INSTITUTO DE QUÍMICA

USP

916
M
23
19

**“METABOLISMO FENILPROPANOÍDICO EM
Piper solmsianum C. Dc. (PIPERACEAE)”**

Roberto Carlos Campos Martins

Tese de Doutorado

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Orientador

São Paulo, 14 de junho de 2002

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

13.132

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004821

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Martins, Roberto Carlos Campos
M386m Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C.
Dc. (Piperaceae) / Roberto Carlos Campos Martins. -- São
Paulo, 2002.
145p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Produtos naturais : Química orgânica I. T. II. Kato,
Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

"Metabolismo Fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. Dc. (Piperaceae)"

ROBERTO CARLOS CAMPOS MARTINS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Orgânica.

Aprovado por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ – USP

Profa. Dra. VANDERLAN DA SILVA BOLZANI
IQ – UNESP – Araraquara

Profa. Dra. MÁRCIA REGINA BRAGA
IBot - SP

Profa. Dra. PAULETE ROMOFF
Mackenzie

SÃO PAULO
14 DE JUNHO 2002.

“A sabedoria não nos é dada; é preciso descobri-la por nós mesmos depois de uma viagem que ninguém pode nos poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

**A meu pai, Alcindo da Silva Martins (*in memoriam*),
minha mãe Maria José e meu irmão Alcindo Júnior.**

Agradecimentos Especiais:

- A Deus, por tudo que me concede, principalmente pelas lições que me mostram que quanto mais difícil é o caminho a seguir, mais prazerosa será a vitória por ter conseguido chegar ao fim dele.
- A 6 amigos muito especiais, que me ensinaram a não desistir, torceram pelo meu sucesso e que foram minha segunda família durante todos estes anos: Andréa Luzia, Ana Paula Santos, André Gabriel, César Rendeiro, Eduardo Nascimento e Ricardo Muzolon. Que os laços que nos uniram apenas se fortaleçam com o passar dos anos.

Resumo

A espécie vegetal *Piper solmsianum* (Piperaceae) é um arbusto que ocorre tanto na Mata Atlântica do Brasil quanto na Amazônia. O estudo fitoquímico aqui apresentado descreve o acúmulo dos fenilpropanóides isoelemicina, elemicina, apiol, dilapiol, mirisiticina e lignanas tetraidrofurânicas na planta adulta. Contudo, suas plântulas cultivadas e micropropagadas, com idade inferior a 9 meses, acumulam apenas fenilpropanóides. Entre as lignanas tetraidrofurânicas, a grandisina é o principal produto natural e possui potente atividade contra formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzii*, o parasita causador da Doença de Chagas.

O aminoácido fenilalanina radioisotopicamente marcado é convertido nas lignanas tetraidrofurânicas. A atividade específica da enzima fenilalanina amônia-liase, que converte a fenilalanina em ácido cinâmico, é dez vezes maior em plantas adultas que em plântulas.

A etapa de acoplamento oxidativo que leva à formação das lignanas tetraidrofurânicas em *P. solmsianum* foi investigada através do *E*-5-metóxi-isoeugenol radioisotopicamente marcado preparado por meio de uma reação de Wittig. Observou-se um acoplamento estereosseletivo e enantioespecífico formando a (-)-di-O-4,4'-desmetilgrandisina, o precursor direto da (-)-grandisina, através do uso de preparações enzimáticas. A enzima capaz de converter o fenilpropanóide em dímero faz parte do citocromo P-450 encontrado nos microssomos celulares e é dependente de H_2O_2 e NADPH. Estes dados corroboram a hipótese de que os dímeros encontrados em *P. solmsianum* podem ser classificados como neolignanas, uma vez que são formados pelo acoplamento oxidativo de um fenilpropanóide não oxigenado na posição 9.

Abstract

Piper solmsianum (Piperaceae) is a shrubb tree which occurs in both Atlantic and Rain Forests from Brazil. The phytochemical study of this species showed the accumulation of the phenylpropanoids isoelemicin, elemicin, apiol, dillapiol and myristicin and also tetrahydrofuran lignans in the adult plant. However, its cultivated and germinated seedlings of ages under 9 months accumulate phenylpropanoids only.

The radioisotopically labelled aminnoacid phenylalanine is converted into tetrahydrofuran lignans. Specific activity of this enzyme, which converts phenylalanine into cinnamic acid, is ten-fold higher to adult plants than to seedlings.

The oxidative coupling step which leads to the formation of the tetrahydrofuran lignans in *P. Solmsianum* was investigated by reaction of the isotopically labeled substrate *E*-5-methoxy-isoeugenol, obtained by means of a Wittig reaction, with enzyme preparations. It was observed a stereoslective and enantioespecific oxidative coupling affording (-)-di-O-4,4'-demethyl grandisin, which is the direct precursor of (-)-grandisin. The enzyme which is able to convert the phenylpropanoid into dimer is part of cytochrome P-450 system, found in cell microssomes. This enzyme is NADPH and H₂O₂-dependent. These data confirm the hypothesis that these dimers found in *P. Solmsianum* are neolignans since they are formed by the coupling of two phenylpropanoids non-oxygenated in C-9.

Lista de abreviações e símbolos

[8- ² H]	Deutério na posição 8
[U- ¹⁴ C]	Carbono 14 em todos os carbonos da estrutura
°C	Graus celsius
AIA	Ácido indol acético
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar a RNA
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm ³	Centímetro cúbico
CoA	Coenzima A
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dq</i>	Duplo quarteto
δ	Deslocamento químico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpm	Desintegração por minuto
DTT	Ditiotreitol
<i>E</i>	“Entgegen” (<i>trans</i>)
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ee	Excesso enantiomérico
EM	Espectrometria de massas
Equiv	Equivalente
g	Grama
GA 3	Ácido giberélico 3
Hz	Hertz
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações

ID	Diâmetro interno
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kgf	Kilograma-força
kDa	Kilo-Dalton
K-Pb	Tampão fosfato básico
L	Litro
M	Molar
<i>m</i>	Multiplete
μci	Micro-Curie
MES	Ácido 2-N-(morfolino)-etanosulfônico
mg	Miligrama
MHz	MegaHertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m/z	Relação massa-carga
N	Normal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
<i>n</i>-BuLi	<i>n</i> -Butil-lítio
NOE-DIFF	Efeito nuclear “overhauser” diferenciado
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
nmols	Nanomols
OMe	Metoxila
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAL	Fenilalanina amônia-liase

pH	Potencial de hidrogênio
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
Ppm	Parte por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN De ¹H	Ressonância magnética de hidrogênio
RMN De ¹³C	Ressonância magnética de carbono treze
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
s	Singleto
TBAF	Fluoreto de tetrabutyl amônio
TBS	Cloreto de <i>t</i> -butil dimetil silício
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
W	Watt
V	Volume
Z	“Zuzamen” (<i>cis</i>)

Sumário

1 – Introdução	1
1.1– Os produtos naturais e a família Piperaceae.	5
1.2– A espécie <i>Piper solmsianum</i> .	8
1.3— As lignanas: biossíntese, ocorrência e importância.	14
1.4– Biossíntese de lignanas: um breve histórico.	14
1.4.1 – O gênero <i>Podophyllum</i> .	16
1.4.2 – O gênero <i>Forsythia</i> .	21
1.4.3 – Outros estudos biossintéticos.	24
2- Objetivos	30
3 – Material e Métodos.	33
3.1- Investigação fitoquímica de <i>Piper solmsianum</i>	33
3.1.1- Coleta do material botânico	33
3.1.2- Obtenção dos extratos	33
3.1.3 - Fracionamento cromatográfico dos extratos.	34
3.1.4 - Análise das substâncias isoladas.	34
3.2 – Estudo de plântulas.	35
3.2.1- Propagação <i>in vitro</i> de <i>Piper solmsianum</i> .	35
3.2.2- Obtenção das plântulas e dos extratos.	35
3.2.3 – Análise das substâncias e extratos por RMN de ¹ H.	36
3.3 - Determinação da atividade enzimática da PAL em folhas de plântulas e de planta adulta de <i>Piper solmsianum</i> .	36
3.3.1- Obtenção do material botânico.	36
3.3.2 - Extração da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) a partir do material botânico.	37
3.3.3 - Dessalinização do sobrenadante obtido na extração.	37
3.3.4- Incubação do precursor com a preparação enzimática.	37
3.3.5 - Análise da atividade enzimática por CLAE.	38
3.3.6 - Curva de calibração do ácido cinâmico.	39
3.3.7 - Dosagem de proteínas totais contidas nos extratos	

(Método de Bradford).	39
3.4– Preparação dos substratos utilizados nos ensaios de biossíntese.	41
3.4.1- Preparação do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol não marcado.	41
3.4.2 – Preparação do álcool sinapílico.	42
3.4.3- Preparação do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol marcado com ^{14}C .	42
3.4.3.1- Proteção do 3,5-dimetóxi-4-hidroxi benzaldeído.	43
3.4.3.2 - Preparação do iodeto de etil-trifenilfosfina marcado com ^{14}C .	43
3.4.3.3 - Reação de condensação do tipo Wittig.	44
3.4.3.4 - Fotoisomerização do 5-metóxi-isoeugenol.	44
3.4.3.5 - Desproteção da hidroxila fenólica do propenilfenol.	45
3.4.4- Dimerização química do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol	45
3.5 - Administração de fenilalanina [$\text{U-}^{14}\text{C}$] a <i>Piper solmsianum</i> .	46
3.6 - Otimização das condições de CLAE em fase reversa .	47
3.7 - Preparação de tampões e soluções para extração das enzimas.	48
3.8 - Dimerização enzimática do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol.	49
3.8.1- Extração das proteínas solúveis das folhas de <i>P. solmsianum</i> .	49
3.8.2 - Extração das proteínas contidas nos microssomos celulares.	49
3.8.3 - Extração das proteínas de parede.	51
3.9 - Ensaios de incubação do substrato com os extratos enzimáticos.	52
3.10 – Quantificação da conversão do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol	53
3.10.1 – Definição do padrão interno a ser utilizado na curva de calibração	53
3.10.2 – Curva de calibração da di-O-4,4'-desmetilgrandisina	54
3.11 – Otimização dos ensaios	55
3.11.1 – Determinação do pH ótimo	55

3.11.2 – Cinética de reação	56
3.11.3 – Saturação do substrato	56
4- Resultados e Discussão	58
4.1. Investigação fitoquímica de <i>Piper solmsianum</i> .	58
4.1.1 – Estudo do extrato acetato de etila das folhas.	59
4.1.2 - Estudo do extrato acetato de etila das raízes.	77
4.1.3 - Estudo do extrato acetato de etila do caule e das inflorescências.	79
4.2 - Análise das plântulas de <i>Piper solmsianum</i> .	81
4.3 – Substâncias isoladas de <i>Piper solmsianum</i>	88
4.3.1 – Fenilpropanóides	88
4.3.1 – Lignanas tetraidrofurânicas	89
4.4 - Atividade enzimática de PAL em folhas de plântulas e de planta adulta de <i>Piper solmsianum</i> .	90
4.5 - Estudos Biossintéticos em <i>P. solmsianum</i> .	95
4.6 - Preparação do E-5-metóxi-iso Eugenol [¹⁴ C ₈].	99
4.7 – Análise dos produtos de dimerização química do substrato	109
4.8 - Dimerização enzimática do E-5-metóxi-iso Eugenol.	114
4.8.1 – Otimização da conversão do E-5-metóxi-iso Eugenol em di-O-4,4'-desmetilgrandisina	132
5- Conclusões	135
6 – Referências Bibliográficas	138

Sumário de Figuras

Figura	Pág.
Figura 1: Importantes metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Piper</i> .	5
Figura 2 – Outros metabólitos isolados de espécies de <i>Piper</i> com comprovadas atividade biológicas.	7
Figura 3 – Espécie <i>Piper solmsianum</i> .	8
Figura 4 – Metabólitos secundários isolados de <i>Piper solmsianum</i> C. Dc. por Moreira	9
Figura 5– Tipos de esqueletos de lignanas formados a partir do acoplamento 8-8' entre monolignóis.	14
Figura 6 – Substratos e produtos utilizados no estudo da biossíntese de lignanas em <i>Forsythia suspensa</i> .	16
Figura 7 – Formação da podofilotoxina e da 4'-desmetilpodofilotoxina em <i>Podophyllum hexandrum</i> .	18
Figura 8 – Formação de lignanas ariltetralínicas a partir do álcool coniferílico	18
Figura 9 - Formação da podofilotoxona a partir da desoxipodofilotoxina.	19
Figura 10 – Formação da α - e β - peltatina.	20
Figura 11 – Participação do matairesinol na biossíntese de lignanas ariltetralínicas.	21
Figura 12 - Formação <i>in vitro</i> do (+)-pinoresinol a partir do álcool <i>E</i> -coniferílico.	22
Figura 13 – Rotas biossintéticas encontradas em <i>Forsythia intermedia</i> utilizando o (+)-pinoresinol como precursor.	23
Figura 14 – Formação da (-)-arctigenina a partir do matairesinol.	24
Figura 15 – Atuação da cafeato peroxidase sobre os ácidos cinâmicos substituídos.	25
Figura 16 – Metabolismo atuante na formação de lignanas furofurânicas em <i>Sesamun indicum</i> .	27
Figura 17 – Formação da (+)-eudesmina a partir do (+)-pinoresinol.	28
Figura 18 – Ácido cafeico como precursor da (+)-jamesopirona e escapaniapirona.	28
Figura 19 – Formação do (+)-siringaresinol a partir do álcool sinapílico.	30

