qual mostrou, entre outras, correlação entre o hidrogênio (δ_H 6,82) ligado ao carbono referente ao sinal em δ_C 115,6 (C-2'/6') com o carbono

metínico correspondente ao sinal a δ_C 53,5. Esse conjunto de informações permite, portanto, propor para **5** a estrutura abaixo, que corresponde ao **2,6-dimetil-4-(4-hidroxifenil)-heptano**.

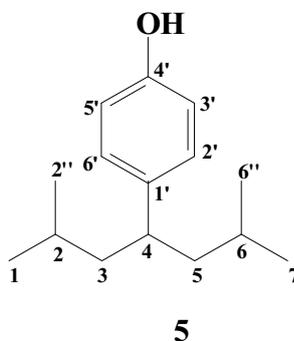
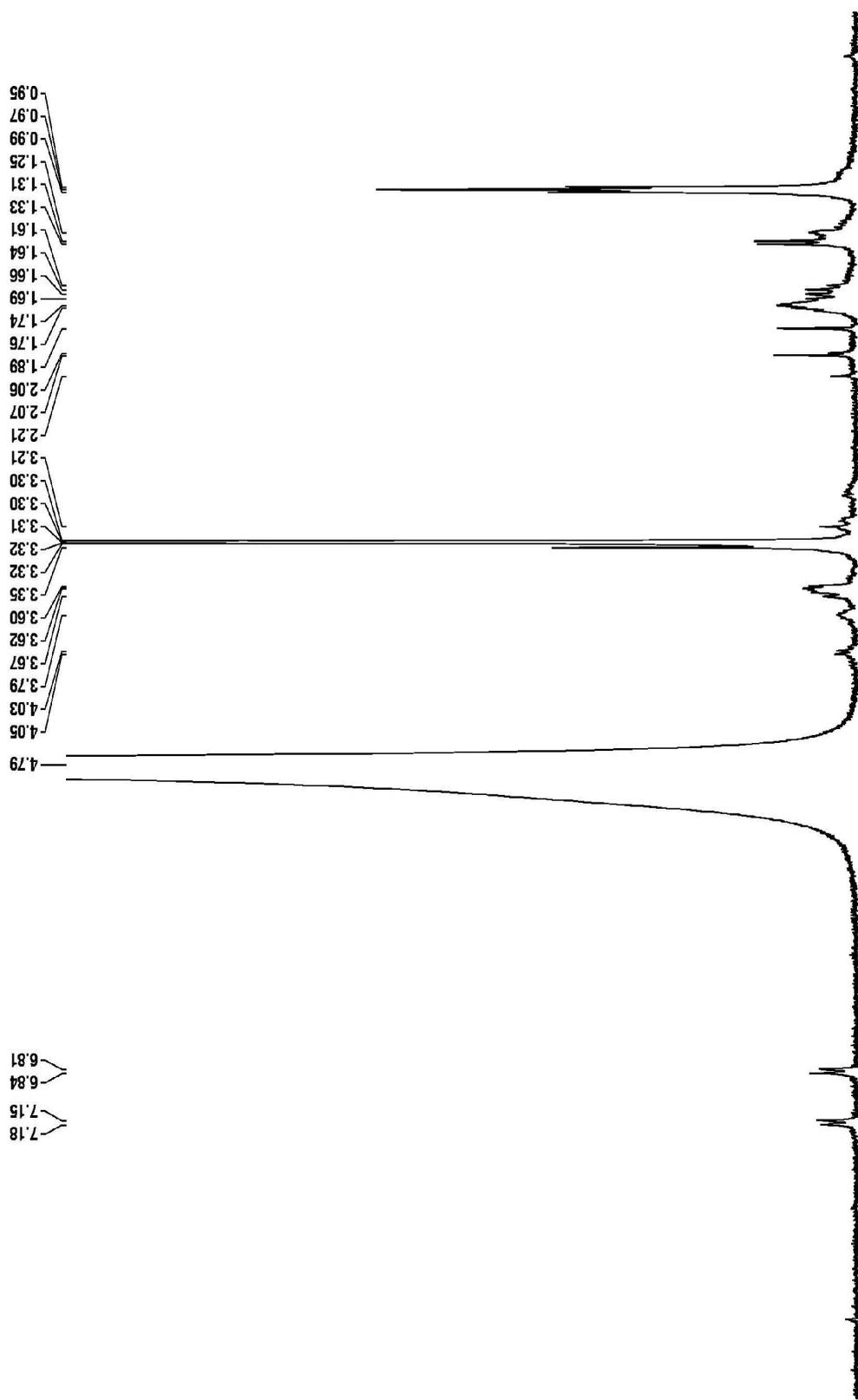


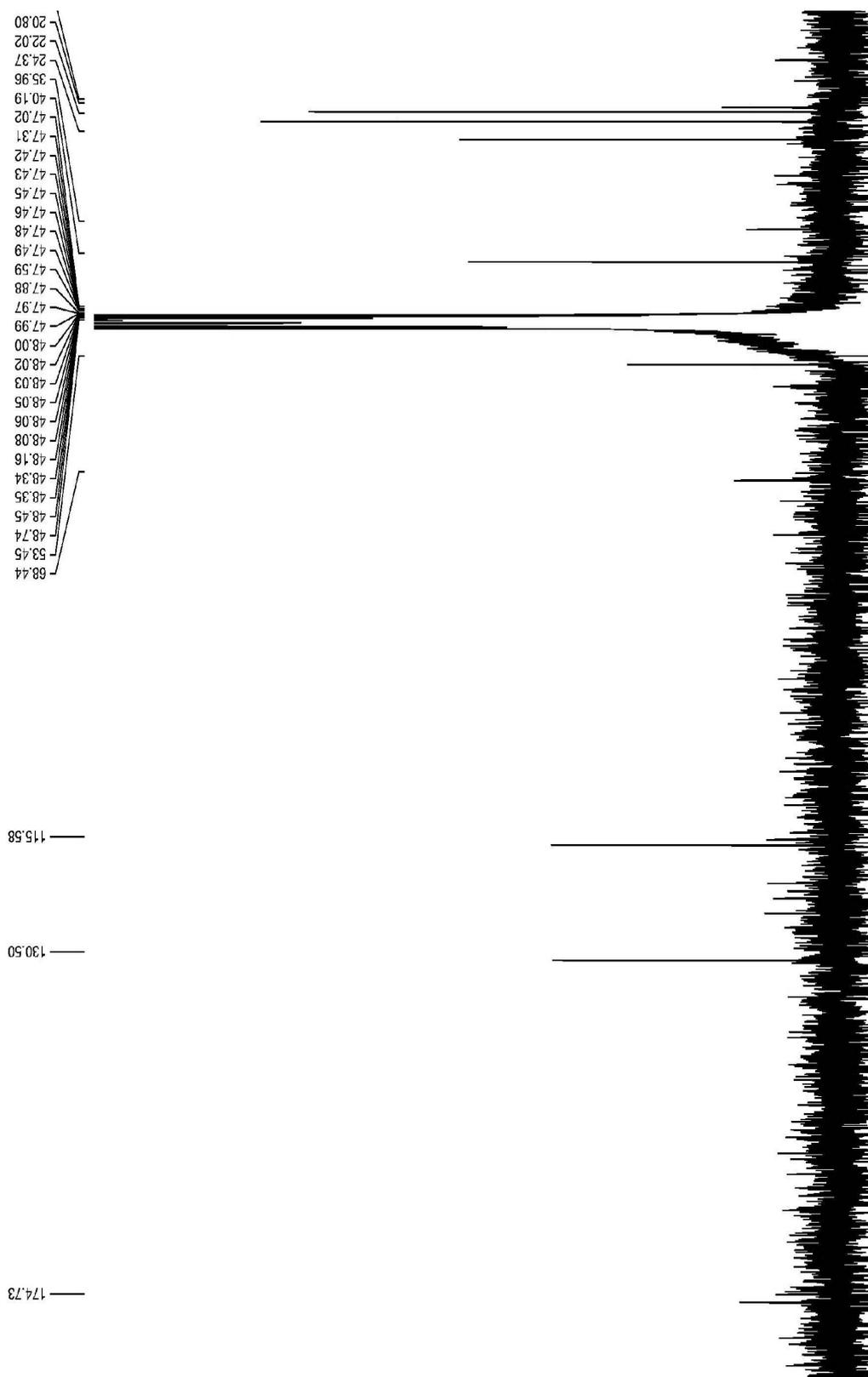
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de **5** (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).

C	5		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H→C)
1/7	20,8	0,96 (3H, <i>d</i> , 5,4 Hz)	C-2/6; C-3/5
2/6	24,4	1,74 (1H, <i>m</i>)	C-1/7; C-2''/6''
3/5	40,2	1,64 (1Ha, <i>dd</i> , 17,3 e 8,4 Hz)	C-2/6
		1,74 (1Hb, <i>dd</i> , 17,3 e 5,2 Hz)	C-2/6
4	53,5	3,63 (1H, <i>m</i>)	C-2/6; C-3/5
2''/6''	22,0	0,98 (3H, <i>d</i> , 5,4 Hz)	C-2/6; C-3/5
1'	126,9	-	-
2'/6'	115,6	6,82 (1H, <i>d</i> , 8,2 Hz)	C-1'; C-4
3'/5'	130,6	7,16 (1H, <i>d</i> , 8,2 Hz)	C-4'
4'	155,6	-	-

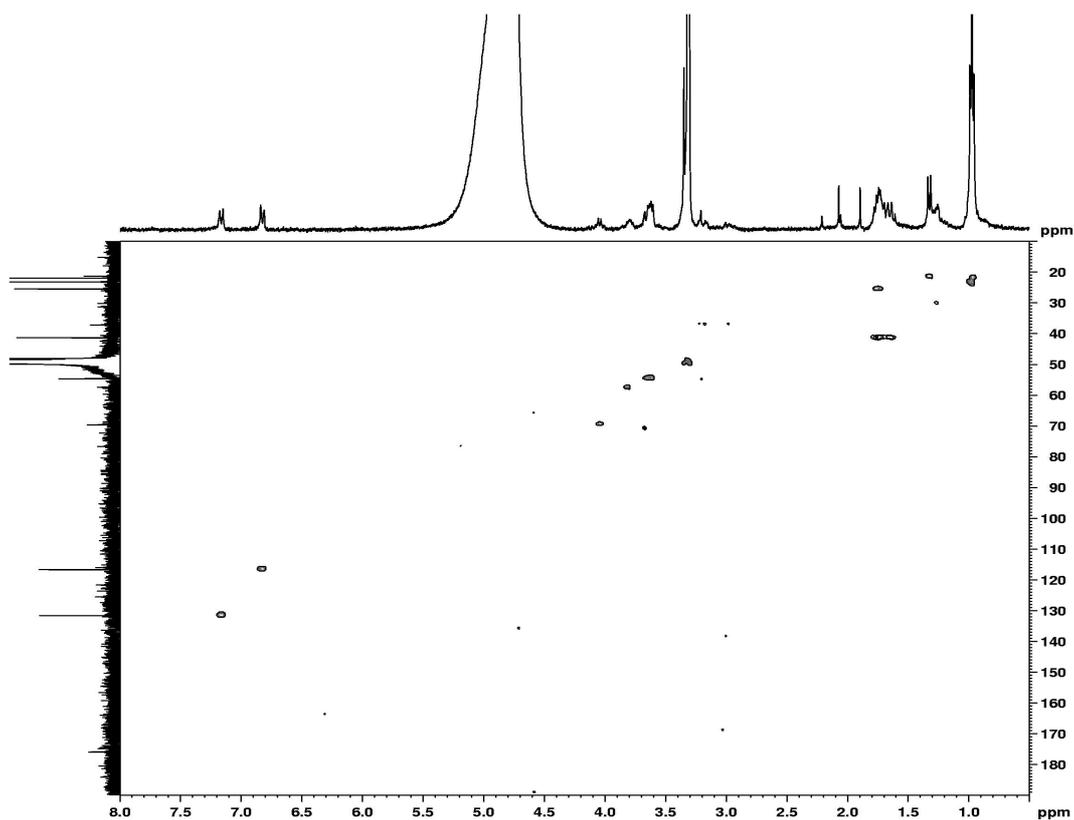
A obtenção desta substância foi relatada apenas como produto de síntese (Shioji *et al.*, 2006), sendo este o primeiro relato de sua ocorrência na natureza.



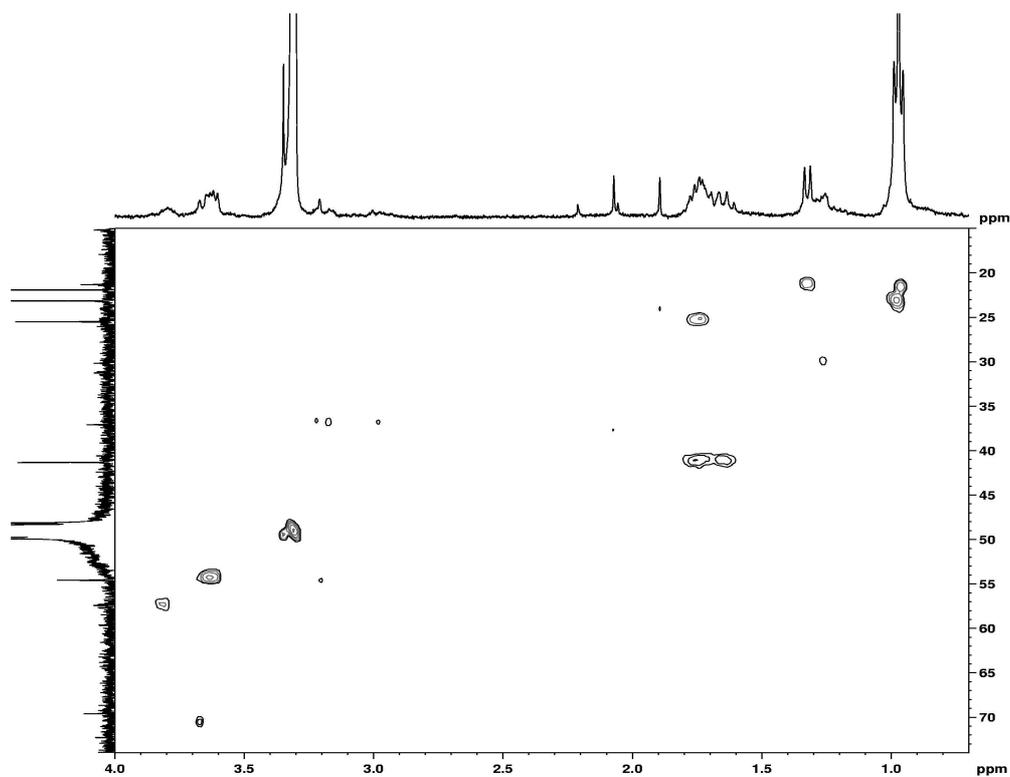
Espectro 14 - Dados de RMN ^1H de **5** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



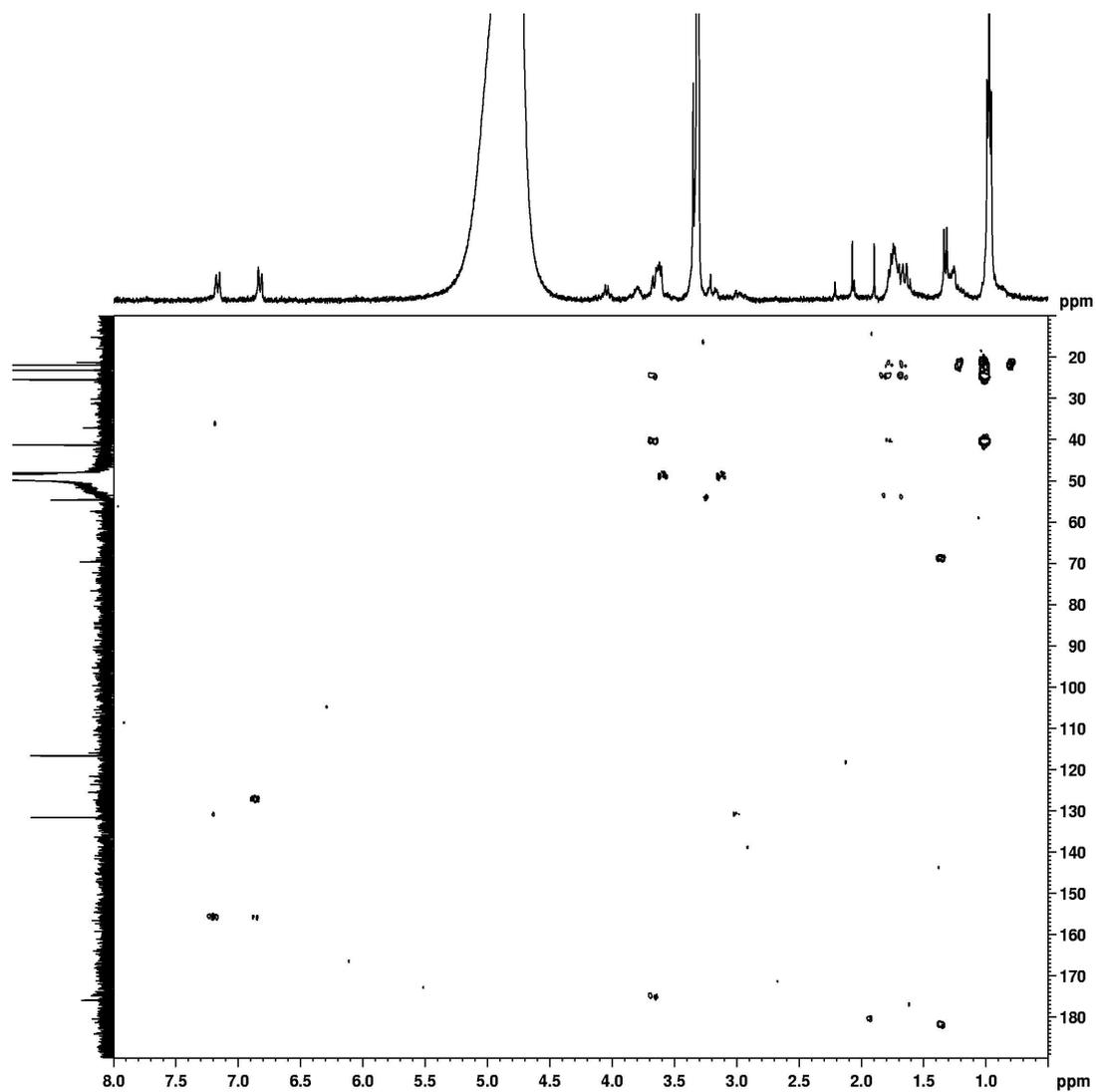
Espectro 15 - Dados de RMN ^{13}C de **5** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



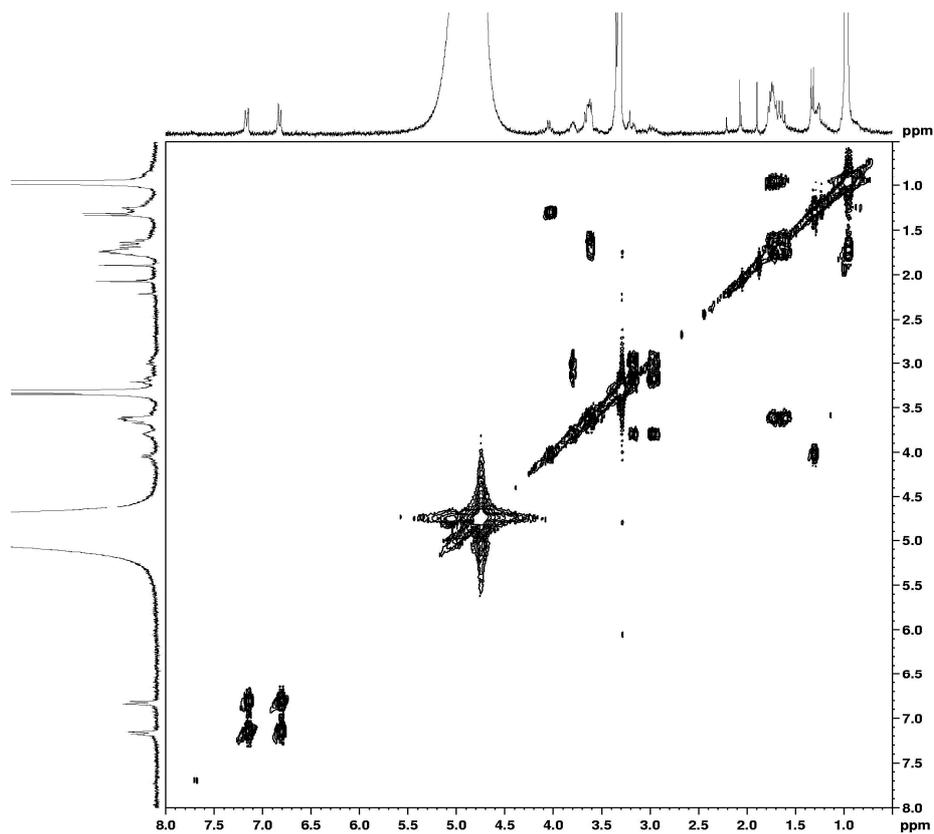
Espectro 16 - Experimento de HSQC de **5** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



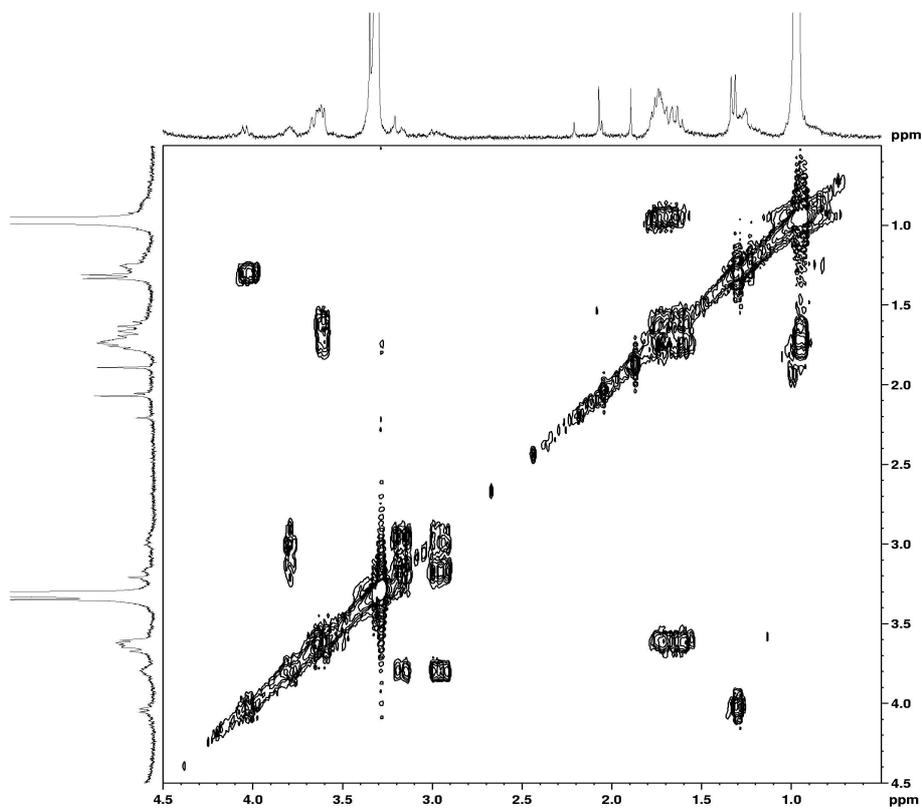
Espectro 16a - Expansão do espectro de HSQC de **5** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 17 - Experimento de HMBC de **5** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 18 - Experimento de COSY ^1H - ^1H de **5** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 18a - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H de **5** (300 MHz, CD_3OD , TMS).

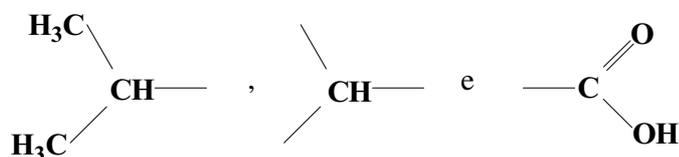
4.4 - Substância 3

Da fração MFM1 g-3 [Item 3.3; Fluxograma 2] isolou-se uma substância sólida de coloração branca, rotação óptica de $[\alpha]_D^{23} + 19,0$ (MeOH, c 0,1), codificada como 3.

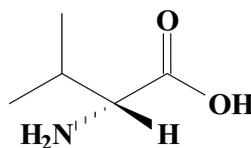
No espectro de RMN de ^1H de 3 [Espectro 19; Tabela 11] foram observados três dubletos em δ 0,99 ($J = 7,0$ Hz), 1,04 ($J = 7,0$ Hz) e 3,49 ($J = 4,2$ Hz), sendo os dois primeiros relativos a metilas e o terceiro a um metino, um multiplete em δ 2,27 e um sinal em δ 7,80, sugestivo de hidrogênio de ácido carboxílico.

Através da análise dos dados do espectro de RMN de ^{13}C de 3 [Espectro 20; Tabela 11] foram evidenciados sinais para cinco carbonos, sendo um relativo a carboxila (δ 174,4), dois referentes a metilas (δ 17,7 e 19,1) e dois relativos a metinos (δ 30,4 e 61,6).

Portanto, a estrutura do composto 3 é constituída dos fragmentos abaixo:



A conexão destes grupos indica que se trata de um dímero ou há um substituinte não detectado. Os valores dos deslocamentos químicos relacionados com um dos CH (δ_{C} 61,6 e δ_{H} 3,49) são compatíveis com a ligação com um nitrogênio numa posição α à carboxila. Desta forma, a estrutura compatível com este padrão de deslocamento químico e com os outros dados mencionados leva à estrutura abaixo.



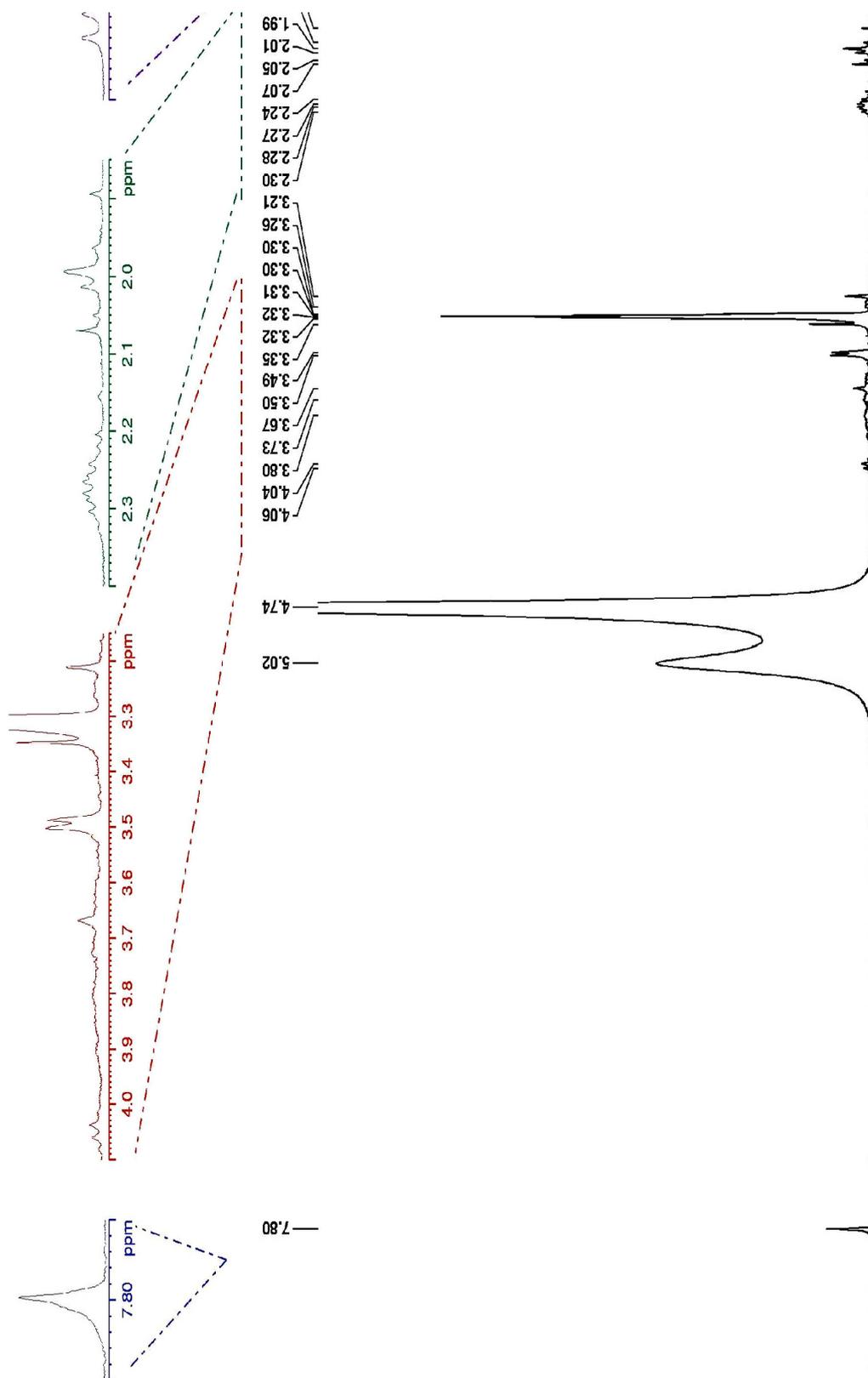
3

Esta estrutura corresponde ao aminoácido L - valina; a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 3 com os da valina (Pouchert & Behnke, 1993)