Figura 20 – Estrutura do padrão interno utilizado.	53
Figura 21 – Estrutura da grandisina 21 e da isoelemicina 22 .	59
Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H da grandisina 16 obtido em CDCl_3	61
Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H da isoelemicina 17 obtido em CDCl_3	62
Figura 24 – Estrutura da lignana 23 .	63
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H da lignana 23 obtido em CDCl_3	65
Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C da lignana 23 obtido em CDCl_3	66
Figura 27 – Espectro de NOE-DIFF mostrando os efeitos da irradiação da metila C-9.	70
Figura 28 – Espectro de NOE-DIFF mostrando os efeitos da irradiação de H-2.	71
Figura 29- Interação espacial entre os hidrogênios observado no experimento de NOE para 23 .	69
Figura 30 – Espectro de HMBC $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ de 23	73
Figura 31 – Principais fragmentos obtidos do espectro de massas 23 .	74
Figura 32 – Espectro na região do Infra-vermelho da lignana 23 .	75
Figura 33 – Espectro de massas da lignana 23 .	76
Figura 34 – Estrutura da elemicina 24	77
Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H da isoelemicina e da elemicina em mistura obtido em CDCl_3 .	78
Figura 36 – Estrutura da miristicina 25	79
Figura 37 – Cromatograma líquido em fase reversa da miristicina 25	80
Figura 38 – Estrutura do apiol 26 e do dilapiol 27	81
Figura 39– Espectro de RMN de ^1H do extrato plântulas propagadas de <i>P. solmsianum</i> obtido em CDCl_3	82
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H de plântulas cultivadas de <i>P. solmsianum</i> obtido em CDCl_3	83
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H do apiol 26 obtido em CDCl_3	84
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H da mistura apiol + dilapiol obtido em CDCl_3 .	85
Figura 43 – Estrutura da metil-umbeliferona.	91
Figura 44 – Cromatograma líquido em fase reversa do produto de incubação da fenilalanina como o extrato contendo a PAL.	92
Figura 45 - Curva padrão do ácido cinâmico.	93
Figura 46 Curva de calibração da albumina sérica bovina.	94
Figura 47 – Cromatograma líquido em fase quiral da grandisina extraída de <i>P.</i>	

<i>solmsianum</i>	96
Figura 48 – Estrutura do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol 29 .	96
Figura 49 – Reação de isomerização da dupla ligação de 30 por meio de uma base forte.	99
Figura 50 – Cromatograma gasoso do produto obtido da reação entre o 4- <i>alil</i> -2,6-dimetóxfenol e NaOH 12 N.	100
Figura 51 – Reação de proteção da hidroxila fenólica de 31 pelo grupo TBS.	101
Figura 52 – Obtenção do iodeto de etil-trifenilfosfina a partir da trifenilfosfina e do iodeto de etila [$^{14}\text{C}_2$].	102
Figura 53 – Reação de condensação de Wittig entre o iodeto de etil-trifenilfosfina [$^{14}\text{C}_2$] e o siringaldeído protegido.	103
Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H de 36 obtido em CDCl_3 utilizando TMS como padrão interno.	104
Figura 55 – Reação de fotoisomerização de 36	105
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H de 37 obtido em CDCl_3	106
Figura 57 - Desproteção da hidroxila fenólica do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] por fluoreto de tetrabutilamônia.	107
Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H de 29 obtido em CDCl_3	108
Figura 59 – Produtos da dimerização química do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol.	110
Figura 60 – Espectro de RMN de ^1H da di- <i>O</i> -4,4'-desmetilgrandisina obtido em CDCl_3	111
Figura 61 – Cromatograma líquido em fase reversa da di- <i>O</i> -4,4'-desmetilgrandisina sintética.	113
Figura 62 – Cromatograma líquido em fase quiral da di- <i>O</i> -4,4'-desmetilgrandisina sintética	113
Figura 63 – Estrutura do siringaresinol 41	114
Figura 64 – Espectro de RMN de ^1H de 41 obtido em CDCl_3	115
Figura 65 – Formação do conocarpano a partir do <i>E</i> -isoanol	118
Figura 66 – Outras possíveis rotas de formação a partir do álcool coniferílico para a (-)-grandisina	119
Figura 67 – Proposta de formação da (-)-grandisina a partir do álcool sinápílico	120
Figura 68 – Análise do experimento de incorporação de fenilalanina [$\text{U-}^{14}\text{C}$] em <i>P. solmsianum</i>	122
Figura 69 – Radiocromatograma em fase reversa do extrato de folhas de <i>P.</i>	123

solmsianum obtido 24 horas após a administração de fenilalanina [U-¹⁴C].

Figura 70 - Radiocromatograma em fase reversa do extrato de folhas de *P.* 124

solmsianum obtido 48 horas após a administração de fenilalanina [U-¹⁴C].

Figura 71- Cromatograma líquido em fase reversa do substrato *E*-5-metóxi- 127
isoeugenol

Figura 72 – Radiocromatograma do produto de incubação do *E*-5-metóxi-isoeugenol 127
[¹⁴C₈] com proteínas solúveis extraídas de *P. solmsianum*

Figura 73 – Radiocromatograma em fase reversa do produto de incubação do *E*-5-
metóxi-isoeugenol [¹⁴C₈] com preparações microssomais extraídas de *P.*
solmsianum 128

Figura 74 – Radiocromatograma em fase quiral do produto de incubação do *E*-5-
metóxi-isoeugenol [¹⁴C₈] em 15 minutos com preparações microssomais extraídas
de *P. solmsianum* 129

Figura 75 – Radiocromatograma do produto de incubação do *E*-5-metóxi-isoeugenol
[¹⁴C₈] com proteínas ligadas a paredes celulares extraídas de *P. solmsianum* 131

Figura 76 - Gráfico da cinética de reação entre a grandisina sintase e o substrato 132

Figura 77 – Determinação do pH ótimo para a dimerização 133

Figura 78 – Curva de saturação do substrato 133

Sumário de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1- Peso seco e rendimento dos extratos de média polaridade de <i>P. solmsianum</i> .	34
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H da grandisina 21	
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 23 .	67
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e HMBC 3J para 23 .	72
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (δ , multiplicidade, J) para os fenilpropanóides encontrados em <i>P. solmsianum</i>	87
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H de 29 .	107
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H da di-O-4,4'-desmetilgrandisina	112
Tabela 8 – Deslocamentos químicos de ^1H de 39	116

Sumário de esquemas

Esquema	Página
Esquema 1 – A inter-relação entre a química de produtos naturais e os outros ramos da ciência.	3
Esquema 2 – Biossíntese dos álcoois cinâmicos substituídos.	11
Esquema 3 – Redução dos álcoois cinâmicos substituídos levando à formação de alil- e propenilfenóis.	12
Esquema 4 – Ressonância dos monolignóis iniciada por peroxidases e lacases	13
Esquema 5 – Biossíntese do ácido plicático a partir da tujaplicatina	15
Esquema 6 – Biossíntese dos metabólitos secundários de <i>P. solmsianum</i>	98

Introdução

1 – Introdução

A química de produtos naturais, que surgiu como uma ramificação da química orgânica, vem colecionando ao longo das últimas décadas resultados significativos que contribuem para o seu êxito e afirmação como uma ciência multidisciplinar. Essa ciência, que nasceu do conhecimento de que plantas seriam responsáveis pelo acúmulo de substâncias com potenciais atividades farmacológicas, hoje em dia tem inter-relação com diversos outros ramos da ciência, que ajudam a interpretar ou se beneficiam dos dados obtidos.

A denominação de química de produtos naturais originou-se do fato de que existiam substâncias orgânicas oriundas de plantas, algas, fungos, bactérias, e outros microorganismos com as mais diversas estruturas químicas. O isolamento, purificação e identificação destas substâncias foi tido por muitos anos como o principal objetivo desta ciência, que nos primórdios de sua existência foi chamada de fitoquímica (química de plantas). Uma característica destas substâncias era o fato de os cientistas não encontrarem nenhuma função vital na planta que pudesse ser associada a elas. Assim, estas substâncias foram denominadas de metabólitos secundários por estarem supostamente sendo produzidas por um metabolismo diferente daquele utilizado na produção de compostos essenciais à sobrevivência da planta (sustentação, transporte de água, alimentação, fonte de energia), ou seja, os ditos metabólitos primários (Mann, 1994; Gottlieb, 1972).

Os avanços tecnológicos aliados à curiosidade natural do homem levaram à elucidação estrutural de um número cada vez maior de produtos naturais. A ampla gama de informações obtidas começou a ser empregada e os produtos naturais puderam ser utilizados como marcadores em estudos evolutivos e sistemáticos no reino vegetal (Joly, 1985).

Outra aplicação dos metabólitos secundários seria a sua ação biológica diversificada. Na verdade, os estudos iniciais destes produtos originários de plantas foram imaginados como uma busca pelos princípios responsáveis pela atividade de chás e infusões utilizadas na medicina popular como soluções capazes de influenciar de alguma maneira o sistema biológico humano, agindo como anestésicos, remédios

contra enfermidades ou mesmo veneno. Na última década, principalmente, a busca por compostos biologicamente ativos atingiu seu auge e direcionou grande parte dos estudos de produtos naturais para este objetivo (Braz-Filho, 1994). Assim, muitos compostos isolados de plantas vêm sendo testados com sucesso em aplicações como anti-tumorais, anti-fúngicos, anti-histamínicos, anti-neoplásicos e uma série de outras. Diante destes resultados plenamente satisfatórios, a química de produtos naturais também começou a se voltar para um outro ramo de estudos que diz respeito a relação entre a atividade biológica e a estrutura dos compostos (SAR), com o objetivo de tentar entender que partes da molécula seriam as responsáveis pela atividade farmacológica dos mesmos assim como aplicar este conhecimento no desenho de novas drogas (Montanari, 2001, Hammond, 1999).

A evolução tecnológica continuou levando o homem a explorar cada vez mais a química de produtos naturais. Uma nova aplicação encontrada foi a utilização do metabólitos secundários em estudos ecológicos, como por exemplo, as interações inseto-plantas (Singer, 2000 e Parmesan, 2000).

Recentemente, químicos de produtos naturais do mundo inteiro começaram a demonstrar interesse no estudo da biossíntese dos produtos naturais, visando a compreensão de que meios e recursos seriam utilizados pelo sistema vegetal para chegar aos produtos finais do metabolismo secundário. Duas ferramentas foram essenciais para o desenvolvimento estes estudos: a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o uso de radio-isótopos que permitiam acompanhar os eventos que ocorriam durante o metabolismo (Jackson, 1984^a, 1984^b).

Os estudos de biossíntese são baseados em hipóteses onde um determinado caminho metabólico é seguido por um ou mais precursores comuns, sofrendo ação de enzimas altamente seletivas durante o processo para dar origem às mais diversas formas estruturais de metabólitos, como flavonóides, alcalóides, lignanas, compostos de origem terpênica entre uma infinidade de outros. Nesses estudos, bioquímica e biologia molecular agem como novas ciências complementares que interagem com a química de produtos naturais e tentam explicar os fenômenos envolvidos no metabolismo.

Os cientistas têm utilizado a ciência bioquímica para tentar compreender o papel das enzimas atuantes no metabolismo secundário com o intuito de desenvolver

metodologias que possibilitem principalmente o isolamento e a caracterização destas. Com isso, podem-se realizar estudos *in vitro* visando estabelecer em bases firmes o papel catalítico das mesmas.

Esquema 1 : A inter-relação entre a química de produtos naturais e os outros ramos da ciência.

Os avanços no ramo da biotecnologia nos últimos anos trouxe um novo aliado às pesquisas dirigidas à elucidação da biossíntese de produtos naturais: a biologia molecular. Originalmente utilizada para explicar os fenômenos biológicos do metabolismo primário, tomando com base as moléculas envolvidas nos processos genéticos, a biologia molecular começou a ser utilizada também para estudos do metabolismo secundário com grande sucesso (Dinkova-Kostova, 1996). A biologia molecular estuda a parte genética do metabolismo, a expressão das enzimas responsáveis pelos processos e também o papel do DNA e do RNA no caminho metabólico como os grandes responsáveis pela informação genética que leva a planta a

biossintetizar os produtos naturais. Com o surgimento da biologia molecular tornou-se possível localizar e clonar genes responsáveis pela expressão de enzimas que realizarão as conversões nas etapas determinantes do metabolismo, manipular o RNA mensageiro de modo a estabelecer bibliotecas genômicas onde estarão contidas todas as informações relativas ao genoma da planta entre outras aplicações que estão sendo descobertas a uma velocidade crescente (Lewis, 1999).

É importante ressaltar que a compreensão da planta como um complexo sistema químico e biológico intrinsecamente correlacionado é o primeiro passo para a compreensão geral do mecanismo que leva a formação dos metabólitos secundários de importância cada dia maior para o homem e que já ultrapassa as barreiras do mundo científico e extravasa para o nosso cotidiano.

1.1 – Os produtos naturais e a família Piperaceae.

A família botânica Piperaceae é tida como uma das mais primitivas dentre as Angiospermae, segundo Taylor e Hickey (1992) que a consideram como um “fóssil vegetal”. Ocorrências de Piperaceae, que se divide em mais de 10 gêneros (Joly, 1985), são registradas em regiões subtropicais e tropicais incluindo a região Amazônica.

Dentre os gêneros compreendidos pela família Piperaceae, o gênero *Piper* é um dos mais importantes, tanto do ponto de vista científico quanto econômico. A espécie *Piper nigrum* cujas sementes são utilizadas popularmente como a “pimenta-do-reino”, é uma das mais conhecidas e estudadas quimicamente. A pimenta-do-reino possui alto valor comercial principalmente como condimento devido ao seu sabor picante, que é atribuído a amidas aromáticas, em especial a piperina **1** (figura 1). Outra espécie de *Piper* de interesse comercial e científico é a espécie *Piper methysticum* de cujos rizomas é preparado o chá de kava-kava, um potente ansiolítico difundido principalmente na região da Oceania. Tem-se que os responsáveis por esta atividade são kava-pironas, como a metisticina **2** e a kavaína **3** (figura 1), que Singh (1992) descreveu como substâncias com efeitos anestésicos e hipnóticos.

Figura 1: Importantes metabólitos secundários isolados de espécies de *Piper*.