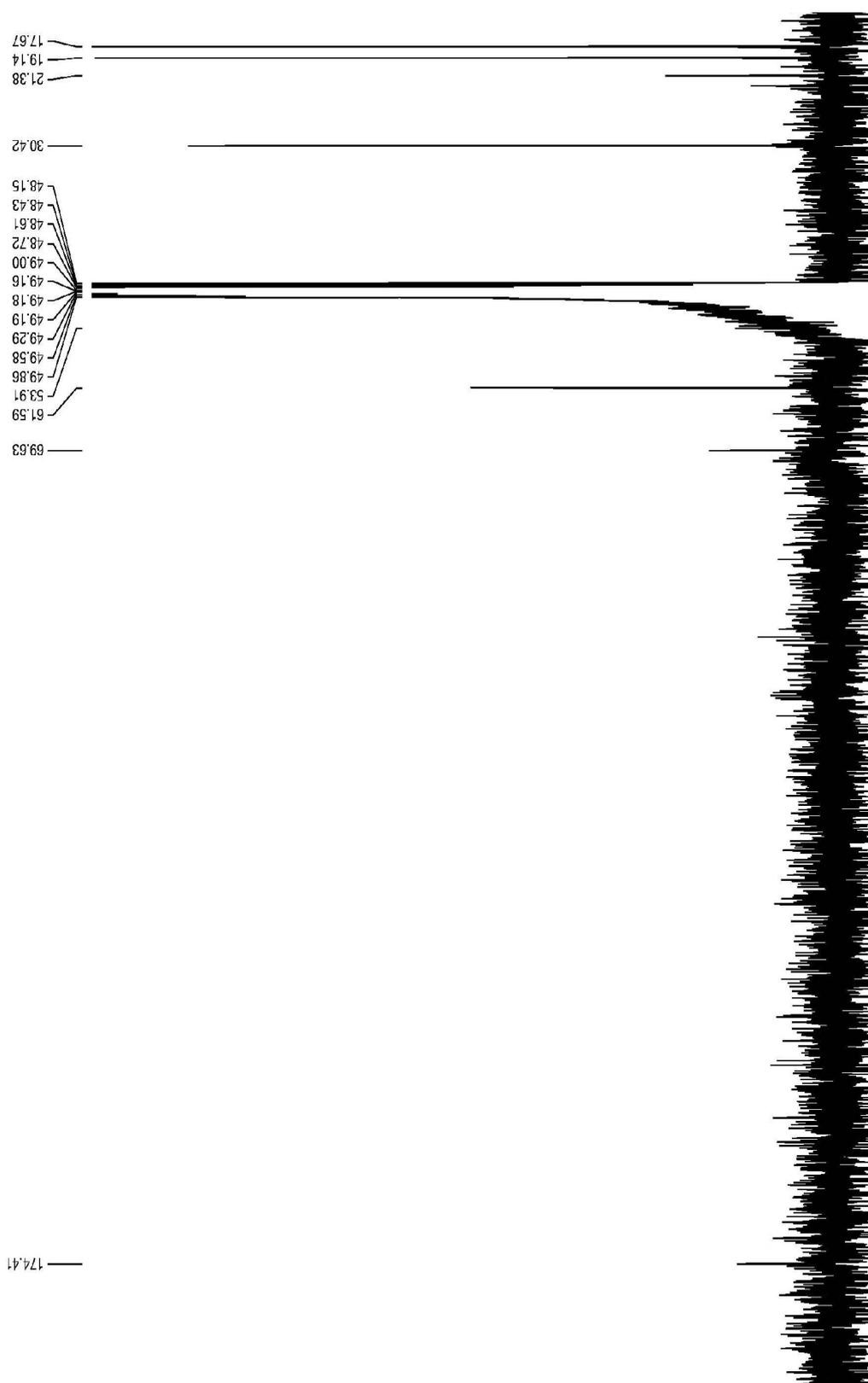
[Tabela 11] mostraram tratar-se, realmente da mesma substância. Provavelmente, as pequenas diferenças observadas nos valores de deslocamento químico estão relacionadas com os solventes utilizados para obtenção dos espectros, pois os de **3** foram obtidos em CD₃OD e da L - valina em D₂O + DCl.

Tabela 11 - Dados de RMN de ¹H e ¹³C de **3** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS δ = 0) e da L - valina (D₂O + DCl).

C	L - Valina (Pouchert & Behnke, 1993)	3	
	δ ¹³ C	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	174,3	174,4	-
2	61,1	61,6	3,49 (1H; <i>d</i> , 4,2 Hz)
3	31,7	30,4	2,27 (1H; <i>m</i>)
4	20,2	19,1	1,04 (3H; <i>d</i> , 7,0 Hz)
5	19,7	17,7	0,99 (3H; <i>d</i> , 7,0 Hz)



Espectro 19 - Dados de RMN ^1H de 3 (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



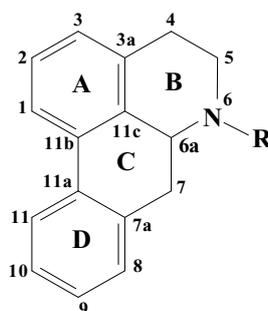
Espectro 20 - Dados de RMN ^{13}C de **3** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).

4.5 - Substância 8

Da fração MFBM5-1 [Item 3.5; Fluxograma 3] isolou-se uma substância oleosa de coloração amarela, codificada como **8**. No seu espectro de RMN de ^1H [Espectro 21; Tabela 13] foram observados dois singletos em δ 6,97 e 7,64, referentes a hidrogênios aromáticos, dois dubletos em δ 5,97 ($J = 1,0$ Hz) e 6,12 ($J = 1,0$ Hz), relativos a hidrogênios de um grupo metilenodióxi e quatro singletos em δ 3,40, 3,83, 3,87 e 4,04 relativos a metilas, sendo três destes de metoxilas aromáticas, além de sinais entre δ 3,25 e 2,87.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e/ou experimento de HSQC [Espectros 22, 23 e 23a; Tabela 13] foram evidenciados sinais para vinte e um carbonos, destacando-se doze carbonos de anel aromático, sendo dois CH (δ 112,0 e 113,3) e dez não ligados a hidrogênio, dos quais cinco são sugestivos de carbonos oxigenados (δ 137,3, 140,4, 145,8, 149,4 e 149,9). Foram observados também sinais em δ 56,5, 56,7, 58,0 e 59,9, relativos a quatro metilas, em δ 72,1 (CH) e a quatro carbonos secundários (CH_2), sendo um de metilenodióxi (OCH_2O) em δ 102,5 e os outros, em δ 65,3, 29,4 e 20,6.

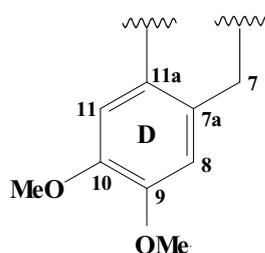
Considerando-se que a estrutura de **8** é constituída de dois anéis aromáticos, três CH_2 , um CH e metilas (e/ou metoxilas) e, ainda, com base no perfil do espectro de RMN de ^1H [Espectro 21; Tabela 13] e nas informações contidas nos espectros de RMN de ^{13}C [Espectro 22; Tabela 13], admitiu-se a possibilidade de que esta substância pertença à classe dos alcalóides aporfínicos.



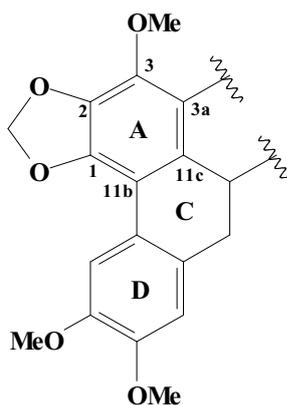
Esqueleto de Alcalóide Aporfínico

Por razões de biossíntese, pode-se propor que as posições C-1 e C-2 encontram-se ligadas a oxigênio. Como os espectros de RMN ^1H e ^{13}C mostram a presença de apenas dois CH de anéis aromáticos, existem ainda três carbonos aromáticos oxigenados. Os dois sinais de hidrogênios de anel aromático são singletos, indicando que não são adjacentes. O deslocamento químico do sinal em δ_{H} 7,64 (s) é característico de um hidrogênio ligado em C-11 (Garcez, 1991). O outro hidrogênio, em δ_{H} 6,97 (s) poderia ser C-3 ou C-8 descartando-se C-9 e C-10 em virtude da ausência de acoplamento de H-11.

No experimento HMBC [Espectros 24, 24a e 24b; Tabela 13] foram observadas correlações intensas entre o hidrogênio (δ 6,97) ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 113,3 (C-8) e os carbonos C-11a (δ 124,3), C-10 (δ 149,4) e C-7 (δ 29,4), e entre o hidrogênio (δ 7,64) ligado ao carbono referente ao sinal em δ 112,0 (C-11) e os carbonos C-7a (δ 126,9), C-9 (δ 149,9) e C-11b (δ 112,7). Também foram observadas correlações dos hidrogênios das metoxilas relativas aos sinais em δ 3,83 (δ_{C} 56,7 O-CH₃) e 3,87 (δ_{C} 56,5 O-CH₃) com os carbonos em δ 149,4 (C-10) e 149,9 (C-9), respectivamente. Considerando estas observações e a presença de metoxilas na molécula pode-se propor um padrão de substituição para o anel D, conforme a estrutura parcial abaixo.



Observou-se também no experimento HMBC [Espectros 24, 24a e 24b; Tabela 13] correlações com intensidade moderada entre os hidrogênios do grupo metilenodióxi, OCH₂O- (δ 5,97 e 6,12) e os carbonos correspondentes aos sinais em δ 137,3 (C-2) e 145,8 (C-1). A correlação entre os hidrogênios da metoxila correspondente ao sinal em δ 4,04 (δ_{C} 59,9, O-CH₃-3) e o carbono em δ 140,4 também pode ser observada nesse experimento.



No espectro de RMN ^{13}C de um alcalóide aporfínico onde o substituinte do nitrogênio é H pode ser observado um sinal entre δ 28,0 e 30,0, relativo ao carbono na posição 4 (C-4) e sinais em torno de δ 43, 53 e 37, referentes aos carbonos nas posições 5 (C-5), 6a (C-6a) e 7 (C-7), respectivamente (Garcez, 1991).

Já o espectro de RMN ^{13}C de um alcalóide aporfínico onde o substituinte do nitrogênio é CH_3 observa-se sinais em aproximadamente δ 53 e 62, relativos aos carbonos nas posições 5 (C-5) e 6a (C-6a), respectivamente, pois sofrem efeito β de desproteção. É possível observar também sinais em torno de δ 26 e 34, relativos aos carbonos nas posições 4 (C-4) e 7 (C-7) que sofrem efeito γ de proteção. Comparando estas informações com as obtidas através do espectro de RMN de ^{13}C de **8** [Espectro 22; Tabela 13] verificou-se que os sinais relativos a C-4 e C-7 estavam mais protegidos (δ 20,6 e 29,4, respectivamente); já os referentes a C-5 (δ 65,3) e C-6a (δ 72,1) encontram-se mais desprotegidos.

Além destas observações, pode-se destacar os sinais nos espectros de RMN ^1H [Espectro 21; Tabela 13] em δ 3,40 e de ^{13}C [Espectro 22; Tabela 13] em δ 58,0, correspondentes a uma metila que deve estar ligada ao nitrogênio, apesar de apresentar δ_{H} e δ_{C} maiores que os habitualmente observados. As correlações intensas observadas no experimento HMBC [Espectros 24, 24a e 24b; Tabela 13] entre os hidrogênios da metila correspondente ao sinal em δ 3,40 e os carbonos referentes aos sinais em δ 65,3 (C-5) e 72,1 (C-6a), além de

uma correlação com intensidade fraca dos hidrogênios da referida metila com o carbono relativo ao sinal em δ 20,6 (C-4), são compatíveis com esta proposta.

Observou-se ainda, correlações muito intensas entre os hidrogênios de C-5 (δ 3,67) e o carbono da metila mencionada (δ 58,0 -N-CH₃). Esse conjunto de dados, com deslocamentos químicos aparentemente fora do comum, é compatível com a presença de um oxigênio ligado ao nitrogênio (Me-N⁺-O⁻), ou seja, um N-óxido. Estes dados permitem, portanto, propor para **8** a estrutura abaixo, que corresponde a **6R-N-óxido ocoteína**. O espectro de massa de alta resolução apresentou [M + H]⁺ a m/z 386,1599 [Espectro 26], que é compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₄NO₆ e, portanto, corrobora com essa proposta.

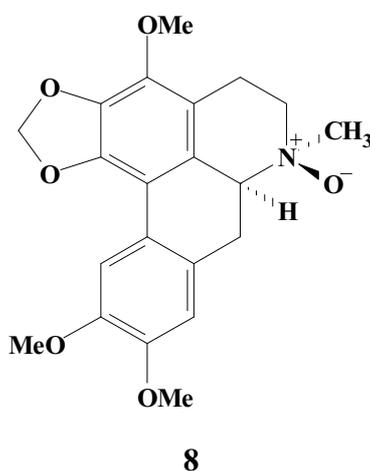


Tabela 12 - Correlações observadas no experimento NOESY de **8** (300 MHz).

C	δ 'H	NOESY
6a	45,7	N-CH ₃
7	3,25	H-8
8	6,97	H-7, O-CH ₃ -9
11	7,64	O-CH ₃ -10
N-CH ₃	3,40	H-6a
O-CH ₃ - 9	3,87	H-8
O-CH ₃ - 10	3,83	H-11

Através do experimento NOESY [Espectros 25 e 25a; Tabela 12] da substância **8** foi observada a correlação entre o hidrogênio (δ 4,57) ligado ao carbono referente ao sinal em δ 72,1 (C-6a) e os hidrogênios da metila em δ 3,40, ligada ao nitrogênio (N-CH₃), indicando que estes estão do mesmo lado.

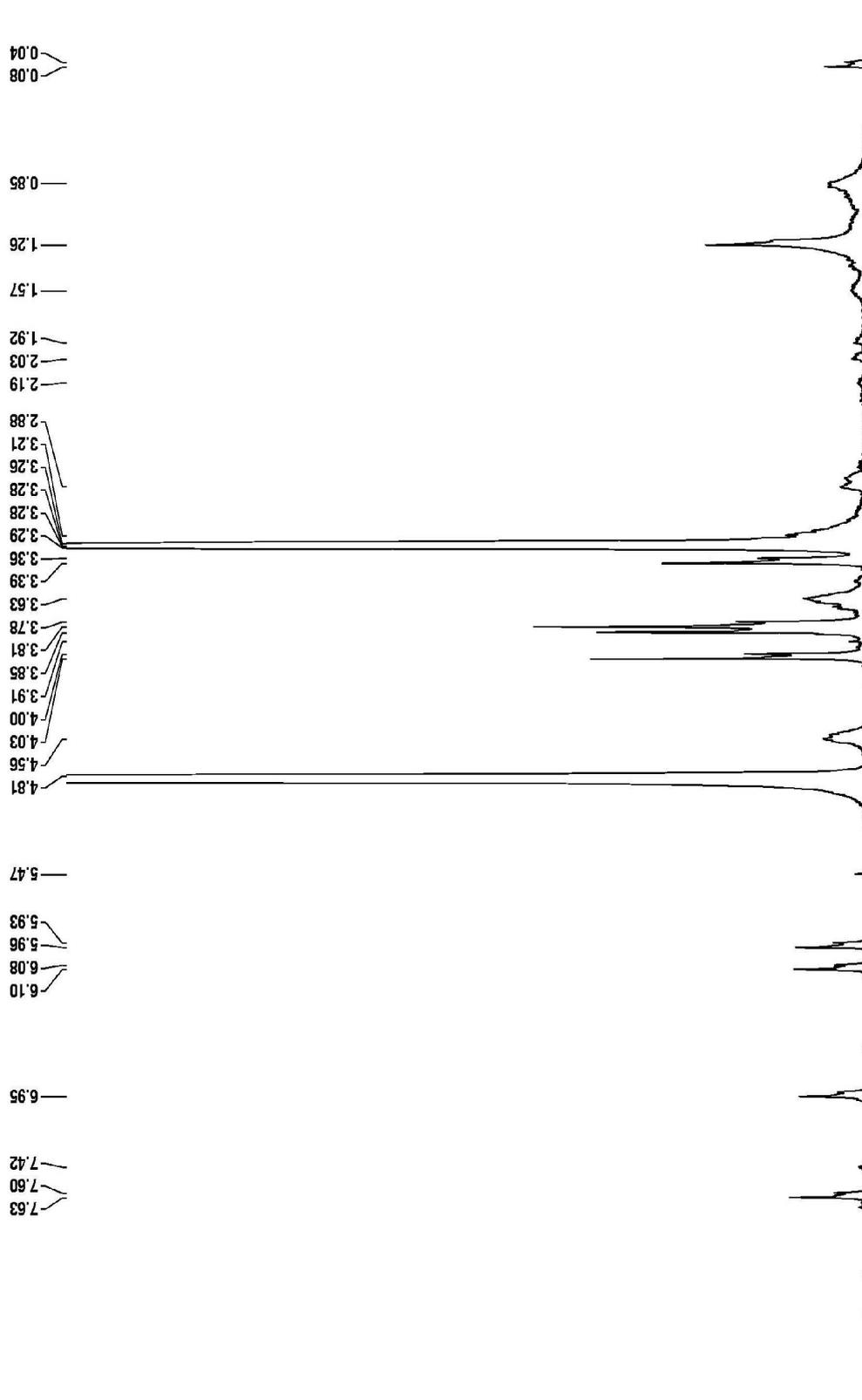
Na literatura consta a obtenção da substância (+)-6*S*- N-óxido ocoteína a partir de *Ocotea acutifolia* (Garcez *et al.*, 2011). Nesta substância a metila está ligada ao nitrogênio (N-CH₃) do lado oposto ao hidrogênio ligado ao carbono 6a (C-6a).

A rotação óptica específica na raia D do sódio determina a configuração absoluta do centro assimétrico C-6a nos alcalóides aporfínicos, pois os compostos dextrógiros têm configuração (*S*) e os levógiros (*R*) (Silva, 2006). A comparação dos dados de RMN de ¹³C de **8** e da substância (+)-6*S*-N-óxido ocoteína mostrou apenas uma alteração significativa: efeito de desproteção de +9,7 ppm sobre o sinal relativo à metila ligada ao nitrogênio (Me-N). Este efeito é compatível com uma inversão na configuração relativa do nitrogênio. A rotação óptica medida para **8** foi de $[\alpha]_D^{23} + 13,0$ (MeOH, *c* 0, 23) e assim foi possível determinar a configuração absoluta do centro assimétrico C-6a e a substância **8** foi identificada como sendo **(+)-6a*S*-6*R*-N-óxido ocoteína**.

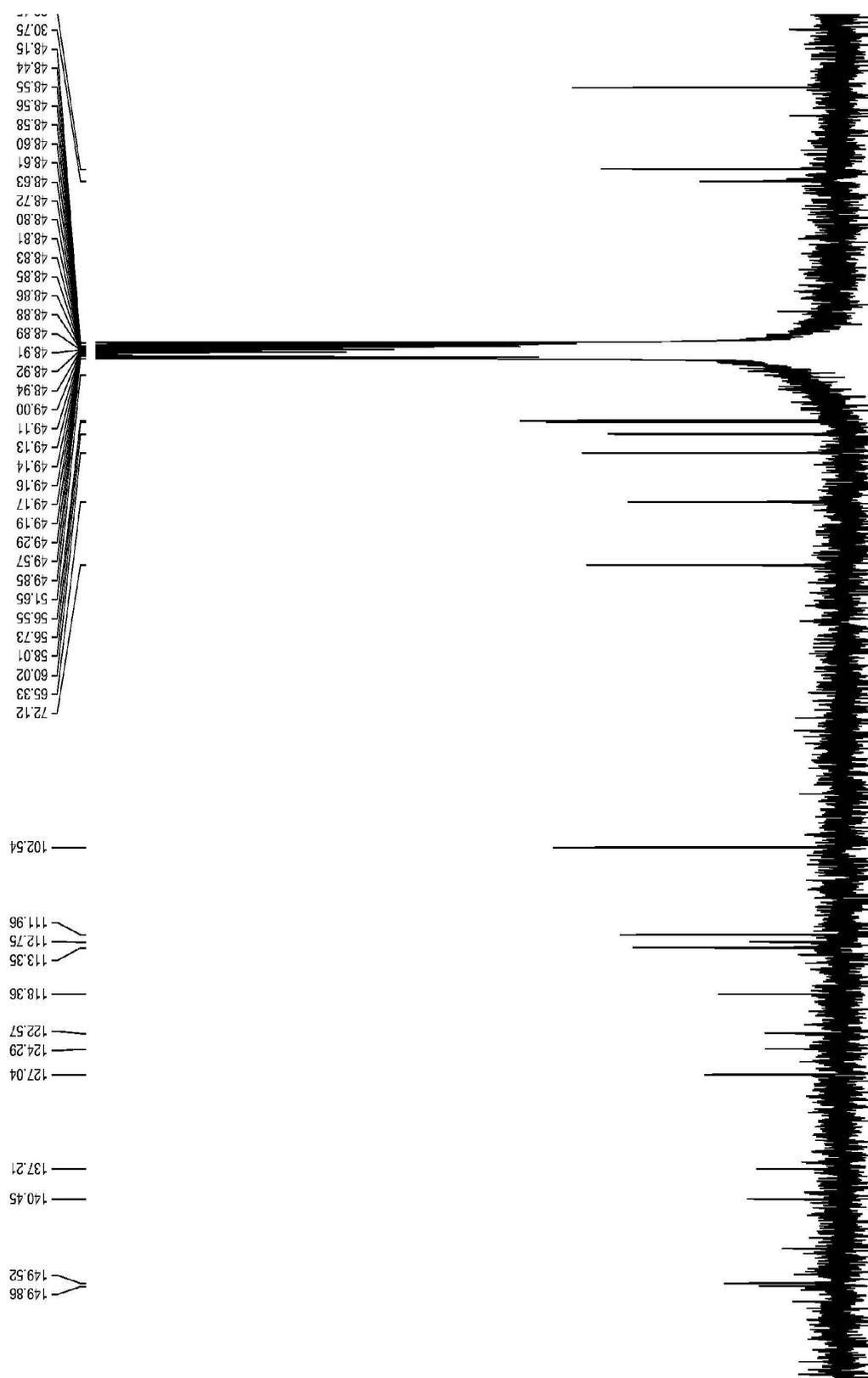
Diversos estudos fitoquímicos vêm sendo empreendidos com diferentes espécies de *Mimosa*, mas até o momento nenhum alcalóide foi caracterizado e/ou identificado como substâncias indutoras dos genes da nodulação. Este, também, é o primeiro relato desta substância na literatura, portanto, trata-se de um composto inédito.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de **8** (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).

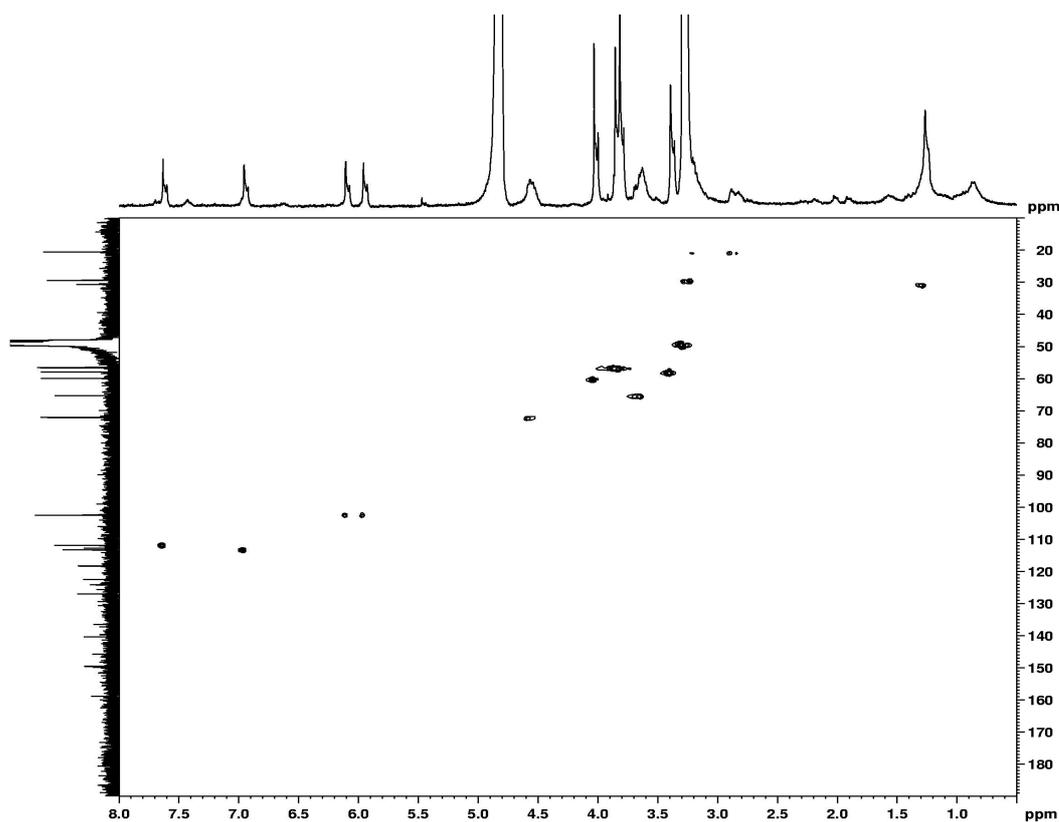
C	8		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H→C)
1	145,8	-	-
2	137,3	-	-
3	140,4	-	-
3a	118,3	-	-
4	20,6	2,87 (1Ha; <i>ddl</i> , 3,7 e 17,0 Hz) 3,18 (1Hb; <i>m</i>)	-
5	65,3	3,67 (2H; <i>m</i>)	C-4
6a	72,1	4,57 (1H; <i>dd</i> , 5,7 e 13,2 Hz)	-
7	29,4	3,25 (2H; <i>m</i>)	C-7a; C-11a
7a	126,9	-	-
8	113,3	6,97 (1H; <i>s</i>)	C-7; C-9; C-10; C-11a
9	149,9	-	-
10	149,4	-	-
11	112,0	7,64 (1H; <i>s</i>)	C-7a, C-9; C-10; C-11a; C-11b
11a	124,3	-	-
11b	112,7	-	-
11c	122,5	-	-
N-CH ₃	58,0	3,40 (3H; <i>s</i>)	C-4; C-5; C-6a
O-CH ₃ -3	59,9	4,04 (3H; <i>s</i>)	C-3
O-CH ₃ -9	56,5	3,87 (3H; <i>s</i>)	C-9
O-CH ₃ -10	56,7	3,83 (3H; <i>s</i>)	C-10
OCH ₂ O-1, 2	102,5	5,97 (1Ha; <i>d</i> , 1,0 Hz)	C-1; C-2
		6,12 (1Hb; <i>d</i> , 1,0 Hz)	C-1; C-2



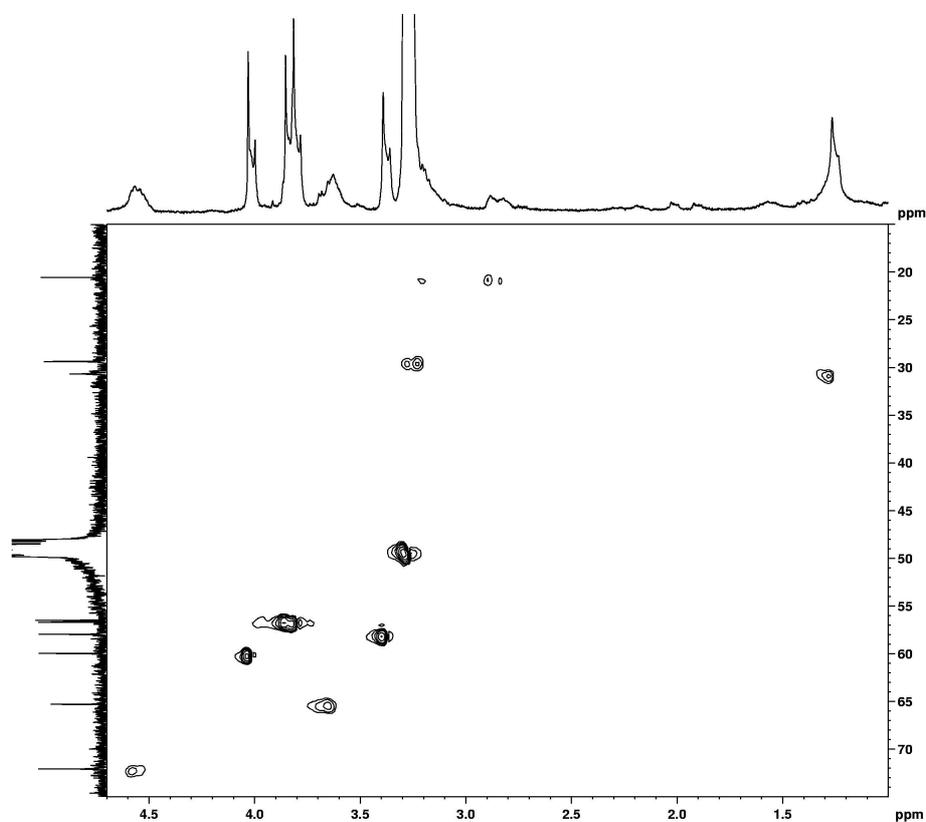
Espectro 21 - Dados de RMN ^1H de **8** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