Em relação ao metabolismo secundário, a família Piperaceae apresenta-se como uma das mais versáteis famílias botânicas. Os metabólitos acumulados pelas espécies de Piperaceae caracterizam-se por serem oriundos de biossíntese mista (chiquimato/acetato), resultando na produção de amidas ou de compostos aromáticos essencialmente fenilpropanoídicos do tipo lignanas e neolignanas (Alécio *et al*, 1997; Gottlieb *et al*, 1995, Parmar *et al*, 1997, Moreira *et al*, 1998). Também caracteriza-se pela ocorrência de terpenos, flavonóides e outras classes de produtos naturais.

Outra característica importante da família Piperaceae é a presença de metabólitos secundários com outras atividades biológicas, a exemplo da piperina e das kava-pironas. Além destas, a aduncamida **4** (figura 2) isolada de *Piper aduncum* (Orjala *et al*, 1993) possui atividade antibacterial contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* além de demonstrar atividade citotóxica contra células carcinogênicas naso-faríngeas. A kadsurenona **5** (figura 2), uma lignana isolada de *P. futokadsura* mostrou excelente atividade anti-PAF (Shen *et al*, 1985 e Chan *et al*, 1985) e alilfenóis **6-10** (figura 2) isolados de *Piper betle* possuem atividade fungicida e nematicida (Evans *et al*, 1984). Ainda na espécie *Piper betle*, foram isolados sitosterol **11**, ácido ursólico **12** e ácido ursólico 3- β -acetato **13** (figura 2), que inibem o fator de agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (Saeed *et al*, 1993).

A mais completa revisão a respeito do gênero *Piper* incluindo os metabólitos secundários isolados de 1907 a 1996 e suas atividades biológicas foi feita por Parmar e colaboradores, em 1997. Outras revisões bibliográfica abrangendo os períodos de 1997 a 1999 e de 1999 a 2001 foram realizados por Sartorelli (2000) e Constantin (2001) em suas teses de doutoramento.

Figura 2 – Outros metabólitos isolados de espécies de *Piper* com comprovadas atividade biológicas.

1.2 - A espécie *Piper solmsianum*.

A espécie *Piper solmsianum* pertence ao gênero *Piper* da família Piperaceae e trata-se de um arbusto entre 1 a 3 m de altura (figura 3). Ocorre em matas de luz difusa, em planícies alagadiça, semi-paludosas ou brejos, podendo também ocorrer em capoeiras ou matas de encostas e restingas. Possui a sinonímia *Piper leucathum* C. Dc. e *P. santosanum* C. Dc. (Candolle, 1986). Esta espécie foi identificada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e uma excicata (329676) está depositada neste herbário.

Existe na literatura o relato de um estudo fitoquímico dos extratos de caule e folhas desta espécie que resultou no isolamento e identificação de uma lignana benzofurânica eupomatenóide-6 **14** e do flavonóide 5-hidróxi-4-metóxi-7-O-rutinoflavona **15** (figura 4) (Moreira, 1995).

Figura 3 – Espécie *Piper solmsianum*.

Figura 4 – Metabólitos secundários isolados de *Piper solmsianum* C. Dc por Moreira.

1.3 – As lignanas: biossíntese, ocorrência e importância.

Como foi verificado, as espécies do gênero *Piper* produzem lignanas em considerável quantidade sendo que muitas delas apresentam importantes propriedades farmacológicas.

Biossinteticamente as lignanas são produtos derivados por uma ramificação da rota do ácido chiquímico, conhecida como via fenilpropanoídica. Nesta via, o aminoácido *L*-fenilalanina normalmente sofre desaminação por meio da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) levando à produção de ácidos cinâmicos, e, por redução destes, a álcoois cinâmicos substituídos (esquema 2). Etapas posteriores de redução resultam finalmente em alil- e propenilfenóis, os quais, através de acoplamentos oxidativos iniciados por peroxidases ou lacases, produzem um grande número de lignóides (esquema 3) (Katayama, 1992; Sarkanen, 1973; Jackson, 1984).

Ao lado dos compostos derivados da via do acetato e dos flavonóides, as lignanas são o grupo de metabólitos secundários que tem sua biossíntese bastante estudada. Sua rota de formação está estritamente relacionada com a dos alil- e propenilfenóis, bem como das ligninas.

As ligninas são polímeros naturais cujas unidades básicas são os mesmos monolignóis responsáveis pela biossíntese das lignanas e propenil- e alilfenóis. São consideradas metabólitos primários, pois são responsáveis pela sustentação e

transporte de água nas plantas. A via fenilpropanoídica pode ser considerada como um elo de ligação entre os metabolismos primário e secundário (Sarkanen, 1972).

O acoplamento oxidativo que leva à formação das lignanas e ligninas na natureza ocorre de modo diferente. No caso das lignanas, existe a ação de enzimas com alto controle régio- e estereosseletivo levando a produtos opticamente ativos, enquanto que o acoplamento oxidativo que ocorre na biossíntese das ligninas dá origem a produtos racêmicos. O termo "lignana" então foi criado para definir as substâncias produzidas pela união regioespecífica de duas unidades monoméricas C₆-C₃.

Por se tratarem de fenóis, os monolignóis que constituem as unidades formadoras de lignanas e ligninas sofrem ação das peroxidases e lacases formando os chamados intermediários quinona-metídeo, que, posteriormente, entram em ressonância. As posições onde o radical se estabelece nas formas canônicas são preferencialmente 1, 3, 5 e 8 (esquema 4). Esses radicais sofrerão acoplamentos oxidativos intramoleculares e vão dar origem às mais variadas formas de esqueletos básicos. A posição dos radicais no momento da ligação designa o tipo de acoplamento sofrido, a saber: 8-8', 8,-1', 8-5', 8-O-4', 5-5', 3-O-4', 7-1', 8-7', 1-5' e 2-O-3'.

Esquema 2 – Biossíntese dos álcoois cinâmicos substituídos.

Esquema 3 – Redução dos álcoois cinamílicos substituídos levando à formação de alil- e propenilfenóis.

Dentre estes diversos tipos de acoplamento, as lignanas formadas por acoplamento 8-8' são as mais encontradas na natureza, segundo dados taxonômicos (Lewis, 1994) e são sub-divididas de acordo com o tipo de esqueleto formado em furofuranos substituídos, tetraidrofuranos, dibenzilbutanos, dibenzilbutirolactonas, ariltetraidronaftalenos, arilnaftalenos, dibenzociclooctadieno, etc (figura 5).

Esquema 4 – Ressonância dos monolignóis iniciada por peroxidases e lacases.

As lignanas ocorrem em um grande número de plantas vasculares, desde arbustos primitivos até gimnospermas e angiospermas lenhosos e herbáceos. Podem se encontradas em todas as partes da planta incluindo rizomas, raízes, caules, cascas, folhas, flores, inflorescências, frutos e sementes (Lewis, 1994, Ayres, 1990, Lewis *et al*, 1995 e Gang *et al*, 1998). As quantidades e tipos de lignanas, no entanto, podem variar entre tecidos da mesma planta e entre espécies do mesmo gênero ou família.

As lignanas podem ser consideradas como uma classe de produtos naturais estruturalmente diversificada englobando milhares de estruturas diméricas diferentes. De modo interessante, encontram-se tipicamente na forma opticamente ativa, muito embora o antípoda possa variar de acordo com espécie em estudo. Um exemplo clássico é a presença de (+)-pinoresinol (figura 5) na espécie *Forsythia europaea* (Kitagawa *et al*, 1988) enquanto o seu antípoda (-) ocorre em *Daphne tangutica* (Zhuang *et al*, 1982).

Figura 5– Tipos de esqueletos de lignanas formados a partir do acoplamento 8-8' entre monolignóis.

1.4 – Biossíntese de lignanas: um breve histórico.

Os primeiros relatos envolvendo a biossíntese de lignanas surgiram dos estudos de Neish (1965) que propusera, baseado na inexistência de intermediários reativos, que não haveria nenhuma enzima regioespecífica envolvida no acoplamento 8-8' de duas unidades C₆-C₃, concluindo que o acoplamento não seria proveniente de uma oxidação por meio de um intermediário quinona, como acontecia para as ligninas.

Estudos de localização de sítios de hidroxilação na espécie *Thuja plicata* (cedro vermelho), de onde foi isolado o ácido plicático e seus derivados (Swan, 1969), permitiram concluir que esta lignana é produzida a partir da seqüência: tujaplicatina - diidróxi-tujaplicatina - plicatina - ácido plicático. As tujaplicinas encontradas na planta, foram consideradas como as responsáveis pela produção da tujaplicatina, inibindo a formação de seu éter metílico da tujaplicatina (esquema 5).

Esquema 5 – Biossíntese do ácido plicático a partir da tujaplicatina

Em 1977, foi relatado o primeiro estudo experimental acerca da biogênese das lignanas. Stöckigt e Klischies (Stöckigt, 1977) sintetizaram derivados arilpropânicos como o ácido glicoferúlico **16** e o aldeído glicoferúlico **17** isotopicamente marcados com ^3H e ^{14}C e observaram incorporação destes substratos nas lignanas arctiina **18** e filirina **19**, encontradas nas folhas da espécie *Forsythia suspensa* (figura 6). Os resultados levaram à conclusão de que os compostos hidroxilados são precursores diretos destas lignanas e são incorporados em uma etapa de dimerização onde não há degradação do esqueleto $\text{C}_6\text{-C}_3$.

* = marcação isotópica

Figura 6 – Substratos e produtos utilizados no estudo da biossíntese de lignanas em *Forsythia suspensa*.

1.4.1 – O gênero *Podophyllum*.

Estudos preliminares de biossíntese de lignóides foram realizados em plantas do gênero *Podophyllum*, onde se verificava o acúmulo maciço de lignanas ariltetraidronaftalênicas (podofilotoxina) e dibenzilbutirolactônicas com importantes atividades anti-tumorais. Os relatos de resultados, obtidos através de incorporação de compostos marcados isotopicamente (^3H e ^{14}C), foram de extrema utilidade não apenas para a compreensão do metabolismo fenilpropanoídico no gênero, mas também como valiosa fonte de consulta para estudos posteriores.

A marcação isotópica consiste na utilização de um isótopo agindo como fonte de radioatividade em um determinado composto, tido como substrato na formação de um produto, em uma via biossintética. A existência de radioatividade no produto obtido confirma o papel do substrato na reação de formação deste produto, e ele é denominado de precursor.

Experimentos iniciais de administração de fenilalanina, ácido ferúlico e ácido cinâmico marcados isotopicamente a *Podophyllum hexandrum* demonstraram incorporação de radioatividade na podofilotoxina e 4'-desmetil-podofilotoxina (figura 7). Tal fato não se repetiu quando da administração de ácido sinapílico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, pois as lignanas em estudo mostraram baixa percentagem de incorporação de radioatividade. Isto indica que as metoxilações ocorridas em C-5 ocorrem depois da formação do esqueleto ariltetraidronaftalênico (Jackson, 1984^a).

Figura 7 – Formação da podofilotoxina e da 4'-desmetilpodofilotoxina em *Podophyllum hexandrum*.

Estes resultados, aliados a estudos de reações de degradação, levaram ao consenso de que as lignanas ariltetraidronaftalênicas não apenas utilizam fenilalanina e ácido cinâmico como precursores como também são formadas pelo acoplamento oxidativo de duas unidades fenilpropênicas contendo o padrão de substituição guaiacílico (4-hidróxi-3-metóxi), mais precisamente o álcool coniferílico (figura 8). Esta conclusão foi a primeira constatação à hipótese de Neish acerca da biossíntese de dímeros C₆-C₃.

Figura 8 – Formação de lignanas ariltetralínicas a partir do álcool coniferílico.

Novos experimentos de incorporação de possíveis precursores radioativos estabeleceu correlações entre as lignanas de *Podophyllum*. Assim, foi demonstrada a conversão de desoxipodofilotoxina em podofilotoxina, que por sua vez é oxidada a podofilotoxona (figura 9). O mesmo ocorre para os derivados 4'-desmetilados (Jackson, 1984b).

Figura 9 - Formação da podofilotoxona a partir da desoxipodofilotoxina.

Outra proposta surgida a partir deste estudo foi de que as lignanas que possuem o padrão de substituição 3,5-dimetóxi-4-hidróxi no anel pendente seriam provenientes de um precursor comum, assim como as que tivessem um padrão de substituição guaiacílico. Isto permitiu classificar os dois tipos de lignanas estruturalmente relacionadas (siringila substituídas e guaiacila substituídas) em dois grupos biogeneticamente distintos.

Outras lignanas encontradas no gênero *Podophyllum*, desta vez em *Podophyllum peltatum*, foram a α - e β -peltatina. Experimentos utilizando desoxipodofilotoxina e 4'-desmetil-podofilotoxina marcadas isotopicamente mostraram que tais substâncias utilizam estes substratos como precursores nas suas biossínteses. A reação observada envolve hidroxilação aromática em C-5 (Kamil, 1986^a) (figura 10).

Figura 10 – Formação da α - e β - peltatina.

Estudos posteriores em *Podophyllum hexandrum* demonstraram que a lignana dibenzilbutirolactônica yateína também age como precursor da podofilotoxina. Outras lignanas dibenzilbutirolactônicas como o podorrizol, epipodorrizol e anidropodorrizol não mostraram incorporação na podofilotoxina. Com base nos resultados dos experimentos, é sugerida uma seqüência biossintética, a partir da yateína, levando a podofilotoxina por meio de um intermediário quinona. Este intermediário é também o precursor do podorrizol e do anidropodorrizol. Ainda com base nesta investigação, o matairesinol, também encontrado em *Podophyllum hexandrum*, é aceito como o ponto de convergência na biossíntese das duas séries de lignanas ariltetralínicas que possuem diferentes padrões de substituição do anel pendente. Padrões de marcação isotópica na podofilotoxina e 4'-desmetil-podofilotoxina derivados da S-[^{14}C -metil]- metionina sustentam essa hipótese (Kamil, 1986^b) (figura 11).

Figura 11 – Participação do matairesinol na biossíntese de lignanas ariltetralínicas.

1.4.2 – O gênero *Forsythia*.

O acúmulo de lignanas formadas por acoplamentos oxidativos do tipo 8-8' em espécies do gênero botânico *Forsythia* direcionou o estudo da biossíntese das lignanas para as plantas deste gênero.

Uma inovação mostrada neste trabalho foi a utilização de preparações enzimáticas obtidas de diversas partes da planta (folhas, rizomas, raízes, etc.), dando início aos estudos de biossíntese *in vitro*. Essas preparações são incubadas em ambientes que simulem o sistema biológico com possíveis precursores marcados rádio- e isotopicamente. Os produtos são analisados por meio de CLAE em fase reversa e quiral para verificar possível estereoespecificidade e enantiosseletividade dos processos.

Em um estudo preliminar verificou-se a conversão do álcool *E*-coniferílico em (+)-pinoresinol demonstrando a ação de uma enzima estéreo- e enantioespecífica dependente de O₂ nesta etapa de dimerização (Davin et al, 1992) (figura 12).

Figura 12 - Formação *in vitro* do (+)-pinoresinol a partir do álcool *E*-coniferílico.

O resultado obtido deste estudo levou às seguintes conclusões: a comprovação de que um fenilpropanóide sofre acoplamento oxidativo levando a um dímero com atividade ótica e a existência de enzimas altamente enantioespecíficas que catalisavam preferencialmente a formação de um dos antípodas.

Uma vez formado, o (+)-pinoresinol sofre uma redução enantioespecífica dependente de NADPH para produzir a lignana benziltetraidrofurânica (-)-secoisolariciresinol, e posteriormente, uma lignana dibenzilbutânica, o (+)-lariciresinol (Katayama, 1992a, 1992b). A estereoespecificidade destas conversões foi investigada utilizando-se produtos deuterados que foram analisados por RMN de ^1H (Chu, 1993).

Este foi o primeiro registro da atuação de redutases agindo sobre éteres benzílicos em sistemas vegetais. O (-)-secoisolariciresinol, após esta etapa, é oxidado estereoespecificamente e fornece o (-)-matairesinol (Umezawa, 1990, 1991) (figura 13).

a: (+)-pinoresinol redutase NADPH-dependente

b: (-)-secoisolariciresinol redutase

c: (-)-secoisolariciresinol desidrogenase NADP⁺-dependente

Figura 13 – Rotas biossintéticas encontradas em *Forsythia intermedia* utilizando o (+)-pinoresinol como precursor.

Por sua vez, como já foi observado, o matairesinol serve como precursor das lignanas ariltetraidronaftalênicas como a podofilotoxina (Broomhead, 1991).

Ainda em *F. intermedia*, Osawa, 1993, investigou a formação da (-)-arctigenina mostrando que ela também poderia ser oriunda do (-)-matairesinol a partir da metilação da posição C-4 por intermédio de O-metil-transferases (Osawa, 1993) (figura 14).

Figura 14 – Formação da (-)-arctigenina a partir do matairesinol.

Os trabalhos envolvendo as redutases de *Forsythia* culminaram com o isolamento e purificação da enzima (+)-pinoresinol/(-)-lariciresinol redutase e clonagem do gene responsável por sua expressão. Esta enzima é uma proteína de aproximadamente 39 kDa cuja sequência de aminoácidos possui uma forte semelhança com a encontrada na enzima isoflavona-redutase, uma enzima chave do metabolismo de isoflavonóides e encontrada pela primeira vez em Angiospermas na família Fabaceae (Dinkova-Kostova, 1996).

1.4.3 – Outros estudos biossintéticos.

Paralelamente aos trabalhos de Lewis e seus colaboradores com as espécies de *Forsythia*, em 1991, dois outros grupos contribuíram significativamente para o até então incipiente estudo do metabolismo fenilpropanoídico envolvido na formação de lignanas.

Nabeta e colaboradores (1993) isolaram o (-)-pinoresinol das culturas de células não diferenciadas (calos) da espécie *Larix leptolepis* na proporção de 74% de excesso enantiomérico em relação ao antípoda (+). Incubação do álcool *E*-coniferílico com preparações enzimáticas extraídas dos calos desta espécie levou à formação do (-)-pinoresinol, também com 74% ee, corroborando a proposta de biossíntese deste tipo de lignana observado em um sistema de células diferenciadas como é o caso de *Fosythia intermedia*.

Ainda em 1991, Frias e colaboradores (Frias *et al.*, 1991) conseguiram purificar uma nova peroxidase capaz de dimerizar os ácidos ferúlico e cafeico a ácido 8,8'-bis-ferúlico e 8,8'-bis-cafeico, respectivamente (figura 15). Esta peroxidase foi isolada das folhas de *Blupleurum salicifolium* e foi denominada de cafeato-peroxidase. Este resultado demonstrou que as lignanas também poderiam ser produtos provenientes da dimerização de ácidos fenólicos e não apenas de álcoois, como vinha sendo observado até então pela formação das podofilotoxinas e do pinoresinol.

Figura 15 – Atuação da cafeato peroxidase sobre os ácidos cinâmicos substituídos.

Outras transformações que tomavam lugar nos esqueletos de lignanas após a etapa de acoplamento também foram investigados. É o caso da formação da ponte metilenodioxifenílica encontrada na sesamina, uma lignana furofurânica extraída das sementes de *Sesamun indicum*, o gergelim (Kato, 1998). Administração do precursor álcool *E*-coniferílico rádio- e isotopicamente marcado demonstrou que o álcool sofre acoplamento estereosseletivo para produzir o (+)-pinoresinol nas sementes do gergelim. O (+)-pinoresinol é metabolizado durante a maturação das sementes para biossintetizar

o (+)-piperitol, a (+)-sesamina e a (+)-sesamolina (figura 16). A introdução da ponte metilenodioxifenílica na estrutura furofurânica ocorre durante a conversão do (+)-pinoresinol a (+)-piperitol e é catalisada por uma enzima do citocromo P-450 O_2^- e NADPH-dependente contidas nos microssomos celulares da planta.

Em relação à maturação da semente e observa que as sementes mais maduras convertem o (+)-pinoresinol a (+)-piperitol e (+)-sesamina e as sementes mais jovens tendem a converter mais o (+)-pinoresinol em (+)-sesamolina, que possui a característica incomum de ter um átomo de oxigênio inserido entre C-1 e C-7. Esta inserção de oxigênio foi estudada por Marchand em 1997 (Marchand, 1997).

Ainda em relação à biossíntese de lignanas furofurânicas, Umezawa fez um estudo da composição enantiomérica do (-)-pinoresinol, (+)-matairesinol e (-)-wikstromol isoaldos de *Wikstromia sikokiana*. Ele encontrou analogias com relação ao mecanismo atuante em *Forsythia*, diferindo apenas na configuração dos produtos formados (Umezawa, 1996).

A mesma analogia foi observada nos estudos de biossíntese realizados na espécie *Zanthoxylum ailanthoides*, onde se verificou a participação do pinoresinol racêmico na formação do (+)-lariciresinol (Katayama, 1997).

Figura 16 – Metabolismo atuante na formação de lignanas furofurânicas em *Sesamun indicum*.

A investigação da biossíntese da (+)-eudesmina, o antípoda natural predominante na espécie *Magnolia kobus* var. *borealis* mostrou que seu precursor também é o (+)-pinoresinol. Este sofre metilação não-enantiossletiva para produzir lignanas furofurânicas não fenólicas como a (+)-eudesmina (Miyauchi, 1998) (figura 17).

Figura 17 – Formação da (+)-eudesmina a partir do (+)-pinoresinol.

O controle regioquímico do acoplamento oxidativo radicalar foi estudado com detalhes por Gang em 1999 (Gang *et al.*, 1999). Ainda em 1999, foram registradas novas evidências para corroborar a observação de que o pinoresinol e o lariciresinol eram provenientes do álcool *E*-coniferílico no estudo de lignanas encontradas em *Thuja occidentalis* (Kawai, 1999).

A formação de lignanas em *Jamesoniella autumnalis* e *Locopholea heterophylla* foi investigada e trouxe à luz uma importante descoberta: de que as lignanas também poderiam ser originadas de outros tipos de precursores. Assim, experimentos de incorporação de ácido cafeico [8-²H] mostraram que a jamesopirona e a escapaniapirona são derivadas de acoplamento duas moléculas do ácido cafeico (Tazaki et al, 1999) (figura 18).

Figura 18 – Ácido cafeico como precursor da (+)-jamesopirona e escapaniapirona.

A biossíntese de podofilotoxinas em *Linum flavum* e *Podophyllum peltatum* foi revisitada por Xia em 2000, desta vez estabelecendo *in vitro* e em cultura de células as rotas biossintéticas propostas a partir de resultados de incorporação *in vivo*.

Outra biossíntese revisitada foi a de *Wikstromia sikokiana* por Okunishi, em 2000 (Okunishi, 2000), onde mais uma vez se observa, por meio de incorporação do álcool coniferílico isotopicamente marcado, o papel deste monolignol como precursor das lignanas isoladas desta espécie. Okunishi, em 2001, estudou a relação enantiomérica entre precursores e produtos em *Daphne genkwa* e *Daphne odora* utilizando os antípodas dos precursores e produtos utilizados no estudo de *Forsythia*.

A imunolocalização das redutases atuantes na formação de lignanas foi estudada com êxito por Kwon (2001), em tecidos lenhosos de Angiospermas e abriu caminho para que mais uma técnica fosse aplicada ao estudo da biossíntese de lignóides.

Em 2001 foi publicada a purificação da enzima secoisolariciresinol desidrogenase e clonagem do gene que a codifica em *Forsythia intermedia*. Este trabalho foi de suma importância, pois existem ainda poucas enzimas atuantes no metabolismo fenilpropanoídico purificadas e que possam servir como referência em estudos posteriores (Xia, 2001).

A incorporação do álcool sinapílico [$U-^{14}C$] em (+)-siringaresinol na espécie *Liriodendrum tulipifera* (Katayama, 2001) mais uma vez demonstrou que outros precursores além do álcool *E*-coniferílico são convertidos a dímeros. O resultado comprova que as metoxilas encontradas nas posições 5 e 5' são originadas do álcool sinapílico e não são reações posteriores ao acoplamento (figura 19).

Figura 19 – Formação do (+)-siringaresinol a partir do álcool sinapílico.

Uma abrangente revisão acerca dos trabalhos mais importantes já realizados sobre a biossíntese de lignanas foi publicado em 1999 (Lewis, 1999), que inclui em detalhes a aplicação de técnicas de biologia molecular como ferramenta elucidativa para o entendimento desta área do conhecimento.

Objetivos

2- Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram os seguintes:

1. Realizar uma investigação fitoquímica nas plântulas e planta adulta de *Piper solmsianum* para verificar o acúmulo dos metabólitos secundários majoritários e avaliar a atividade específica da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) nos tecidos de plântula e de planta adulta.
2. Estudar *in vitro* a etapa de dimerização enzimática do *E*-5-metóxi-isoeugenol (ou 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-propenilbenzeno) que leva à formação da di-O-4,4'-desmetilgrandisina, tida como o precursor direto da grandisina. Pela análise dos resultados obtidos, permitir enquadrar ou não tanto a di-O-4,4'-desmetilgrandisina quanto a grandisina como neolignanas segundo a proposta sugerida por Gottlieb (1972), onde é estabelecido que as neolignanas são produtos do acoplamento oxidativo de alil- e propenilfenóis.

Material e Métodos

3 – Material e Métodos.

3.1- Investigação fitoquímica de *Piper solmsianum*

3.1.1- Coleta do material botânico

Para o estudo fitoquímico da espécie *Piper solmsianum*, espécimes da planta adulta foram coletados em dois locais diferentes. Os caules foram coletados no Instituto de Química da USP de São Paulo, na área de cultivo situada entre os blocos 11 e 12, na primeira semana de outubro de 1998 e também na reserva de Picinguaba, no município de Ubatuba-SP, em final de outubro de 1998. As raízes e inflorescências da planta adulta também foram coletadas na reserva de Picinguaba no mesmo período.

3.1.2- Obtenção dos extratos .

Após a coleta, as partes vegetais (raízes, caule e inflorescências) foram separadas, secas à temperatura ambiente por 48 horas e depois em estufa a 40°C por mais 24 horas. O material seco foi pesado, triturado em moinho de facas e extraído a frio com acetato de etila (inflorescências, raízes e caule) e acetona (caule) exaustivamente. Posteriormente os solventes foram eliminados por evaporador rotativo. Os rendimentos dos extratos estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Peso seco e rendimento dos extratos de média polaridade de *P. solmsianum*.

Parte Vegetal	Peso seco (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Caule I (USP)	15	0,54	3,61
Caule II (Picinguaba)	1.200	6,80	0,57
Raiz	230	4,20	8,07
Inflorescências	52	8,10	15,57
Folhas	4.450	567,23	12,74

3.1.3 - Fracionamento cromatográfico dos extratos.

Os extratos obtidos foram fracionados em colunas de gel de sílica 70-230 mesh utilizando gradientes de polaridade crescente de hexano/ acetato de etila até metanol puro. As frações recolhidas foram cromatografadas em CCDC e as que apresentavam estreita semelhança de coloração e R_f quando reveladas em luz UV (comprimentos de onda de 256 e 304 nm), e em solução de sulfato cérico, foram reunidas. As substâncias presentes nos extratos foram isoladas e purificadas por CCDP, utilizando como sistemas de eluição hexano/acetato de etila em proporções que variavam de 7:3 a 1:1 e hexano/diclorometano/metanol na proporção de 1:1:0,2, além de cromatografia em coluna de gel de sílica, eluindo-se com hexano e acetato de etila em gradientes com crescente grau de polaridade.

3.1.4 - Análise das substâncias isoladas.