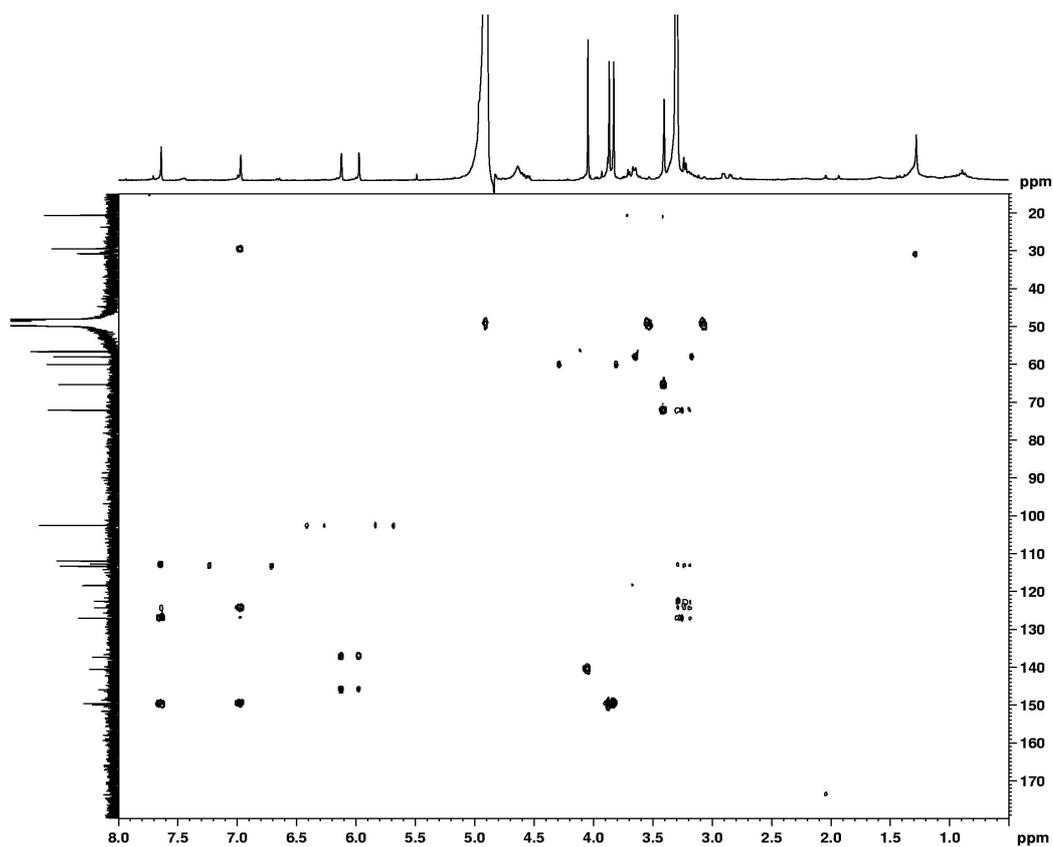
Espectro 22 - Dados de RMN ^{13}C de **8** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



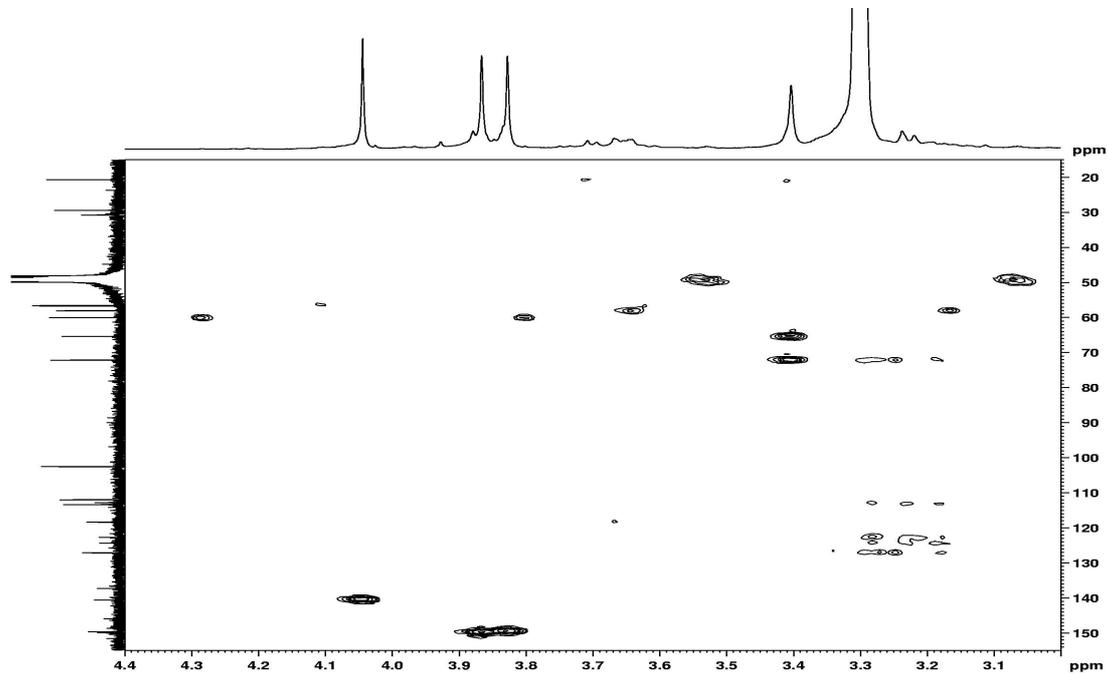
Espectro 23 - Experimento de HSQC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



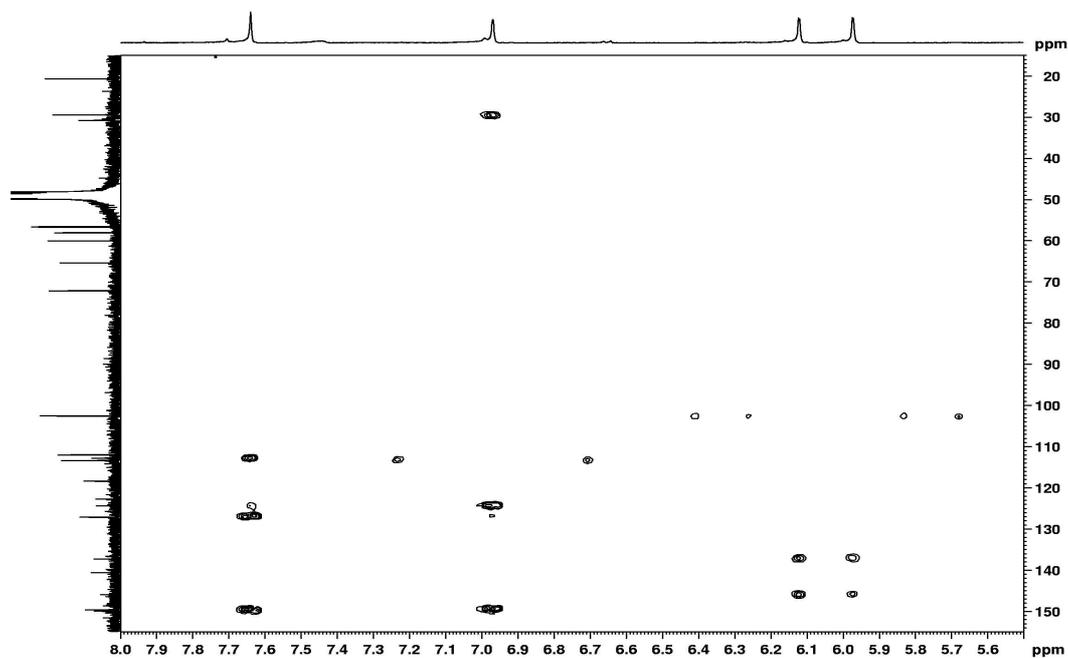
Espectro 23a - Expansão do espectro de HSQC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



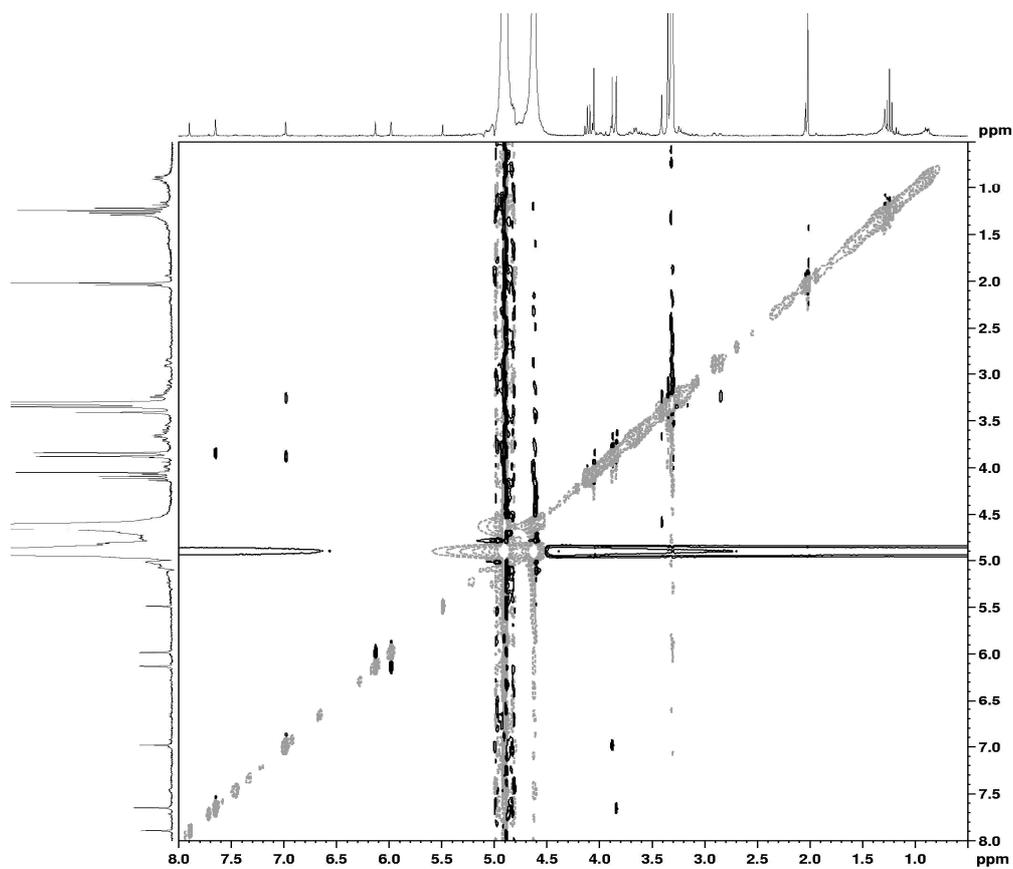
Espectro 24 - Experimento de HMBC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



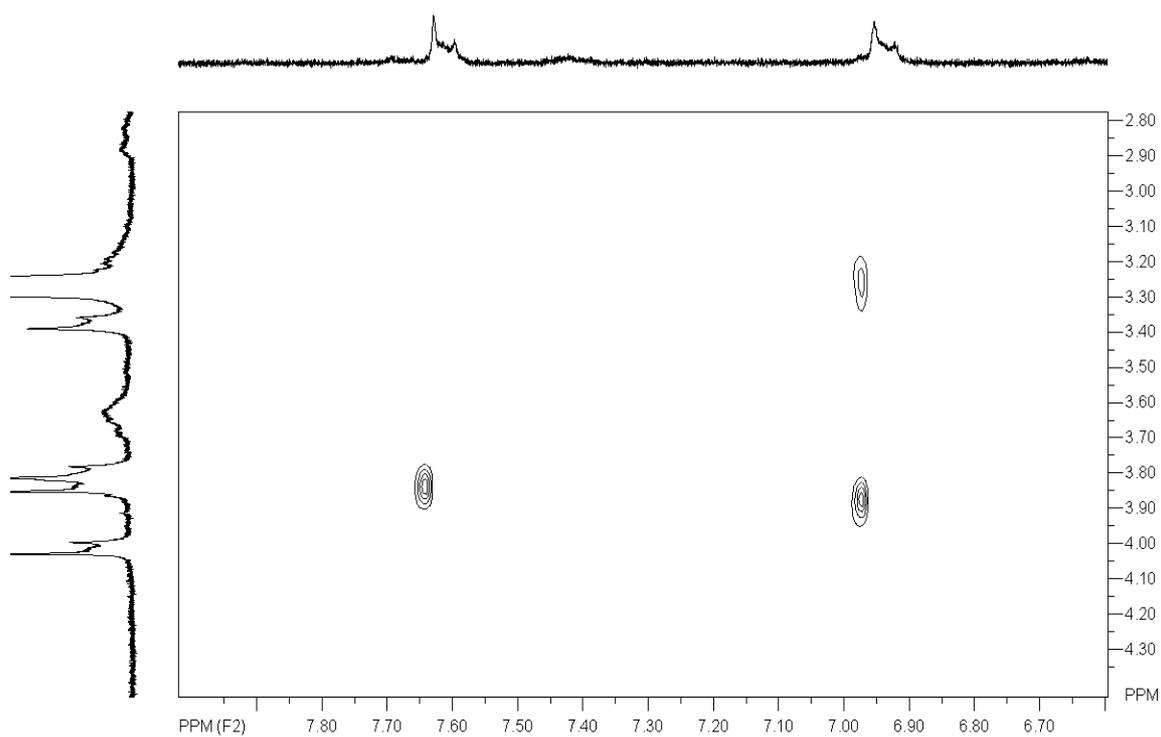
Espectro 24a - Expansão do espectro de HMBC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