Após isolamento, as substâncias foram analisadas por espectroscopia no infravermelho, CLAE, e, principalmente por RMN de ^1H e de ^{13}C . Os sinais foram atribuídos aos respectivos ^1H e ^{13}C e as substâncias foram identificadas por comparação com dados publicados na literatura. Os experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C foram feitos em espectrômetros Varian-300 MHz e Bruker-500 MHz disponíveis na Central Analítica do Instituto de Química da USP de São Paulo.

3.2 – Estudo de plântulas.

3.2.1- Propagação *in vitro* de *Piper solmsianum*.

Para a propagação das espécies *in vitro* foi utilizado o meio N1, formado pelos seguintes componentes nas seguintes concentrações:

- Meio Basal: Sais de Gamborg B-5 - 100 mL/L.
- Mio-Inositol - 100 mg/ L.

- Tiamina - 1 mg/L.
- Sacarose 3% .
- Fitagel - 1,75 g/L.
- AIA - 0,02 mg/L.
- GA3 - 0,02 mg/L.

Os sais de Gamborg constituem-se numa mistura de 14 sais minerais diluídos em água. O ácido giberélico e o ácido indol-acético são hormônios de origem natural (fitormônios), que têm a finalidade de estimular a divisão e a expansão celular.

Após a preparação do meio, ajusta-se o pH da solução para 5,7 e o material é autoclavado por 20 minutos a 120°C e 1 kgf/cm³.

O procedimento de propagação é realizado sob condições extremamente assépticas em fluxo laminar, utilizando-se entrenós, sementes ou folhas da planta adulta, devidamente esterilizados, que são mantidos em contato com o meio. As plantas começam a ser regeneradas a partir de 15 dias de cultivo.

3.2.2- Obtenção das plântulas e dos extratos

As plântulas de *P. solmsianum* de 06 e 09 meses de idade foram coletadas na Casa de Vegetação ao lado do Bloco 11 do Instituto de Química da USP de São Paulo. Exemplos de plântulas propagadas *in vitro* foram recolhidas da Sala de Cultura existente no Bloco 11 do Instituto.

As plântulas foram pesadas, liofilizadas e congeladas em N₂ líquido. Em seguida, cada exemplar foi macerado com auxílio de gral e pistilo, na presença de 100-150 mL de acetato de etila. A solução foi filtrada e o solvente eliminado em evaporador rotativo. Os extratos foram pesados e analisados por CCDC e por RMN ¹H.

3.2.3– Análise dos extratos e substâncias por RMN ^1H .

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos e das substâncias isoladas foram obtidos no espectrômetro VARIAN DPX-300, utilizando-se CDCl_3 como solvente e TMS como padrão interno.

3.3 - Determinação da atividade enzimática da PAL em folhas de plântulas e de planta adulta de *Piper solmsianum*.

3.3.1- Obtenção do material botânico.

Para realizar a dosagem da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) em espécies de *Piper solmsianum* foram utilizadas as folhas da planta adulta coletadas no Instituto de Química da USP de São Paulo e folhas de plântulas propagadas *in vitro*.

O exemplar de plântula obtido para o ensaio tinha a idade aproximada de três meses e meio, contados a partir da data em que o material botânico (caule e pecíolo) foi colocado em contato com o meio de cultura para a regeneração da espécie.

As massas de material obtidas para o ensaio foi a seguinte:

- Folhas de planta adulta: 1,13 g.
- Folhas de plântulas: 0,48 g.

3.3.2 - Extração da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) a partir do material botânico.

Para a obtenção da PAL, triturou-se o material vegetal previamente congelado em N_2 líquido em um gral em presença de uma solução de tampão borato 0,1 M (pH 8,8) na proporção de 2,3 mL para cada 0,5 g de material. Além do tampão foi adicionado PVPP na proporção de 0,05 g por 1g de material, com o objetivo de quelar os fenóis porventura extraídos e que possam interferir na análise, e, também, sílica (0,2 g), para auxiliar na homogeneização. Após a trituração do material, este foi filtrado em

gaze para um tubo de centrífuga mantido a 4°C e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante, que corresponde à preparação enzimática contendo a PAL, é armazenado em banho de gelo a 4°C e o precipitado é descartado.

3.3.3 - Dessalinização do sobrenadante obtido na extração.

Utilizou-se uma coluna PD-10 (Sephadex) com o intuito de dessalinizar e reter os componentes de baixo peso molecular presentes na preparação enzimática.

Esta coluna foi equilibrada eluindo-se 25 ml da solução tampão de borato (0,1 M) e, em seguida, 2,5 mL do sobrenadante. Este volume foi descartado. Em seguida eluiu-se 3,5 mL do tampão borato 0,1 M e este volume, que corresponde à preparação contendo a PAL, foi recolhido num béquer colocado num banho de gelo.

Para regenerar a coluna, eluiu-se a mesma com 10 mL de KOH 0,1 N e 50 mL de água destilada, sequencialmente. Finalmente eluiu-se 5 mL de uma solução de azida 0,2 % e a coluna é armazenada a 4 °C em 5 mL desta solução.

3.3.4- Incubação do precursor com a preparação enzimática.

A preparação enzimática contendo a PAL foi incubada com o substrato fenilalanina para verificar a formação do ácido cinâmico. Esta incubação foi realizada adicionando-se as seguintes soluções em um tubo cônico de 2,0 mL :

- 1.000 µL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8);
- 300 µL de solução de fenilalanina 10 mM;
- 200 µL de preparação enzimática contendo a PAL;

A reação foi incubada a 29°C por 30 minutos e interrompida pela adição de HCl 12 N, com o objetivo de desnaturar a enzima. Foi necessário realizar o ensaio em duplicata ou triplicata para se obter uma média dos valores obtidos no cálculo de atividade enzimática.

Preparou-se também um branco (controle) para a análise, onde a reação da enzima sobre o precursor foi imediatamente inibida pela adição de HCl 12 N. Para este branco, adicionou-se em um tubo cônico de 2,0 mL:

- 1.000 μL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8).
- 300 μL de solução de fenilalanina 10 mM.
- 200 μL de preparação enzimática contendo a PAL.
- 100 μL de HCl 12 N.

3.3.5 - Análise da atividade enzimática por CLAE.

Ao tubo onde foi realizada a incubação de fenilalanina com a preparação enzimática, adicionou-se 50 μL de uma solução de metil-umbeliferona 50 mM, que foi utilizada como padrão interno na análise e centrifugou-se por 5 minutos a 9.000 rpm. Retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi transferida para um tubo de análise de CLAE.

A análise por CLAE foi realizada num cromatógrafo líquido da marca Shimadzu LC-10, utilizando-se uma coluna Supelco C-18 (25,0 cm X 4,6 mm I.D.) sob condição isocrática, eluindo-se uma mistura de água: metanol: ácido acético na proporção de 40: 60: 1 (v/v/v) e fluxo de 1,00 mL/minuto durante 15 minutos, sendo a detecção feita no comprimento de onda de 275 nm. Desta forma foi possível visualizar o pico relativo à fenilalanina com tempo de retenção de 2,9 minutos, o pico do padrão interno em 4,7 minutos e o do ácido cinâmico formado em 8,9 minutos.

3.3.6 - Curva de calibração do ácido cinâmico.

Foram preparadas soluções aquosas de ácido cinâmico de concentrações 500, 250, 100, 50 e 25 mM e a estas foram adicionados 50 μL de solução 1 mM de metil-umbeliferona em acetato de etila. A análise foi feita por CLAE seguindo as mesmas condições para análise da PAL. As áreas dos picos relativos ao ácido cinâmico e a metil-umbeliferona (padrão interno) foram utilizadas no cálculo para o coeficiente linear R da reta da equação que determina a atividade enzimática da PAL.

3.3.7 - Dosagem de proteínas totais contidas nos extratos (Método de Bradford).

Segundo o método de Bradford (Bradford, 1976), prepararam-se duas soluções, cada uma contendo 1.200 μL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8) e 300 μL de corante Bio-Rad, que foram utilizadas para zerar o espectrofotômetro de Ultra-Violeta.

Para a incubação, adicionaram-se em uma cubeta de borossilicato 1.190 μL de tampão borato 0,1 M; 300 μL de corante Bio-Rad e 10 μL da preparação enzimática obtida. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foi feita a leitura de sua absorbância no espectrofotômetro de UV no comprimento de onda de 595 nm.

Para se obter o conteúdo de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos, foi feita uma curva padrão relacionando a absorbância de soluções de diferentes concentrações de albumina sérica bovina reagindo com o corante Bio-Rad, e a concentração das respectivas soluções. O conteúdo de proteínas totais presentes nos extratos foi dado por cálculos de regressão linear obtidos a partir do coeficiente angular da reta obtida.

As soluções de albumina sérica bovina são preparadas pela diluição de um solução estoque de concentração 14 mg/ mL em tampão borato. As concentrações das soluções são de 14 $\mu\text{g/ mL}$; 10 $\mu\text{g/ mL}$; 7,0 $\mu\text{g/ mL}$; 3, 5 $\mu\text{g/ mL}$ e 1, 75 $\mu\text{g/ mL}$. Em uma cubeta adicionou-se 800 μL de solução e 200 μL de corante Bio-Rad, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente e fez-se a leitura da absorbância a 595 nm, de cada uma das soluções.

3.4 - Preparação dos substratos utilizados nos ensaios de biossíntese.

3.4.1 - Preparação do *E*-5-metóxi-isoeugenol não marcado.

A partir do composto 4-alil-2,6-dimetoxifenol, disponível comercialmente, foi tentada uma reação de isomerização em meio fortemente básico para produzir o *E*-5-metóxi-isoeugenol. Após diversas tentativas sem sucesso, no qual deparou-se com forte degradação do produto obtido e baixo rendimento, estabeleceu-se um protocolo para a reação, que fornece um rendimento aproximadamente quantitativo (98%).

O composto 4-alil-2,6-dimetoxifenol (Aldrich) foi analisado por CG seguindo as condições utilizadas para a análise de plântulas propagadas e verificou-se que possuía um grau de pureza de 94%. Este composto foi dissolvido em 5 mL de etanol destilado e adicionado a 10 mL de uma solução etanólica de KOH 10 M. A mistura é mantida sob refluxo por um período de 6 horas. Ao final deste período, a solução é resfriada, adiciona-se HCl 20% até que o pH esteja em torno de 7. Esta solução é extraída com duas porções de 100 mL de CHCl₃. As fases clorofórmicas são reunidas e lavadas por 3 vezes com 100 mL de H₂O destilada para remoção do sal formado (KCl) e de resquícios ácidos porventura existentes. Após secagem com Na₂SO₄ anidro, filtração e eliminação do solvente por evaporador rotativo, obtém-se um resíduo amarelo-pálido. A análise por CG do resíduo mostrou a formação de 2 produtos (98%) e presença de apenas 1% do material de partida, além de 1% de impurezas. Através da análise dos espectros de RMN de ¹H, foi possível identificar uma mistura de (*E*) e de (*Z*)-5-metóxi-isoeugenol.

O 5-metóxi-isoeugenol é preparado antes de cada nova reação ou ensaio biossintético, pois, por se tratar de um fenol, é reativo e fotodegradável, devendo ser mantido em freezer a -20°C e no escuro.

3.4.2 – Preparação do álcool sinapílico.

Para a preparação do álcool sinapílico seguiu-se a metodologia proposta por Ludley e Ralph (1996).

O sinapaldeído (*trans*-3,5-dimetóxi-4-hidróxi-cinamaldeído) é dissolvido em 10 mL de acetato de etila destilado e adiciona-se NaBH₄ (2:1 mmol em relação ao aldeído). A solução é agitada por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período verifica-se a formação de um precipitado amarelo e adiciona-se 50 mL de H₂O destilada à mistura reacional. A solução é transferida para um funil de decantação de 250 mL e as fases são separadas. A fase aquosa é posteriormente extraída com 2 porções de 50 mL de acetato de etila e nesta fase observa-se que a fase aquosa passa de amarelo forte para incolor. as fases orgânicas são reunidas e secadas com Na₂SO₄ anidro, filtradas, concentradas e o resíduo analisado por CG e RMN de ¹H. O rendimento desta reação é de 100%, porém, o álcool degrada-se facilmente e é preparado imediatamente antes de ser utilizado em um experimento.

3.4.3- Preparação do *E*-5-metóxi-isoeugenol marcado com ¹⁴C.

Utilizando uma metodologia desenvolvida no laboratório do Dr. Norman Lewis, no Institute of Biological Chemistry da Washington State University (WSU - Pullman, WA, USA) e que ainda será submetida a publicação, sintetizou-se o *E*-5-metóxi-isoeugenol [8-¹⁴C] com o objetivo de avaliar sua conversão quando incubado em presença dos extratos enzimáticos de *P. solmsianum*. A preparação do substrato foi feita em 5 etapas.

3.4.3.1- Proteção do 3,5-dimetóxi-4-hidróxi benzaldeído.

A primeira etapa de preparação do substrato consistiu na proteção da hidroxila fenólica do 3,5-dimetóxi-4-hidróxi benzaldeído por meio de uma reação com TBS, utilizando imidazol como base.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL agitou-se, sob temperatura ambiente, 3,5-dimetoxi-4-hidroxi benzaldeído dissolvido em THF por 10 minutos. A seguir adiciona-se imidazol (2,5 equiv.). Após completa dissolução da base, adiciona-se o TBS (3,0 equiv.) e deixa-se sob agitação por um período de 16 horas. Durante este período observa-se a formação de um sólido branco. A reação foi monitorada por CCDC eluindo-se o aldeído de partida e a mistura reacional em hexano/acetato de etila 7:3.

A reação foi interrompida pela interrupção da agitação e o THF, evaporado. A mistura reacional foi ressuspendida em hexano, filtrada e lavada com hexano a frio. O filtrado, correspondente ao aldeído protegido, foi submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica eluída em hexano/acetato de etila 99:1 para purificação e analisada por RMN de ^1H e EM para confirmar a identidade do produto formado.

O rendimento desta reação foi de 98%.

3.4.3.2 - Preparação do iodeto de etil-trifenilfosfina marcado com ^{14}C .