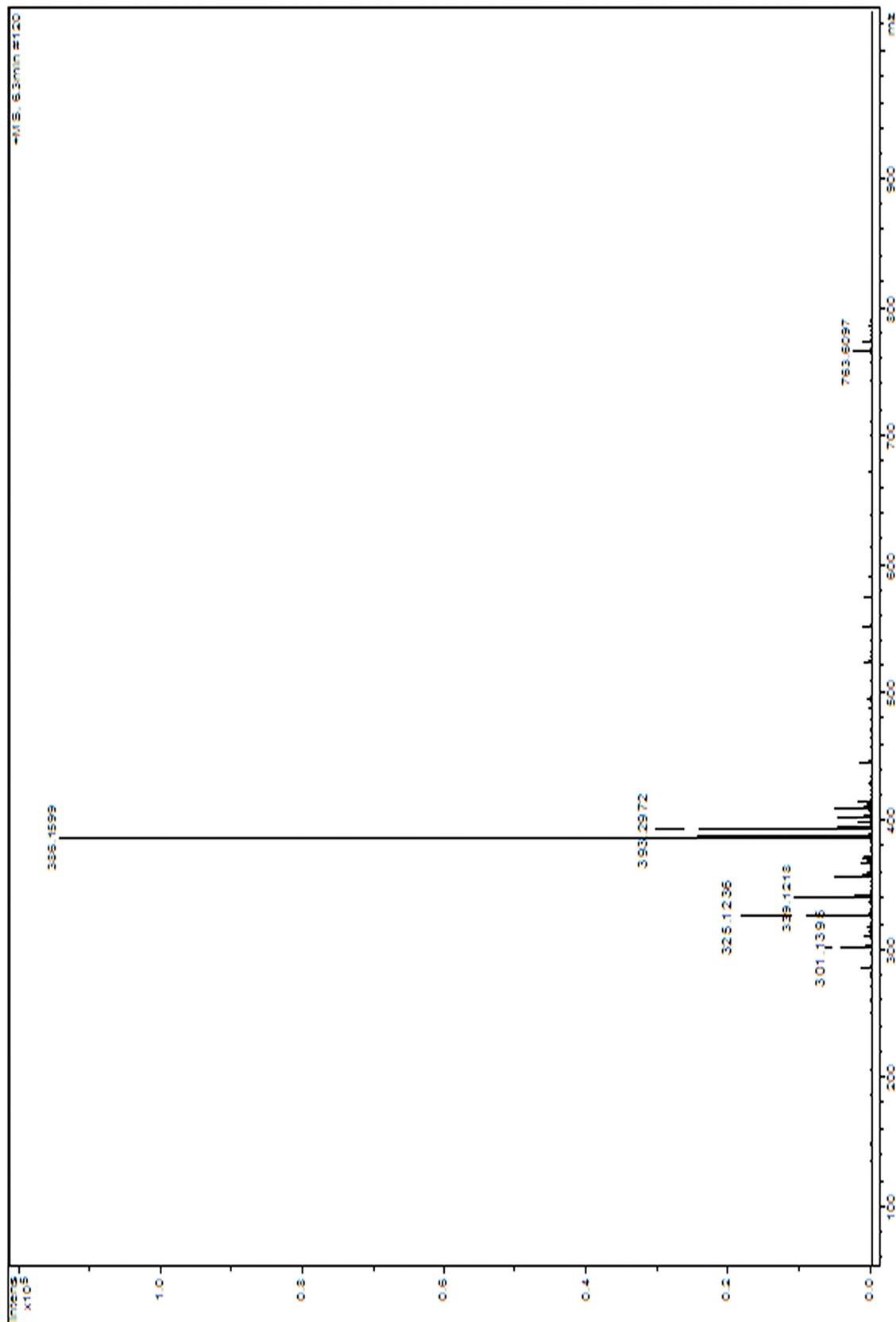
Espectro 24b - Expansão do espectro de HMBC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 25 - Experimento de NOESY de **8** (300 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 25a - Expansão do espectro de NOESY de **8** (300 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 26 - Espectro de massa (HRESIMS, modo positivo) de **8**.

4.6 - Substância 9

Da fração MFBM5-3 [Item 3.5; Fluxograma 3] isolou-se uma mistura - de duas substâncias, uma delas ainda não identificada - com aspecto oleoso e coloração amarela que foi codificada como 9.

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de 9 [Espectros 27, 28 e 29; Tabela 14] mostraram-se semelhantes aos de 8 [Espectro 22; Tabela 13], indicando que esta substância também é um alcalóide do tipo aporfínico.

No espectro de RMN de ^1H de 9 [Espectro 27; Tabela 14] foi possível observar dois singletos em δ 6,97 e 7,64, referentes a hidrogênios de anel aromático (H-8 e H-11, respectivamente) e dois dubletos em δ 5,99 ($J = 1,0$ Hz) e 6,15 ($J = 1,0$ Hz), relativos a hidrogênios de um grupo metilenodióxi, presentes no anel A. Além desses, foram observados três singletos em δ 3,82, 3,86 e 4,06 relativos a metoxilas ligadas a anéis aromáticos, como observado em 8. Comparando os espectros de RMN de ^1H de 8 e 9 [Espectros 21 e 27; Tabelas 13 e 14] verificou-se que a diferença entre estas reside apenas no valor de deslocamento químico do sinal relativo à metila ligada a nitrogênio ($\text{CH}_3\text{-N}$) que para 9 foi observado em δ 3,07 e para 8 δ 3,40.

Os sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C de 9 [Espectro 28; Tabela 14] mostraram boa correlação com os observados no espectro de 8 [Espectro 22; Tabela 13], com alteração significativa no valor relativo à metila ligada a nitrogênio ($\text{CH}_3\text{-N}$) em δ 49,5, que no espectro de 8 foi observado em δ 58,0, compatível com uma inversão na configuração relativa do nitrogênio.

As informações fornecidas pelas correlações existentes Experimento de HMBC de 9 [Espectro 30; Tabela 14] confirmaram a proposta estrutural para o alcalóide aporfínico 9. Neste experimento foram observadas correlações entre o hidrogênio (δ 6,97) ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 113,1 (C-8) e os carbonos C-7 (δ 29,3), C-9 (δ 149,7) e C-11a (δ 124,3) e entre o hidrogênio (δ 7,64) ligado ao carbono referente ao sinal em δ 112,0 (C-11) e os carbonos C-10 (δ 150,0), C-11a (δ 124,3) e C-11c (δ 126,6). Também foi possível observar

correlações entre os hidrogênios das metoxilas relativas aos sinais em δ 3,82 (δ_C 56,7 O-CH₃), 3,86 (δ_C 56,5 O-CH₃) e 4,06 (δ_C 60,1 O-CH₃) com os carbonos em δ 149,7 (C-9), 150,0 (C-10) e 140,7 (C-3) respectivamente. Além destas, foram observadas correlações entre os hidrogênios do grupo metilenodióxi, OCH₂O- (δ 5,99 e 6,15) e o carbono correspondente ao sinal em δ 137,4 (C-2). As correlações dos hidrogênios de C-7 (δ 2,91 e δ 3,53) e do hidrogênio de C-4 (δ 3,04) com o carbono da metila mencionada (δ 49,5 -N-CH₃) também foram observadas no experimento HMBC [Espectro 30; Tabela 14].

Estes dados ao serem comparados com os da substância **8**, reforçaram a idéia de que a diferença estrutural entre os dois compostos residia unicamente na inversão na configuração relativa do nitrogênio.

Assim, após a medida da rotação óptica de $[\alpha]_D^{23} + 35,0$ (MeOH, *c* 0,11) e comparação dos dados de RMN ¹³C de **9** com dados encontrados na literatura, este alcalóide aporfínico foi caracterizado como **(+)-6aS-6S-N-óxido ocoteína**, obtido anteriormente de *Ocotea acutifolia* (Garcez *et al.*, 2011).

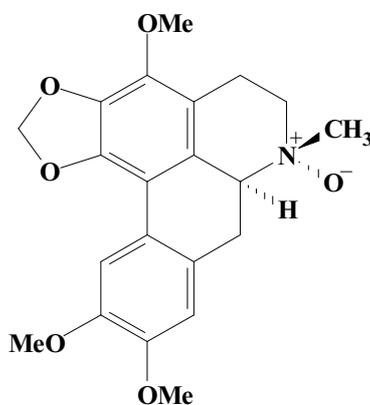
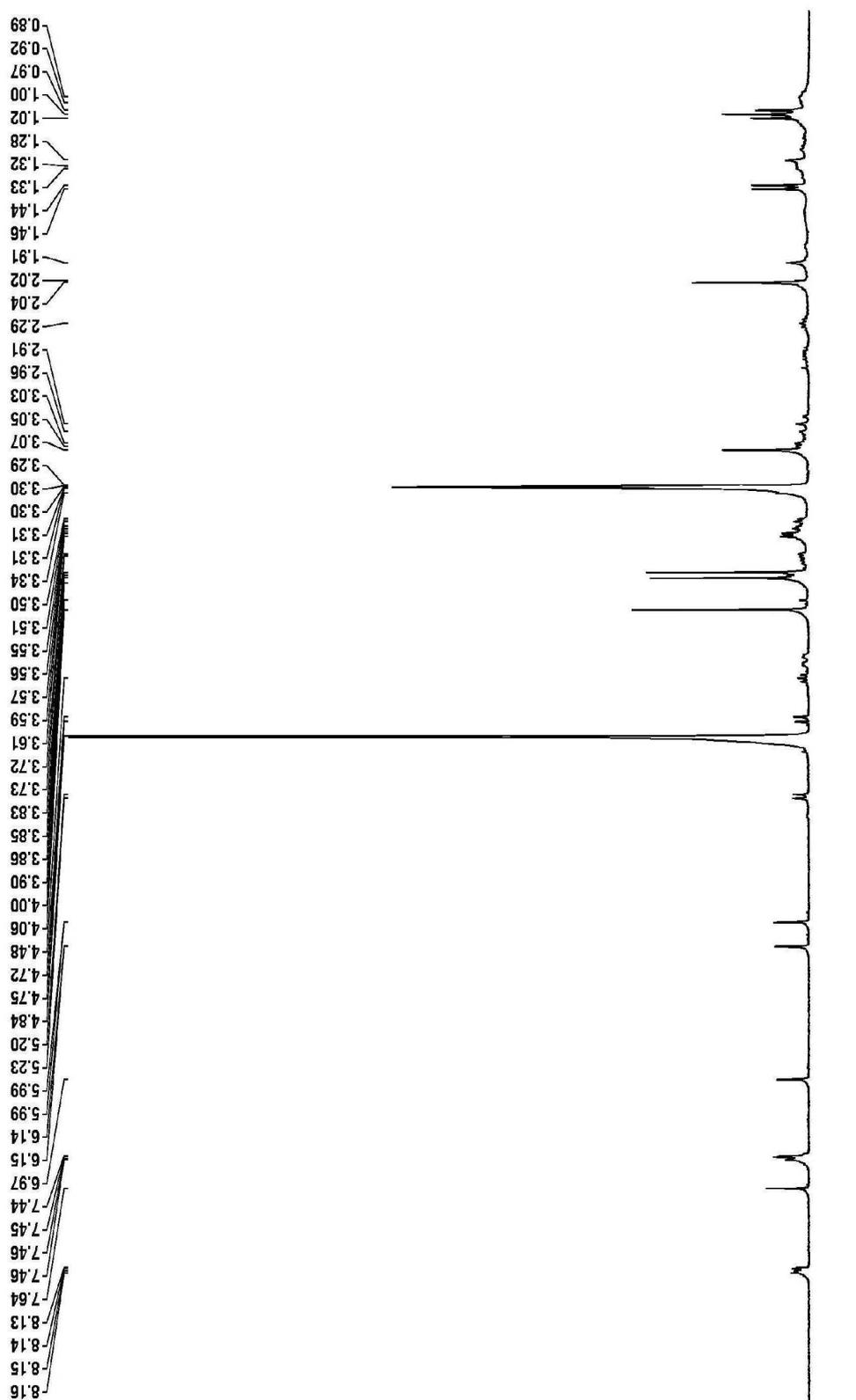
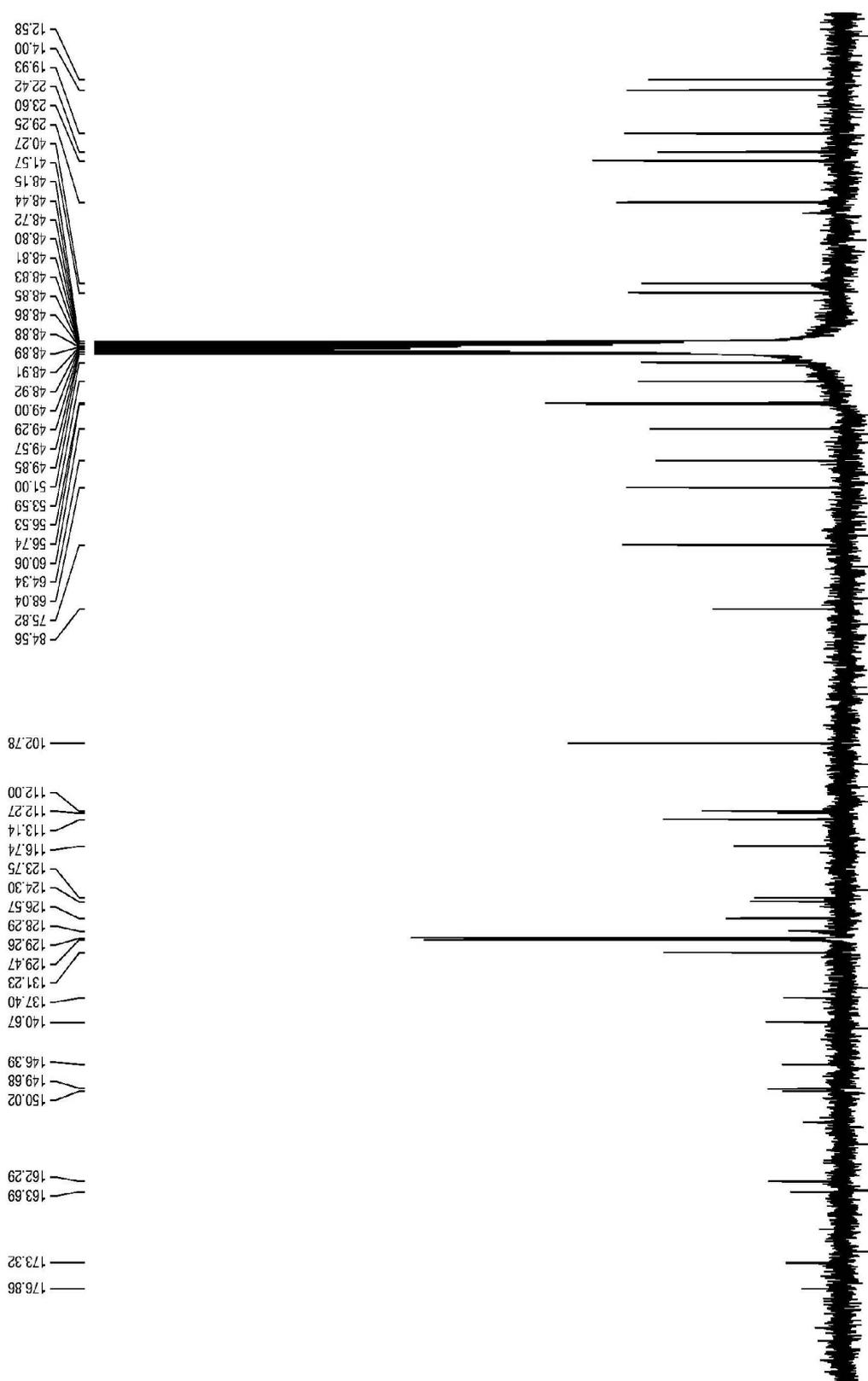
**9**

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de **9** (300/75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$) e dados de RMN ^{13}C da (*rel.*)-6a-(S)-6-(S)-ocoteína-N-óxido (CDCl_3).

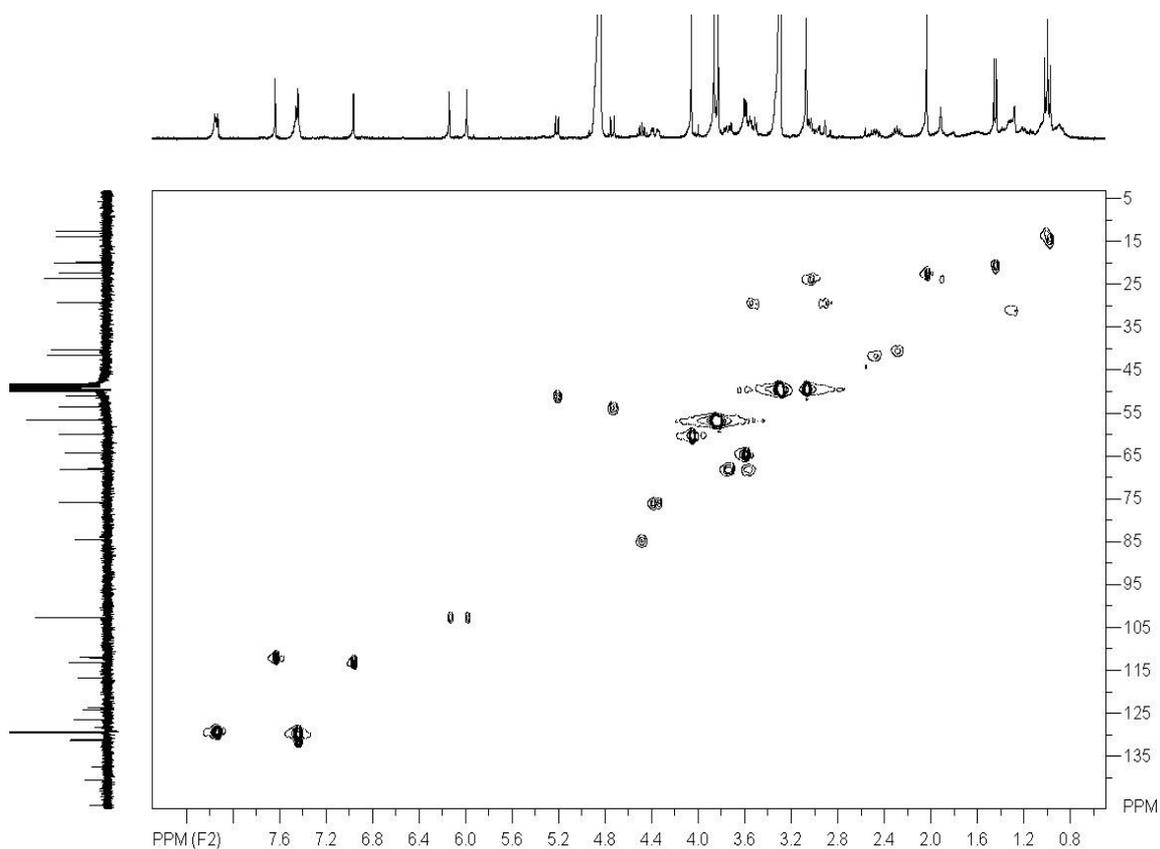
C	Garcez <i>et al.</i> (2011)	9		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC (H→C)
1	145,1	146,4	-	-
2	135,9	137,4	-	-
3	139,2	140,7	-	-
3a	114,7	116,7	-	-
4	22,7	23,6	3,04 (2H; <i>m</i>) 3,57 (1Ha; <i>m</i>)	C-3a; C-5; C-6a; $\text{CH}_3\text{-N}$
5	66,3	68,0	3,75 (1Hb; <i>ddd</i> , 12,3, 5,3 e 1,5 Hz)	C-7
6a	74,1	75,8	4,37 (1H; <i>dd</i> , 14,1 e 4,3 Hz) 2,91 (1Ha; <i>t</i> , 14,1 Hz)	C-7 C-6a; C-7a; C-11c; $\text{CH}_3\text{-N}$
7	28,3	29,3	3,53 (1Hb; <i>dd</i> , 14,1 e 4,3 Hz)	C-6a; C-11b; C-11c; $\text{CH}_3\text{-N}$
7a	122,0	123,8	-	-
8	111,7	113,1	6,97 (1H; <i>s</i>)	C-7; C-10; C-11a
9	148,3	149,7	-	-
10	148,6	150,0	-	-
11	110,1	112,0	7,64 (1H; <i>s</i>)	C-9; C-11a; C-11c
11a	122,6	124,3	-	-
11b	111,3	112,3	-	-
11c	124,3	126,6	-	-
N- CH_3	48,3	49,5	3,07 (3H; <i>s</i>)	-
O- CH_3 -3	59,6	60,1	4,06 (3H; <i>s</i>)	C-3
O- CH_3 -9	56,2	56,7	3,82 (3H; <i>s</i>)	C-9
O- CH_3 -10	56,2	56,5	3,86 (3H; <i>s</i>)	C-10
OCH ₂ O-1, 2	101,3	102,8	5,99 (1Ha; <i>d</i> , 1,0 Hz)	C-2
			6,15 (1Hb; <i>d</i> , 1,0 Hz)	C-2



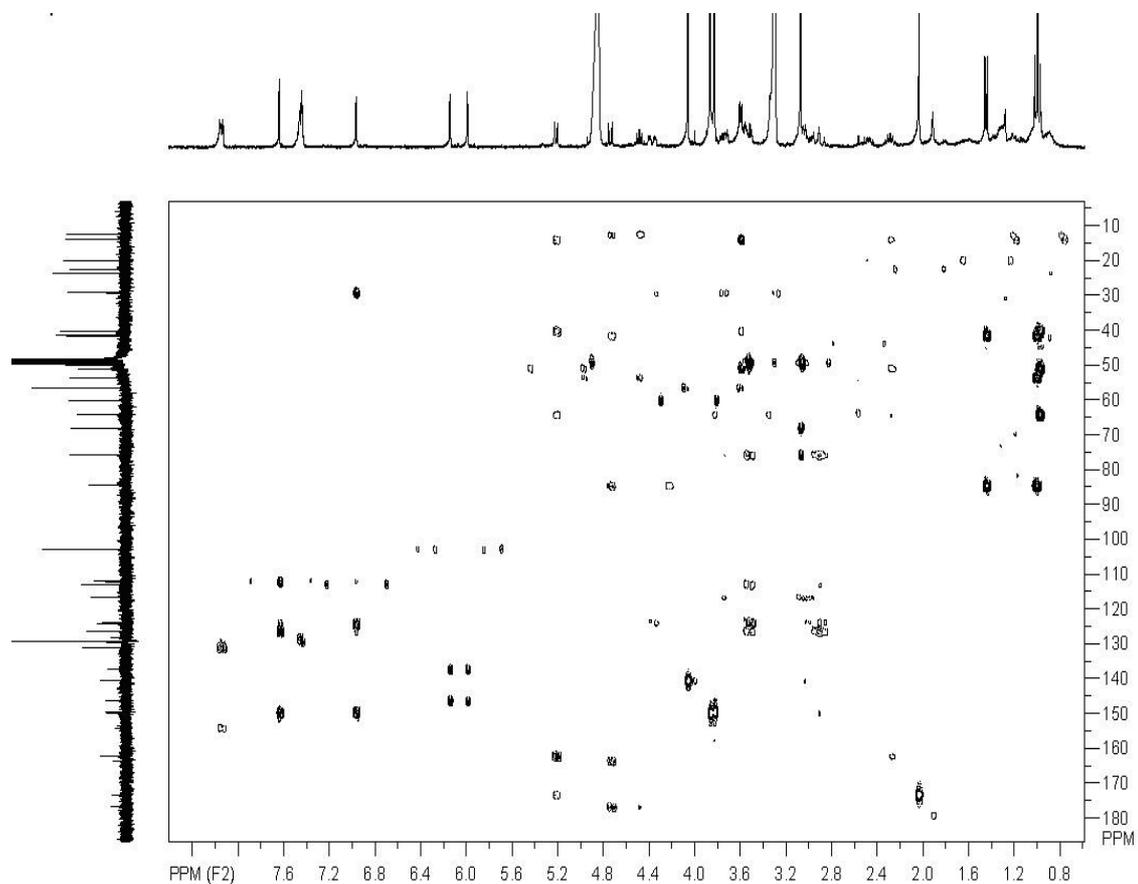
Espectro 27 - Dados de RMN ^1H de **9** (300 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 28 - Dados de RMN ^{13}C de **9** (75 MHz, CD_3OD , TMS $\delta = 0$).



Espectro 29 - Experimento de HSQC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).



Espectro 30 - Experimento de HMBC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD, TMS $\delta = 0$).

4.7 - Ensaio Biológico

A avaliação da capacidade de indução dos genes da nodulação de *Rhizobium tropici* foi realizada por meio de um ensaio colorimétrico *in vitro* que determina a atividade da enzima β -glucuronidase na estirpe CIAT 899 (pGUS32). Nesta, as atividades das substâncias testadas foram comparadas ao branco (valor relativo da atividade da enzima β -glucuronidase = 1), sendo que valores superiores a este indicam indução (ativação) e os inferiores, inibição.

A expressão do gene *nodA* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32), na presença das substâncias, **1, 3, 4, 5, 6, 8 e 9**, isoladas do exsudato de sementes de *Mimosa flocculosa*, mostrou um aumento gradual na atividade indutora com o aumento na concentração das substâncias utilizadas (**Figuras 8, 9 e 10**). Observou-se também que os valores mais elevados da atividade da enzima β -glucuronidase ocorreram com 23h de indução e decresceram após este período (**Figura 11**).

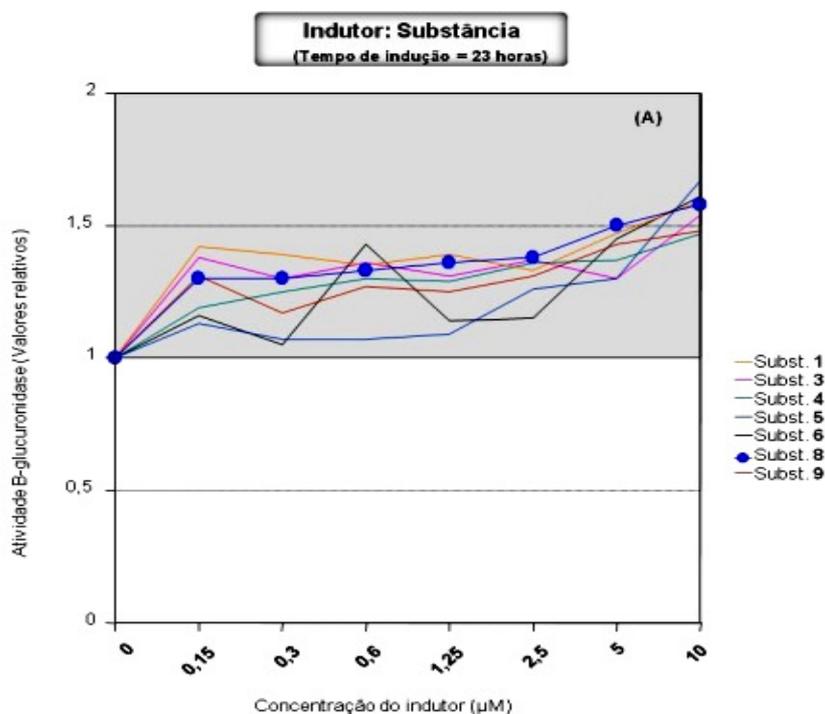


Figura 8 - Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias **1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9**, obtidas de sementes de *Mimosa flocculosa*, em 23 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).

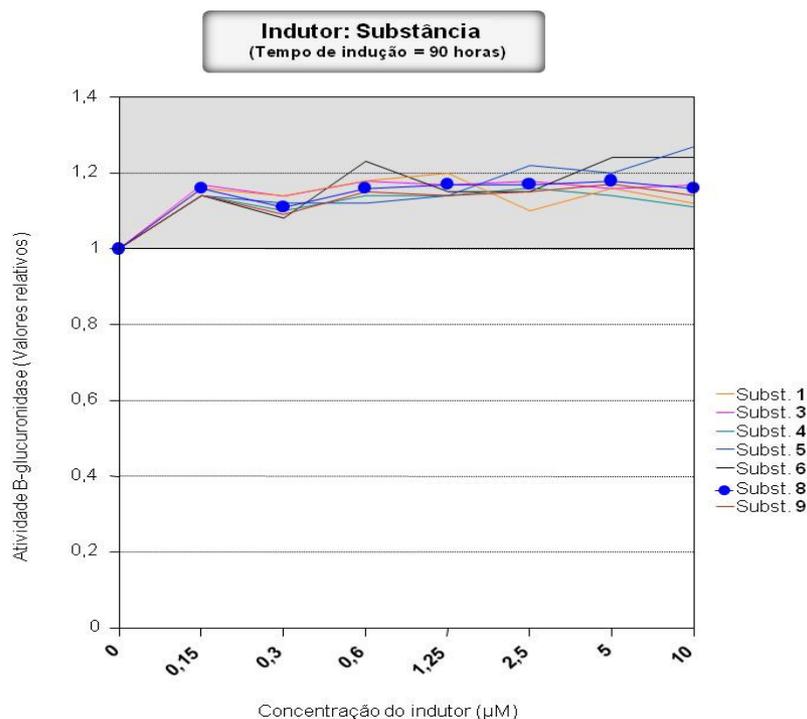


Figura 9 - Atividade da enzima β -galacturonidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9, obtidas de sementes de *Mimosa flocculosa*, em 90 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).

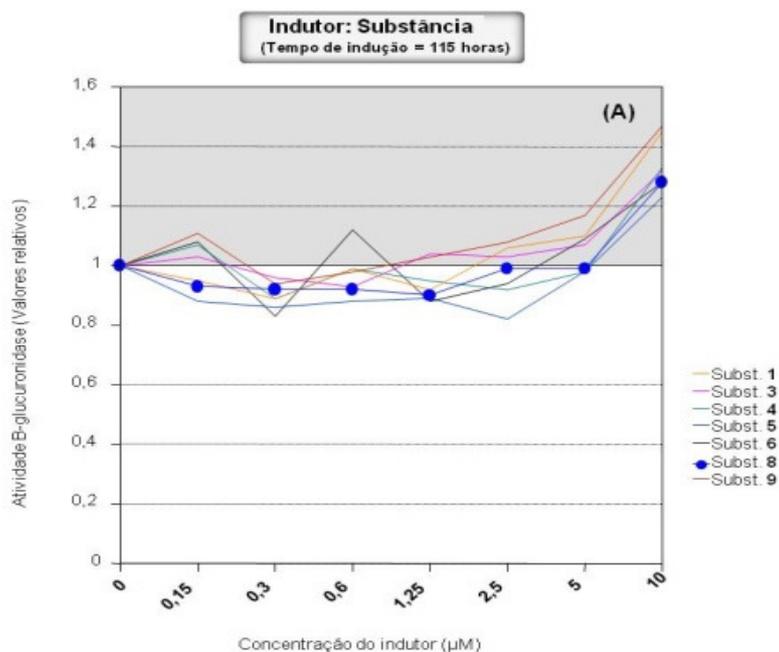


Figura 10 - Atividade da enzima β -galacturonidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9, obtidas de sementes de *Mimosa flocculosa*, em 115 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes).