Em um balão de fundo redondo dissolveu-se PPh_3 em THF anidro sob agitação e atmosfera de argônio. Após completa dissolução da trifenilfosfina, adicionou-se, gotejando lentamente, 1,1 equivalente de iodeto de etila [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (0,100 $\mu\text{Ci/mg}$). A reação foi mantida sob agitação por 12 horas a 55°C e interrompida por resfriamento. O sal de fosfônio precipitou sob a forma de cristais brancos que foram lavados com THF a frio e submetidos a análise de conteúdo radioativo em cintilador de fluxo. O rendimento da reação foi de 96% e o produto obtido continha 0,4 $\mu\text{Ci/mg}$ de radioatividade específica.

3.4.3.3 - Reação de condensação do tipo Wittig.

Uma vez obtido o aldeído protegido e o substrato radioativo, procedeu-se uma reação de condensação do tipo Wittig. Esta reação consiste na formação de uma olefina a partir de uma reação entre um aldeído e um sal de fosfônio.

Em um balão sob atmosfera de argônio adicionou-se o iodeto de etil-trifenil fosfina em THF seco e agitou-se à temperatura ambiente até completa dissolução do sal. Após 30 minutos adicionou-se lentamente *n*-BuLi (1,0 equivalente) e observou-se a coloração da solução mudar de incolor para amarelo-escura. O benzaldeído, dissolvido em um volume mínimo de THF seco, foi adicionado 30 minutos depois e à medida que foi adicionado, a solução voltou a se tornar incolor. A reação durou 10 horas e foi monitorada por CCDC, eluindo a mistura em hexano/acetato de etila 99:1 e co-eluindo o benzaldeído e *E*-5-metóxi-isoeugenol como padrões. A adição de uma solução saturada de NH₄Cl interrompeu a reação.

Adicionou-se acetato de etila na proporção de 2:1 (volume de mistura reacional: volume de acetato de etila) e lavou-se a mistura três vezes com solução saturada de NaCl. As fases orgânicas foram reunidas, secas em Na₂SO₄, filtradas e o solvente eliminado por evaporação. A purificação do produto obtido foi feita por CC de gel de sílica utilizando hexano/acetato de etila 98:2 como fase móvel. O rendimento desta reação foi de 82% e a radioatividade do produto foi de 0,068 μ Ci/mg. Análise por RMN de ¹H revelou tratar-se da mistura entre os isômeros *E* e *Z* do 5-metóxi-isoeugenol.

3.4.3.4 - Fotoisomerização do 5-metóxi-isoeugenol.

Como a reação de Wittig fornece ambos os isômeros do substrato desejado, e apenas o isômero *E* é objeto de interesse deste estudo, resolveu proceder-se uma reação de fotoisomerização com o intuito de se obter excesso enantiomérico do isômero *E*.

Esta reação foi iniciada com a dissolução da mistura em hexano em um balão e adição de sulfeto de difenila (0,3 equivalentes) sob agitação. Em um sistema fechado incidiu-se luz (60 Watts) diretamente sob a mistura em agitação por um período de 16 horas. Ao final deste período, o fluxo de luz e a agitação foram interrompidos e o solvente evaporado. A purificação do produto foi feita por CC de sílica-gel eluindo em hexano:acetato de etila 100:1 e o rendimento foi de 96% (*ee*) verificado por RMN de ¹H.

3.4.3.5 - Desproteção da hidroxila fenólica do propenilfenol.

De posse do *E*-5-metóxi-isoeugenol protegido, a última etapa para obtenção do substrato foi a desproteção da hidroxila fenólica.

Em um balão adicionou-se o propenilfenol dissolvido em THF seco, sob agitação à temperatura ambiente e 1,2 equivalentes de TBAF. A solução se tornou marrom escura à medida que o fluoreto foi adicionado. A reação durou 30 minutos e foi monitorada por CCDC eluindo-se em hexano/acetato de etila 7:3 utilizando o *E*-5-metóxi-isoeugenol como padrão. A reação foi interrompida pela adição de solução saturada de NH_4Cl e acetato de etila na proporção de 2:1 foi adicionado à mistura. A fase orgânica foi removida, lavada duas vezes com solução de HCl 1M, e, em seguida, com solução saturada de NaCl. A mistura foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente eliminado. Após eluição da mistura em coluna de sílica-gel com hexano/acetato de etila 99:1 e 7:3, obtem-se o *E*-5-metóxi-isoeugenol puro sob a forma de um óleo amarelo-pálido.

O rendimento desta reação foi de 97% e a radioatividade específica do produto foi de 0,068 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

3.4.4- Dimerização química do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

Para preparar a di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina racêmica, o suposto precursor direto da (-)-grandisina (esquema 6), foi feita uma reação de dimerização do *E*-5-metóxi-isoeugenol com H_2O_2 em presença de peroxidase comercial, segundo o procedimento descrito por Sarkanen e Wallis em 1972.

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 300 mg do fenilpropanóide dissolvido em 20 mL de acetona aquosa a 50% e 2,0 mg de peroxidase comercial, sob agitação, à temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 4,35 mL de uma solução 0,31% de H_2O_2 durante 5 horas e a mistura permaneceu sob agitação por mais 5 horas. A coloração laranja desenvolvida no decorrer da adição da água oxigenada (devido à formação do intermediário quinona) tornou-se amarela lentamente.

A cada hora era retirada uma alíquota de 200 μ L da mistura, extraída com 200 μ L de acetato de etila e analisada por CCDC em éter/tolueno 12% para verificar o consumo do material de partida, que foi utilizado como padrão, e a formação das lignanas tetraidrofurânicas desejadas.

A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de água destilada e a acetona foi evaporada sob pressão reduzida com o mínimo de calor. A solução aquosa resultante foi extraída com éter etílico (3 x 30 mL), seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente eliminado. O rendimento da reação foi de 325 mg e o produto obtido foi submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica (40 g) eluindo em éter/tolueno 12% e foram obtidos dois produtos: um cristal incolor (5 mg), cuja análise por RMN de ¹H revelou tratar-se da di-O-4,4'-desmetilgrandisina e outro composto (3 mg) que foi identificado como seu diastereoisômero.

Uma vez que se utilizou peroxidase não-específica para catalisar o acoplamento oxidativo dos monômeros, os produtos obtidos foram analisados por CLAE em fase quiral para verificar a separação dos enantiômeros de cada um.

3.5 - Administração de fenilalanina [U-¹⁴C] a *Piper solmsianum*.

Inicialmente foram feitos experimentos *in vivo*, administrando-se fenilalanina [U-¹⁴C] às folhas de plantas adultas de *P. solmsianum* para verificar sua conversão nas lignanas tetraidrofurânicas encontradas na espécie.

Seis folhas jovens de espécimes adultos de *P. solmsianum*, de aproximadamente mesma forma e peso foram coletadas e os pecíolos imediatamente imersos em uma solução contendo 50 μ L de fenilalanina [U-¹⁴C] 1 μ Ci/mL, 50 μ L de fenilalanina não marcada e 400 μ L de H₂O destilada e mantidas sob luz branca para facilitar o processo de metabolização do aminoácido. Após total absorção da solução (2h), as folhas foram mantidas em água até serem retiradas das soluções, uma a uma, a intervalos de 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente, congeladas em N₂ líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Adicionou-se 15 mL de acetato de etila ao material triturado, filtrou-se em papel de filtro quantitativo e centrifugou-se o homogenato por 20 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi

recuperado e o solvente totalmente eliminado por evaporação à pressão reduzida. O resíduo foi ressuspensão em 1 mL de MeOH/H₂O 1:1 e o MeOH foi eliminado por evaporação em dessecador. Extraíu-se a fase aquosa com 500 µL de acetato de etila, evaporou-se o solvente e ressuspendeu-se o extrato em 120 µL de MeOH:H₂O para análise por CLAE em fase reversa.

3.6 - Otimização das condições de CLAE em fase reversa .

Foram feitas diversas tentativas para se encontrar e otimizar uma condição de análise por CLAE em fase reversa que pudesse ser utilizada tanto na separação da di-O-4,4'-desmetilgrandisina e seus epímeros, quanto na análise dos extratos obtidos no experimento com fenilalanina [U-¹⁴C] e nos ensaios *in vitro* utilizando as preparações enzimáticas da planta.

Os melhores resultados foram obtidos com uma coluna Novapak C₁₈ (4 µm x 3,9 x 150 µm). Como fases móveis foram testados diversos gradientes utilizando como solventes metanol, acetonitrila de grau analítico e solução 3% de ácido acético. Os cromatógrafos líquidos utilizados foram da marca Waters 2690 acoplados com detector de arranjo de fotodiodos Waters 996.

A condição ideal encontrada para as análises foi a seguinte:

- Comprimento de onda : 280 nm
- Fluxo: 1 mL/minuto
- Gradiente: acetonitrila/ácido acético 3% (7:3) por 10 minutos e, em seguida, aumentando a polaridade até acetonitrila/ácido acético 3% (9:1) em 30 minutos.

O volume de injeção variou de acordo com a análise. No caso dos extratos, injetou-se 100 µL e foram coletadas frações de 1 mL a cada minuto. Para as análises que não exigiam coleta para isolamento de substâncias ou leitura de radioatividade, o volume de injeção variou de 10 a 30 µL, de acordo com a concentração da solução a ser analisada.

A leitura da radioatividade específica para o ¹⁴C foi feita em um cintilador de fluxo da marca Tri-Carb 2100TR e a radioatividade específica é dada em dpm

(desintegrações por minuto). Para efeito de correlação entre o valor da radioatividade específica lida e o correspondente em μCi , utiliza-se a relação onde 1 μCi equivale a $2,2 \times 10^6$ dpm.

Para verificar a separação entre os enantiômeros (+) e (-) da di-O-4,4'-desmetilgrandisina e de seu diastereoisômero, ambos sintéticos, foi utilizada uma coluna Chirobiotic e como fase móvel hexano/etanol 4:1 durante 30 minutos, sendo as substâncias detectadas no comprimento de onda de 280 nm.

3.7 - Preparação de tampões e soluções para extração das enzimas.

Para a extração das enzimas presentes nos tecidos de *P. solmsianum* foi preparado 1 L do tampão Tris-HCl 0.1 M (pH=7,5) contendo:

- 15,76 g de Tris-HCl (100 mM)
- 85,56 g de sacarose (250 mM)
- 2,92 g de NaCl (50 mM)
- 0,372 g de EDTA (1mM)*
- 7,92 g de ácido ascórbico (40 mM)*
- 0,771 g de DTT (5 mM)*

* : anti-oxidantes.

Os reagentes foram dissolvidos em 1L de água destilada e o pH foi ajustado para 7,5.

Além da solução de extração foram preparadas as seguintes soluções (1L de cada):

- Solução tampão K-Pb 1M pH 7,0;
- Solução tampão K-Pb 0,1 M pH 6,5 contendo 0,1% de mercaptoetanol;
- Solução tampão K-Pb 0,1M pH 6,5 contendo 1M de NaCl;
- Solução de Triton X-100 1% (em tampão K-Pi 0,1M);
- Solução tampão MES 40 mM pH 5,0.

Também foram preparadas soluções de 1 mL dos co-fatores testados como oxidantes nos experimentos.

- Solução de H₂O₂ 10 mM.
- Solução de NADPH 50 mM.
- Solução de NADH 4 mM.

3.8 - Dimerização enzimática do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

O substrato *E*-5-metóxi-isoeugenol [8-¹⁴C], foi incubado com diferentes tipos de homogenatos contendo proteínas solúveis, proteínas presentes no sistema citocromo P-450 de microsomos celulares e proteínas ligadas às paredes celulares, extraídos das folhas de *P. solmsianum*. na presença e ausência de co-fatores como NADH, NADPH e H₂O₂.

3.8.1- Extração das proteínas solúveis das folhas de *P. solmsianum*.

A metodologia estabelecida foi a seguinte:

- Pesou-se aproximadamente 100 g de folhas frescas e jovens da planta.
- Congelou-se em N₂ líquido e pulverizou-se o tecido com gral e pistilo até granulometria abaixo de 100 mesh, sempre em presença de N₂ líquido.
- Adicionou-se 100 mL do tampão de extração e 10% de PVPP e homogeneizou-se a solução por 5 minutos com gral e pistilo.
- Centrifugou-se a preparação por 30 minutos a 9.000 rpm (4°C).
- Filtrou-se o sobrenadante e o resíduo foi armazenado a 4°C para posterior extração das proteínas de parede celular.
- Centrifugou-se o sobrenadante a 25.000 rpm a 4°C por 30 minutos.
- Filtrou-se o sobrenadante e o resíduo foi ressuspenso e homogeneizado em tampão de extração (10 mL).
- O sobrenadante obtido contém as proteínas solúveis (19,4 mg/mL), que foram concentradas por precipitação com solução 80% de (NH₄)₂ SO₄.

- Centrifugou-se a suspensão contendo as proteínas por 30 minutos a 9.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi ressuspensão em um volume mínimo do tampão de extração.
- Armazenou-se a solução a -80°C.

3.8.2 - Extração das proteínas contidas nos microssomos celulares.

A partir do resíduo obtido após a segunda centrifugação, foi utilizada a seguinte metodologia:

- Ressuspendeu-se o resíduo com aproximadamente 10 mL de tampão de extração e homogeneizou-se a preparação.
- Centrifugou-se por 90 minutos a 48.000 rpm (4°C).
- O sobrenadante é desprezado, adicionou-se 10 mL de tampão de extração ao resíduo e homogeneizou-se a preparação.
- Centrifugou-se por 90 minutos a 48.000 rpm (4°C).
- Descartou-se o sobrenadante e o resíduo foi homogeneizado em um volume mínimo de tampão de extração contendo 20% de glicerol. Esta solução corresponde às proteínas contidas nos microssomos celulares (5,55 mg/mL) e foi armazenada a -80°C, ou utilizada imediatamente nos ensaios de incubação.

3.8.3 - Extração das proteínas de parede.

A partir do resíduo obtido após a primeira centrifugação, foi necessário seguir os seguintes passos para obter a preparação enzimática contendo as proteínas ligadas às paredes celulares. Todos os procedimentos foram realizados a -4°C.

- Lavou-se o resíduo com acetona gelada (-20°C, 200 mL, 30 minutos, por três vezes).
- Filtrou-se através de 4 camadas de gaze.
- Lavou-se o resíduo com tampão K-Pb contendo 0,1 % de β-mercaptoetanol (400 mL, 30 minutos).

- Filtrou-se a solução em gaze.
- Lavou-se o resíduo com 400 mL de solução 1% do detergente Triton X-100 por 4 horas.
- Filtrou-se a solução em gaze.
- Lavou-se o resíduo com 400 mL de tampão K-Pb pH 7 contendo 0,1 % de β -mercaptoetanol por 16 horas.
- Filtrou-se a solução em gaze.
- Extraíu-se as proteínas com 400 mL de tampão K-Pb pH 7 contendo 0,1 % de β -mercaptoetanol e 1M de NaCl por 4 horas.
- Filtrou-se a solução em gaze.
- Centrifugou-se o filtrado a 10.000 rpm por 20 minutos e recuperou-se o sobrenadante.
- Filtrou-se o sobrenadante através de filtro de membrana de porosidade 0,2 μ m.
- Concentrou-se o filtrado até um volume de 40 mL com concentrador de proteínas da marca AMICON.
- As proteínas de parede contidas neste volume de 40 mL foram precipitadas com solução 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a solução centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos.
- O sobrenadante foi desprezado, o resíduo foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão de extração e armazenado a -80°C .

3.9 - Ensaio de incubação do substrato com os extratos enzimáticos.

Foram realizados diversos experimentos para observar a possível dimerização estéreo e/ou regiosseletiva *in vitro* do *E*-5-metóxi-isoeugenol em di-O-4,4'-desmetilgrandisina. Segundo o esquema de biossíntese proposto, o substrato sofre o acoplamento oxidativo por ação da enzima que leva à produção direta da di-O-4,4'-desmetilgrandisina, que por ação de O-metiltransferases vai dar origem a (-)-grandisina.

Inicialmente foi realizado um experimento preliminar de incubação do substrato com as preparações enzimáticas, na presença de oxidantes com o objetivo de observar possível reação de acoplamento oxidativo do tipo 8-8'.

Em um microtubo cônico de 1,5 mL adicionou-se:

- 140 μL de tampão MES 40 mM (pH 5,0) ou K-Pb 0,1 M (pH 6,5).
- 20 μL de solução 50 mM de *E*-5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] 0,068 $\mu\text{Ci/mg}$.
- 50 μL do extrato enzimático.

Como os oxidantes foram testados tanto separadamente quanto em conjunto, utilizou-se diversos volumes de solução de H_2O_2 10 mM, NADH 4 mM e NADPH 50 mM de modo que o volume final de solução a ser incubada fosse de 250 μL .

As soluções foram incubadas por 30 minutos a 30 ° C e extraídas duas vezes com 400 μL de acetato de etila. Durante este processo foram adicionados 15 μL de uma solução de di-O-4,4'-desmetilgrandisina (1 mg/mL em MeOH) para que o composto fosse utilizado como carreador. Após eliminação do solvente, o resíduo era ressuspenso em 100 μL de MeOH/ H_2O 1:1 e 30 μL desta solução foram analisados por CLAE em fase reversa nas condições pré-estabelecidas.

Ao se incubar o substrato com a preparação enzimática em presença de NADPH e H_2O_2 como oxidantes, detectou-se di-O-4,4'-desmetilgrandisina, pela contagem da radiação no pico relativo a esta lignana no cromatograma.

Para todos os experimentos acima descritos foram utilizados controles, incubando o substrato e os co-fatores, somente o substrato e somente a preparação enzimática. Além destes, também foi realizado um controle utilizando-se a enzima desnaturada por aquecimento a 100 °C durante 30 minutos.

3.10- Quantificação da conversão do *E*-5-metóxi-isoeugenol

Para a quantificação da conversão enzimática do *E*-5-metóxi-isoeugenol em di-O-4,4'-desmetilgrandisina foram realizados os seguintes procedimentos:

3.10.1- Definição do padrão interno a ser utilizado na curva de calibração

Para definir que padrão interno deveria ser utilizado para a construção da curva de calibração levou-se em consideração basicamente dois fatores: a escolha de uma substância estruturalmente semelhante à di-O-4,4'-desmetilgrandisina, principalmente em relação aos grupos cromóforos e a não-sobreposição dos picos do padrão com o da di-O-4,4'-desmetilgrandisina ou do substrato no cromatograma em fase reversa.

Diversas substâncias foram testadas e foi escolhida a substância **20** (figura 20), que se trata de um indano sintético obtido em nosso laboratório. Esta substância possui um tempo de retenção em torno de 25 minutos nas condições de análise por CLAE em fase reversa estabelecidas.

20

P.M. = 285

Figura 20 – Estrutura do padrão interno utilizado.

3.10.2 - Curva de calibração da di-O-4,4'-desmetilgrandisina.

Preparou-se uma solução estoque de di-O-4,4'-desmetilgrandisina em MeOH (1mg/mL). A partir desta solução, foram preparadas 4 outras soluções por meio de diluições com as seguintes concentrações:

- 0,5000 mg/mL de di-O-4,4'-desmetilgrandisina;
- 0,2500 mg/mL de di-O-4,4'-desmetilgrandisina;
- 0,1250 mg/mL de di-O-4,4'-desmetilgrandisina;
- 0,0625 mg/mL de di-O-4,4'-desmetilgrandisina.

A cada uma destas soluções acrescentou-se 30 μ L de uma solução 1,0 mg/mL do padrão interno, correspondente a 8,42 nmols . Cada uma destas soluções foi analisada por CLAE em fase reversa nas mesmas condições de análise nas quais foi observada a conversão enzimática. Foi injetado um volume de 10 μ L para cada solução.

3.11 – Otimização dos ensaios

Uma vez observada e quantificada a dimerização enzimática do *E*-5-metóxi-isoeugenol na di-O-4,4'-desmetilgrandisina, alguns parâmetros foram otimizados para que fosse obtida atividade máxima da enzima. Esta otimização envolveu a análise de parâmetros como pH, concentração do substrato e determinação de cinética de reação.

Como já havia sido verificada a conversão do *E*-5-metóxi-isoeugenol em di-O-4,4'-desmetilgrandisina, foram utilizados substratos não-radioativos e não se adicionou o carreador à solução de incubação. Os volumes de solução incubados são os mesmos que os utilizados no item 3.9 (p.52).

3.11.1- Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo, diversos tampões foram utilizados na extração e na incubação para verificar em que valor de pH ocorria atividade máxima da enzima. As enzimas foram extraídas com os seguintes tampões de extração, preparados de acordo com a literatura (Deutscher *et al.*, 1990).

- Tampão acetato 0,1 M pH 3,7
- Tampão acetato 0,1 M pH 5,6
- Tampão fosfato 0,1 M pH 6,2
- Tampão fosfato 0,1 M pH 6,6
- Tampão fosfato 0,1 M pH 7,5
- Tampão fosfato 0,1 M pH 8,0
- Tampão Tris 0,1 M pH 8,8

3.11.2- Cinética de reação

As preparações enzimáticas foram incubadas com o precursor conforme o protocolo estabelecido em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos para se obter o gráfico de cinética de reação. Na construção do gráfico deve-se levar em consideração em que ponto o gráfico se torna linear e naquele intervalo de tempo correspondente a este ponto pode tomar-se a reação como completada.

3.11.3 - Saturação do substrato

Foram incubadas 6 soluções de variadas concentrações (10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM) do substrato *E*-5-metóxi-isoeugenol com a preparação enzimática de acordo com o protocolo de incubação estabelecido. A atividade máxima é alcançada quando todos os sítios ativos da enzima estão ocupados e, de acordo com a concentração da solução de substrato, ocorre maior conversão do substrato em produto.

Resultados e Discussão

4 - Resultados e Discussão.

4.1 - Investigação fitoquímica de *Piper solmsianum*.

A investigação fitoquímica da espécie vegetal *Piper solmsianum* concentrou-se no estudo de extratos de polaridade média, os quais, segundo estudos de outras espécies da mesma família poderiam conter lignanas, os compostos de interesse para nosso estudo (Jensen *et al*, 1993).

O estudo fitoquímico da planta (folhas, raízes, inflorescências e caules) bem como o de plântulas, levou à identificação de fenilpropanóides e lignanas do tipo tetraidrofurânicas, que são metabólitos provenientes da mesma via biossintética originária do ácido chiquímico (via chiquimato). Os metabólitos foram identificados com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , comparação com dados da literatura e com padrões disponíveis no laboratório. A substância inédita foi analisada por técnicas de RMN bidimensional e por EM e IV.

4.1.1 – Estudo do extrato acetato de etila das folhas.

O estudo do extrato de média polaridade das folhas da espécie *P. solmsianum* resultou no isolamento da lignana tetraidrofurânica grandisina **21** (figura 21) como um cristal branco a incolor (1, 2 g) nas frações eluídas com hexano/acetato de etila 7:3, que já havia sido reportado como um potente agente contra as formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas (Lopes *et al*, 1998). O primeiro relato do isolamento da grandisina a partir de fontes naturais vem do estudo da espécie *Litsea grandis* (Holloway, 1974). A grandisina foi identificada por análise de seu espectro de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura. Os dados relativos a seu espectro de RMN de ^1H estão mostrados na tabela 2 e o espectro é mostrado na figura 22.

As frações de menor polaridade obtidas do fracionamento cromatográfico por coluna de gel de sílica possibilitaram o isolamento do fenilpropanóide isoelemicina **22** (9,0 mg) (figura 21) que foi identificado através de comparação de seus dados de RMN de ^1H (tabela 5) com os da literatura (Enriquez, 1980).

Figura 21 – Estrutura da grandisina **21** e da isoelemicina **22**.

Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H da grandisina **21**

Hidrogênios	δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)
H-2, H-2', H-6, H-6'	6,62, s
H-7, H-7'	4,67, d, 6,6 Hz
H-8, H-8'	1,75, m
H-9, H-9'	1,08, d, 8,8 Hz
MeO- 3, MeO-3'	3,87, s
MeO-4, MeO-4'	3,89, s
MeO-5, MeO-5'	3,87, s

Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H de 21 obtido em CDCl_3 .

Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H de 22 obtido em CDCl_3 .

Uma nova lignana tetraidrofurânica **23** (37, 0 mg) foi obtida na fração eluída em hexano/acetato de etila 7:3 e purificada por CCDP utilizando o mesmo sistema de eluentes (figura 24).

Figura 24 – Estrutura da lignana **23**.

Esta lignana possui configuração assimétrica para o anel tetraidrofurânico, além de ser substituída por um anel metilenodioxifenílico. A observação da assimetria de substituição do anel tetraidrofurânico foi concluída pela observação em seu espectro de RMN de ^1H (figura 25) de que os hidrogênios carbinólicos H-7 e H-7' são dubletos (J em torno de 6,6 Hz) que possuem deslocamentos químicos diferentes: δ 4,38 para H-7 e δ 5,08 para H-7'. Assim também são distinguíveis os sinais referentes a H-8 e H-8', que aparecem no espectro de RMN de ^1H como multipletos em δ 1,78 e δ 2,23, respectivamente, integrando um hidrogênio cada um. As metilas em C-9 também aparecem como dois dubletos (J 8,8 Hz) em δ 1,07 e δ 0,69 respectivamente.

Estudos conformacionais em neolignanas do tipo 2,5-diaril-tetraidrofurânicas foram realizados por Sarkanen (1973) explicam os deslocamentos químicos de hidrogênios dos diversos tipos de estereoquímica dos anéis tetraidrofurânicos através da análise da posição dos substituintes, pseudorotação e ângulos de torção da molécula. Isto mostra por que os hidrogênios de estruturas assimétricas como **23** possuem diferentes deslocamentos químicos, ao contrário do que acontece para estruturas simétricas como a da grandisina.

Os dados de RMN de ^1H referentes a esta lignana foram comparados aos das lignanas tetraidrofurânicas que possuem diferentes configurações no núcleo

tetraidrofurânico e, desta forma, foi possível concluir que a configuração de seu anel era semelhante ao da veraguensina, ou seja, do tipo 7*R*, 8*S*, 7' *R*, 8'*S*, isolada de *Virola surinamensis* (Barata, 1978).

Em relação ao padrão de substituição dos anéis aromáticos, o espectro de RMN de ^1H mostrou, além do singleto referente ao grupo metilenodioxílico em δ 5,90, a existência de 4 metoxilas com sinais em δ 3,88, 3,81, 3,81 e 3,82. Tal observação mostrou semelhança estrutural com a grandisina, embora biossinteticamente, **23** pudesse ter sofrido uma oxidação, posterior ou concomitante à metoxilação em C-4, que levou à formação do grupo metilenodioxílico.

A tabela 03 (p. 67) mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para **23**.

Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H de 23 obtido em CDCl_3 .

Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C de 23 obtido em CDCl_3 .

Pelo espectro de RMN de ^1H é possível distinguir que uma das metoxilas estava em posição *orto* ao grupo metilenodioxílico, porém ligada ao carbono 3'. Caso estivesse ligada a C-2', o espectro apresentaria 2 sinais, um para o H-3' e outro para H-6', que teriam deslocamentos químicos diferentes. H-3' estaria mais protegido, pois estaria em posição *orto* a dois grupos fortemente eletrodoadores, enquanto H-6' teria um deslocamento químico menor, por estar *orto* a um oxigênio da metilenodioxifenila e *meta* ao outro. Se a metoxila se encontrasse ligada a C-6, haveria no espectro a presença de um duplo duplete relativo ao acoplamento entre H-2 e H-3, que estariam *orto* entre si.