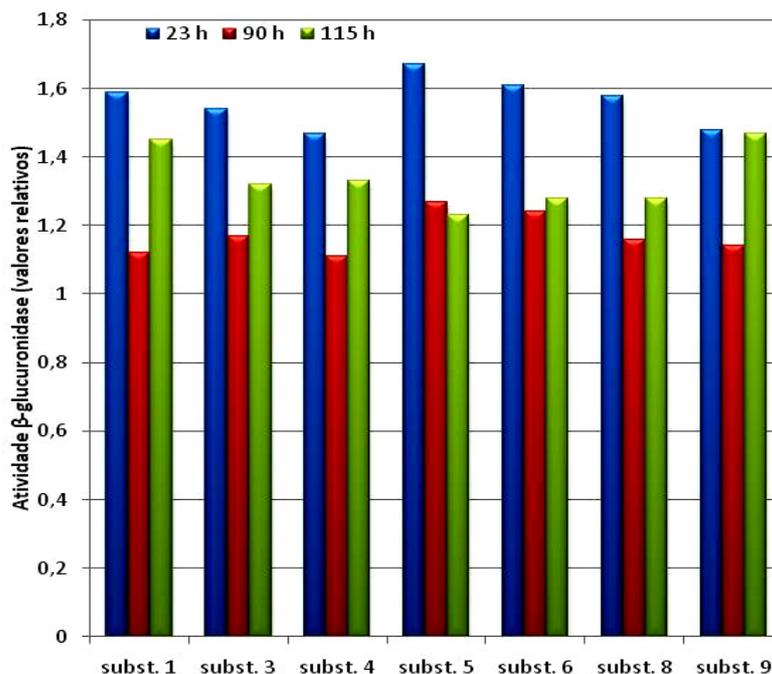


Figura 11 - Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS32) na presença das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9, obtidas de sementes de *Mimosa flocculosa*, em 23, 90 e 115 h. Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de substâncias indutoras). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.

A utilização dos exsudatos de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), de *Leucaena leucocephala* e de *Mimosa flocculosa* como indutores do gene *nodA* de CIAT 899 (pGUS32) proporcionou, com 48 horas de indução, maiores atividades da enzima β -glucuronidase com a mistura de exsudatos de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa flocculosa* (1:3), atingindo valores aproximadamente 30 vezes superiores ao controle sem indutor (branco) (Mercante & Franco, 2000). Dessa forma, é possível observar que a expressão da enzima apenas com o uso das substâncias foi significativamente inferior. Esta constatação, possivelmente, está relacionada a um efeito sinérgico decorrente da mistura dos componentes químicos presentes nos exsudatos de sementes de *M. flocculosa* e de *P. vulgaris* e, portanto, o uso do exsudato como indutor da nodulação do feijoeiro se mostrou mais eficiente que o uso das substâncias 1, 3, 4, 5, 6, 8, e 9 isoladamente.

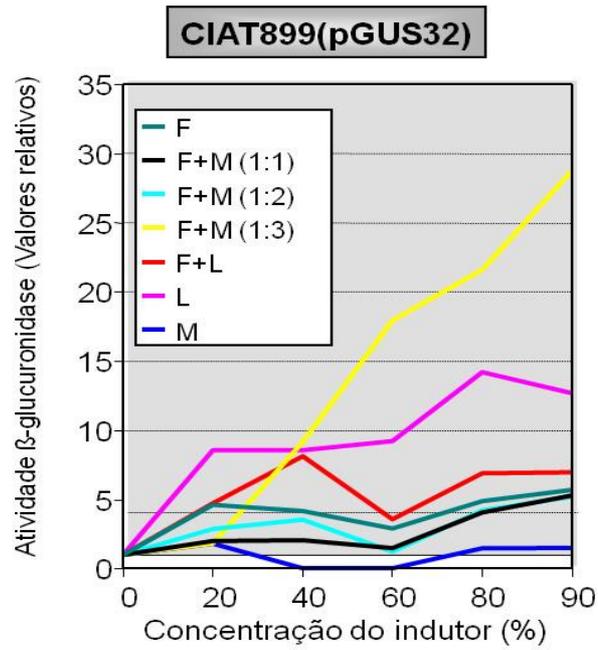


Figura 12 - Atividade da enzima β -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899(pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes *Phaseolus vulgaris* (F), *Mimosa flocculosa* (M) e *Leucena leucocephala* (L) (Mercante & Franco, 2000).

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese trata da investigação do exsudato das sementes de *Mimosa flocculosa*, a qual, em experimentos anteriores, realizados por pesquisadores da Embrapa-CPAO, demonstrou possuir capacidade de induzir a nodulação das raízes do feijoeiro. A investigação da composição química do exsudato destas sementes levou ao isolamento de nove substâncias. Duas destas possuem nas suas estruturas um núcleo formado pela base nitrogenada uracila [³N-(2,6-dimetil-4-heptil)-uridina (**1**) e o nucleosídeo uridina (**6**)]. Também foram isolados o 2,6-dimetil-4-(4-hidroxifenil)-heptano (**5**), o aminoácido valina (**3**) e os alcalóides aporfínicos (+)-6a*S*-6*R*-N-óxido ocoteína (**8**) e (+)-6a*S*-6*S*-N-óxido ocoteína (**9**). Em função da pequena quantidade de massa e/ou da complexidade estrutural, as substâncias **2**, **4** e **7** não tiveram as suas estruturas elucidadas completamente. As substâncias **1** e **8** são inéditas na literatura e a **5** foi relatada apenas como produto de síntese.

A expressão do gene *nodA* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) mostrou um aumento gradual na atividade indutora com o aumento na concentração de **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **8** e **9**, mas em pequenas quantidades. Ainda que estes resultados sejam inferiores ao potencial indutor do gene *nodA* da mistura de exsudatos de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa flocculosa* (1:3) todas as substâncias avaliadas foram consideradas indutoras.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, R. M.; David, J. M.; David, J. P. Resumo da 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ) - **Fenólicos do Extrato Clorofórmico de *Mimosa invisa***, Salvador, Brasil, 2004.

Amarger, N.; Macheret, V.; Laguerre, G. ***Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**(4), 996-1006.

Barneby, R. C. **Sensitivae censitae: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World.** *Memories of the New York Botanical Garden*, 1991, **65**, 1-835 *apud* Simon M. F. & Proença C. **Phytogeographic Patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado Biome of Brazil: an Indicator Genus of High-Altitude Centers of Endemism?** *Biol. Conserv.*, 2000, **96**, 279-96.

Burkart, A. **Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas.** Buenos Aires. ACME, 1952. 569p *apud* Marchiori, J. N. **Anatomia da Madeira e Casca do Maricá, *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze.** *Ci. Flor.*, 1993, **3**(1), 85-106.

Carvalho, P. E. R. ***Mimosa flocculosa* Burkart, espécie para revegetação e usos múltiplos.** *In: Congresso Nacional de Botânica, Cuiabá, 1989, 2*, 411 *apud* Zanon, A. **Efeito da temperatura da água na quebra de dormência de sementes de *Mimosa flocculosa* Burkart.** Embrapa Florestas. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, 1992, **24/25**, 67-70.

Ferreira, C. M.; Del Peloso, M. J.; Faria, L. C. **Feijão na economia nacional.** Embrapa Arroz e Feijão, 2002, 47 p.

Firmin, J. L.; Wilson, K. E.; Rossen, L.; Johnston, A. W. B. **Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants.** *Nature*, 1986, **324**, 90-92.

Flores, M.; González, V.; Pardo, M. A.; Leija, A.; Martínez, E.; Romero, D.; Piñero, D.; Dávila, G.; Palacios, R. **Genomic Instability in *Rhizobium phaseoli***. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**(3), 1191-1196.

Frey, S. D. & Blum, L. K. **Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum* bv.b *phaseoli***. *Plant and Soil*, 1994, **163**(2), 157-164.

Garcez, F. R.; Silva, A. F. G. da; Garcez, W. S.; Linck, G. Matos, M. F. C.; Santos, E. C. S; Queiroz, L. M. M.; **Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia***. *Planta Med.*, 2011; **77**, 383–387.

Garcez, W. S. **Constituintes químicos de *Ocotea vellosina* (MEISSN.) MEZ. Lauraceae**. [Tese] São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1991.

Hisamoto, M.; Kikuzaki, H.; Ohigashi, H.; Nakatani, N. **Antioxidant compounds from the leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb.** *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**(18), 5255-5261.

Hoeflich, V. F. **Cultivo de Bracatinga: Aspectos Econômicos e Ambientais**. Embrapa Florestas. Sistemas de Produção, 6. ISSN 1678-8281. Versão Eletrônica. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Bracatinga/CultivodaBracatinga/20_equipe.htm> Acesso em: 19 abr. 2011a.

Hoeflich, V. F. **Cultivo de Bracatinga: Produtos e Utilizações**. Embrapa Florestas. Sistemas de Produção, 6. ISSN 1678-8281. Versão Eletrônica. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Bracatinga/CultivodaBracatinga/20_equipe.htm> Acesso em: 19 abr. 2011b.

Hoehne, F. C. **A Bracaatinga ou Abaracaatinga**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, 1930. 17 p. *apud*

Carvalho, P. E. R. **Cultivo da Bracatinga: Taxonomia**. Embrapa Florestas. Sistemas de Produção, 6. ISSN 1678-8281. Versão Eletrônica. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Bracatinga/CultivodaBracatinga/20_equipe.htm> Acesso em: 19 abr. 2011.

Hungria, M. & Araújo, R. S. **Relato da VI reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium***. EMBRAPA-CNPAF. Jun./1994.

Hungria, M.; Franco, A. A.; Sprent, J. I. **New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L.** *Plant and Soil*, Dordrecht, 1993, **149**, 95-102.

Hungria, M.; Joseph, C. M.; Phillips, D. A. **Anthocyanidins and Flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. *J. Plant Physiol.*, 1991a, **97**, 751-758.

Hungria, M.; Joseph, C. M.; Phillips, D. A. ***Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. *J. Plant Physiol.*, 1991b, **97**, 759-764.

Lewis, G. P. **Legumes of Bahia**, 1987, Royal Botanic Gardens, Kew. *apud* Simon, M. F. & Proença, C. **Phytogeographic Patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado Biome of Brazil: an Indicator Genus of High-Altitude Centers of Endemism?** *Biol. Conserv.*, 2000, **96**, 279–296.

Lewis, G. P.; Schire, B. D.; Mackinder, B.A. & Lock, J. M. **Legumes of the World**, 2005, Kew: Royal Botanic Gardens, 577p *apud* Silva, R. R.; Prado, A. L.; Fortuna-Perez A. P.; Segalla; R. **Espécies herbáceas e lenhosas de Leguminosae numa área de Cerrado no Mato Grosso, Brasil** *R. Bras. Bioci.*, 2010, **8**(4), 373-376.

Martínez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F. M.; Franco, A. A.; Graham, P.; Pardo, M. A. ***Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991, **41**(3), 417-426.

Mercante, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro.** [Dissertação] Itaguaí: Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1993.

Mercante, F. M.; Cunha, C. O.; Straliootto, R.; Quadros, W.; Junior, R.; Vanderleyden, J.; Franco, A. A. ***Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from brazilian “Cerrado” region.** *Rev. Microbiol.*, 1998, **29**, 49-58.

Mercante, F. M. & Franco, A. A. **Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*.** *Rev. Bras. Cien. Sol.*, 2000, **24**, 301-310.

Mercante, F. M.; Goi, S. R.; Franco, A. A. **Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies Leguminosas e Rizóbio.** *Revista Universidade Rural - Série. Ciências da Vida*, 2002, **22**(1), 65-81.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Ken, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature*, 2000, **403**, 853–858.

Peters, N. K.; Frost, J. W.; Long, S. R. **A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes.** *Science*, 1986, **233**, 977-980.

Phillips, D. A.; Joseph, C. M.; Hirsch, P. R. **Occurrence of Flavonoids and Nucleosides in Agricultural Soils.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(11), 4573-4577.

Pouchert, C. J. & Behnke, J. **The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra**. 1ª ed. United States of America: Aldrich Chemical Company, 1993. 1532 p. V. I.

Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. **The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity**. *Ann. Bot.*, 1997, **80**, 223–230.

Redmond, J. W.; Batley, M.; Djordjevic, M. A.; Innes, R. W.; Kuempel, P. L.; Rolfe, B. G. **Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium***. *Nature*, 1986, **323**, 632-635.

Rolfe, B. G. **Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation**. *BioFactors*, 1988, **1**, 3-10.

Royal Botanic Gardens, Kew. **Leguminosae**. Disponível em: <<http://rbgkew.org.uk/scihort/directory/teams/Leguminosae/completetext.html>> Acesso em: 19 abr. 2011.

Segovia, L.; Young, J. P. W.; Martinez-Romero, E. **Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1993, **43**(2), 374-377.**

Shioji, H.; Tsunoi, S.; Kobayashi, Y.; Shigemori, T.; Ike, M.; Fujita, M.; Miyaji, Y.; Tanaka, M. **Estrogenic activity of branched 4-nonylphenol isomers examined by yeast two-hybrid assay**. *J. Health Sci.*, 2006, **52**(2), 132-141.

Silva, D. B. **Estudo fitoquímico e avaliação alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* Annonaceae**. [Dissertação] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

Silva, R. R.; Prado, A. L.; Fortuna-Perez, A. P.; Segalla; R. **Espécies herbáceas e lenhosas de Leguminosae numa área de Cerrado no Mato Grosso, Brasil**. *R. bras. Bioci.*, 2010, **8**(4), 373-376.

Simon M. F. & Proença C. **Phytogeographic Patterns of *Mimosa* (*Mimosoideae*, *Leguminosae*) in the Cerrado Biome of Brazil: an Indicator Genus of High-Altitude Centers of Endemism?** *Biol. Conserv.*, 2000, **96**, 279–296.

Spaink, H. P.; Wijfjes, A. H. M.; der van Drift, K. M. G. M.; Haverkamp, J., Thomas-Oates; J. E.; Lugtenberg, B. J. J. **Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*.** *Mol. Microbiol.*, 1994, **13**(5), 821–831.

Straliootto, R., Ferreira, M. E.; Rumjanek, N. G. **Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1999, **71**, 3-II.