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 23.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidades, J (Hz)
1	135,8	-
2	103,6	6,73, <i>d</i> , 1H, 2,2Hz
3	101,1	-
4	137,0	-
5	136,0	-
6	103,6	6,73; <i>d</i> , 1H, 2,2 Hz
7	87,4	4,38 ; <i>d</i> , 1H; 6,6 Hz
8	46,0	1,78; <i>m</i> , 1H
9	15, 1	1,07 , <i>d</i> , 6,6 Hz
1'	134,1	-
2'	101,1	6,55, <i>d</i> , 1H, 2,1 Hz
3'	143, 2	-
4'	137,3	-
5'	136,4	-
6'	106, 9	6,60, <i>d</i> , 1H, 2,1 Hz
7'	83,2	5,08, <i>d</i> , 1H, 6,6Hz
8'	47,9	2,23, <i>m</i> , 1H
9'	14,8	0,69, <i>d</i> , 3H, 6,9 Hz
O-CH ₂ -O	101,0	5,91, <i>s</i> , 2H.
O-CH ₃ - 3	56, 1	3,81, <i>s</i> , 3H.
O-CH ₃ - 4	60,7	3,88 , <i>s</i> , 3H
O-CH ₃ - 5	56, 1	3,81, <i>s</i> , 3H.
O-CH ₃ - 3'	56,6	3,82, <i>s</i> , 3H.

Em virtude da diferença na substituição dos dois anéis aromáticos restava saber a que carbono do anel tetraidrofurânico encontrava-se ligado cada anel aromático, o trimetoxilado e o outro contendo o grupo metilenodioxílico e a metoxila vizinha. Para solucionar este problema, foram realizados experimentos bidimensionais como NOE-DIFF e HMBC verificando acoplamento de ^1H com ^{13}C a três ligações.

Os resultados de NOE-DIFF confirmaram a estereoquímica do tipo 7*R*, 8*S*, 7'*R*, 8'*S* para o anel tetraidrofurânico dissustituído, pois neste experimento avalia-se a interação espacial entre os núcleos. Ao irradiar-se os hidrogênios da metila C-9 (δ 1,07) (figura 27) foi observado efeito NOE em δ 4,38 relativo a H-7, indicando que estes hidrogênios se encontram espacialmente próximos, mais especificamente no mesmo plano. Também se observam efeitos NOE em H-7'e H-8', nos sinais relativos a estes hidrogênios.

Sobre os hidrogênios dos anéis aromáticos foi possível perceber que a irradiação em δ 6, 73 (figura 28) causou aumento na intensidade do sinal em δ 4,38 (H-7). Se ocorre interação espacial entre H-7 e os hidrogênios equivalentes 2 e 6, conclui-se que este anel está ligado a C-7. Da mesma forma se esperaria que H-2' interagisse com H-7' e é o que realmente se observa quando se irradia H-2'. O efeito NOE é verificado em H-7'. Este efeito também é observado para este sinal quando se irradia H-6, haja visto que ocorre rotação do anel ao longo da ligação C-1 - C-7 e assim permite que ambos os hidrogênios aromáticos sintam a proximidade de H-7 (figura 29)

Figura 29- Interação espacial entre os hidrogênios observado no experimento de NOE para **23**.

Figura 27 – Espectro de NOE-DIFF mostrando os efeitos da irradiação da metila C-9.

Figura 28 – Espectro de NOE-DIFF mostrando os efeitos da irradiação de H-2.

Os resultados obtidos do experimento de HMBC $^3J_{C-H}$ (figura 30) confirmaram os dados de NOE-DIFF em relação à estrutura da nova molécula. Este experimento permite observar acoplamentos entre ^{13}C e 1H a três ligações e foi particularmente útil na confirmação dos sinais de carbono. A tabela 4 mostra as correlações observadas neste experimento.

Tabela 4 - Dados de RMN de 1H e HMBC $^3J_{C-H}$ para **23**.

H	δ (ppm)	HMBC $^3J_{C-H}$
2	6, 73	C-6, C-7, C-4
6	6, 73	C-2, C-7, C-4
2'	6, 54	C-6', C-7', C-4'
6'	6, 60	C-2', C-7', C-4'
7	4, 38	C-9, C-2, C-8', C-6.
7'	5, 08	C-9', C-2', C-8, C-6'
8	1,78	C-1, C-9', C-7'.
8'	2, 23	C-1', C-9, C-7.
9	0, 69	C-7, C-8'
9'	1,09	C-7', C-8'.

Figura 30 – Espectro de HMBC $^3J_{C-H}$ de 23.

O espectro de massas por impacto de íons (figura 33) confirmou a massa molecular do composto como sendo 416. Também por EM foi possível confirmar o padrão de substituição dos dois anéis aromáticos devido à presença de um pico de m/z 208, referente ao fragmento contendo o anel trimetoxilado e outro pico de m/z 192 referente ao fragmento contendo o anel com a metoxila e a metilenodioxifenila (figura 31).

Figura 31 – Principais fragmentos obtidos do espectro de massas 23.

O espectro na região do infravermelho (figura 32) mostrou bandas de absorção em 2.956 cm^{-1} referentes ao estiramento C-H em grupos CH_3 , além de uma banda intensa em 1.129 cm^{-1} característica de ligações C-O de éteres, assim como outras bandas em 1.036 cm^{-1} e 1.010 cm^{-1} indicativas de deformações axiais e angulares de ligações C-O. Bandas de média intensidade em 1.591 , 1.507 e 1.458 cm^{-1} também podem ser observadas e correspondem a vibrações relativas a ligações C=C e C-H dos anéis aromáticos.

Figura 32 – Espectro na região do infravermelho da lignana **23**.

Figura 32 – Espectro de massas da lignana 23.

4.1.2 - Estudo do extrato acetato de etila das raízes.

O estudo do extrato acetato de etila das raízes de *P. solmsianum* levou novamente ao isolamento de grandisina e de isoelemicina **22** em mistura com elemicina **24** (figura 34) (6,2 mg). Porém, por serem substâncias já conhecidas, a isoelemicina e a elemicina foram facilmente identificadas na mistura pela análise de seu espectro de RMN de ^1H (figura 35) (tabela 5) e comparação com dados da literatura (Enriquez, 1980, Al-Yahya *et al*, 1998).

Figura 34 – Estrutura da elemicina **24**

A diferença entre as estruturas dos dois fenilpropanóides é a cadeia propenólica ligada ao núcleo aromático trimetoxilado. O hidrogênio 7 na isoelemicina absorve como um dubleto em δ 6,07, enquanto os hidrogênios equivalentes da metila (H-9) absorvem como um duplete em δ 1,87, desprotegidos devido a proximidade com a dupla ligação. O hidrogênio 8 absorve como um duplo quadruplete em δ 6,26 pois acopla em trans com H-7 e também acopla com os três prótons H-9.

A elemicina apresenta um duplete em δ 3,3, relativo a H-7 e um duplo duplete em δ 4,99 atribuído a H-9 e H-9', além de um duplo duplo duplete em δ 5,92 atribuído a H-8. Este hidrogênio acopla com H-9 e H-9' (acoplamentos *trans* e *cis*, respectivamente) e com H-7.

Os hidrogênios 2 e 6 do anel aromático são equivalentes nos dois fenilpropanóides e, portanto absorvem como um singlete intenso em δ 6,57.

Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H da isoelementina e da elemicina em mistura obtido em CDCl_3 .

4.1.3 - Estudo do extrato acetônico do caule e acetato de etila das inflorescências.

O estudo do extrato de média polaridade do caule revelou apenas a presença de isoelemicina e grandisina, estando esta última em quantidade consideravelmente maior (aproximadamente 80% do extrato). As inflorescências revelaram a presença destes dois metabólitos, mais a elemicina e o fenilpropanóide miristicina **25** (0,8 mg) (figura 36), que não havia sido identificado nas outras partes da planta estudada. A miristicina foi identificada por meio de comparação com padrão em CCDC e por CLAE em fase reversa cujo cromatograma (figura 36) está mostrado na página 80.

Figura 36 – Estrutura da miristicina **25**

Figura 37 – Cromatograma líquido em fase reversa da miristicina **25**

4.2 - Análise das plântulas de *Piper solmsianum*.

A análise de plântulas propagadas e cultivadas de *P. solmsianum* teve como objetivos o estudo comparativo do acúmulo de metabólitos secundários com as partes da planta adulta e determinação da fase do desenvolvimento onde se observa o início da produção de grandisina. As plântulas estudadas tinham idades variadas até o máximo de 09 meses, após a propagação ou cultivo, quando foram coletadas para estudos.

Para o estudo fitoquímico preliminar as plântulas foram extraídas com acetato de etila. A quantidade reduzida de extratos obtida direcionou a identificação dos compostos existentes por CCDC analítica utilizando-se padrões puros e pela análise do espectro de RMN de ^1H dos extratos (figuras 39 e 40). Neste estudo foram detectadas as presenças dos fenilpropanóides apiol **26**, dilapiol **27**, elemicina, isoelemicina e miristicina, sendo que os três últimos também foram encontrados na planta adulta (figura 38). O dilapiol foi identificado em mistura com o apiol pela subtração dos sinais em mistura dos sinais relativos ao apiol (tabela 5). A ocorrência destes fenilpropanóides em outras espécies de *Piper* já estudadas fitoquimicamente pelo nosso grupo, como na espécie *P. regnellii* (Sartorelli *et al.*, 1998), auxiliou na identificação destes monômeros, assim como dados de RMN de ^1H existentes na literatura (Santos, 1998, Al-Yahya *et al.*, 1998). As figuras 41 e 42 mostram os espectros de RMN de ^1H do apiol e da mistura.

Figura 38 – Estrutura do apiol **26** e do dilapiol **27**.

Figura 39-- Espectro de RMN de ^1H do extrato plântulas propagadas de *P. solmsianum* obtido em CDCl_3 .

Figura 40 - Espectro de RMN de ¹H de plântulas cultivadas de *P. solmsianum* obtido em CDCl₃.

Figura 41 – Espectro de RMN de ¹H de 26 obtido em CDCl₃.

Figura 42 - Espectro de RMN de ¹H da mistura apiool + dilapiool obtido em CDCl₃.

Análise por CCDC, utilizando a grandisina como padrão mostrou que, pelo menos até os 09 meses de idade das planta cultivada e propagada, ainda não há produção deste metabólito na planta. Tal observação foi corroborada pelos espectros de RMN de ^1H dos extratos, onde não se observam sinais na região dos hidrogênios carbinólicos do anel tetraidrofurânico, entre δ 4,00 e δ 5,00. No entanto, foram observados sinal referente a grupamentos metilenodioxílicos em δ 5,90 atribuídos a **25**, **26** e **27**, que contém este grupo em sua estrutura e que foram confirmados na plântula por CCDC.

Outro aspecto importante é o fato de que tanto plântulas cultivadas quanto propagadas possuem exatamente o mesmo perfil cromatográfico, o que também pode ser observado nas análises dos espectros de RMN de ^1H dos extratos. Este perfil é invariável até os 09 meses de idade, daí a razão de se ter escolhido este estágio de desenvolvimento para servir como modelo.

Tabela 5 - Dados de RMN de ¹H (δ, multiplicidade, J) para os fenilpropanóides isolados de *P. solmsianum*.

Estrutura Geral

Derivados de allifenóis: Derivados de propenilfenóis:

apiol, dilapiol, elemicina

isoelemicina

Hidrogênios	Isoelemicina	Elemicina	Apiol	Dilapiol
2	6,55 (s, 1H)	6,55 (s, 1H)	6,35 (1H, s)	-
6	6,55 (s, 1H)	6,55 (s, 1H)	-	6,30 (1H, d, 1, 36 Hz)
7	6,07 (1H, d, 9,0 Hz)	3,22 (2H, dd, 1,5, 6,4 Hz)	3,29 (2H, dd, 1, 6, 6, 6 Hz)	3,29 (2H, dd, 1,6, 6,6 Hz)
8	6,40 (1H, dq, 1,5, 7,9 Hz)	5,80 (1H, m)	5,87 (1H, m)	5,87 (1H, m)
9a	1,87 (3H, d, 7,9 Hz)	5,01 (1H, dd, 1,5, 9,0 Hz)	5,01 (1H, dd, 1,1, 8,7 Hz)	5,01 (1H, dd, 1,1, 8,7 Hz)
9b	-	5,03 (1H, dd, 1,1, 13,4 Hz)	5,06 (1H, dd, 1,1, 12 Hz)	5,06 (1H, dd, 1,1, 12 Hz)
O-CH ₃ 2	-	-	3,75 (3H, s)	3,75 (3H, s)
O-CH ₃ 3	3,83 (3H, m)	3,84 (3H, s)	4,01 (3H, s)	3,84 (3H, s)
O-CH ₃ 4	3,84 (3H, m)	3,84 (3H, s)	-	-
O-CH ₃ 5	3,83 (3H, m)	3,84 (3H, s)	-	-
O-CH ₂ -O	-	-	5,94 (2H, s)	5,94 (2H, s)

4.3 – Substâncias isoladas de *Piper solmsianum*

4.3.1- Fenilpropanóides

Dilapiol - (2,3-dimetóxi-4,5-metilenodióxi-alil-benzeno) – Espectro de RMN de ^1H (mistura com o apiol): p. 85. Tabela 5, p. 87. Encontrado nas plântulas de *P. solmsianum*.

Apiol - (2,5-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-alil-benzeno) – Espectro de RMN de ^1H : p. 84. Tabela 5, p. 87. Encontrado nas plântulas de *P. solmsianum*.

Miristicina - (3-metóxi-4,5-metilenodióxi-alil-benzeno) – Cromatograma em CLAE de fase reversa p.80. Encontrado nas plântulas e inflorescência de *P. solmsianum*.

Elemicina – (3,4,5-trimetóxi-alil-benzeno) – Espectro de RMN de ^1H (em mistura com a isoelemicina): p. 78. Tabela 5, p. 87. Encontrado em raízes e plântulas de *P. solmsianum*.

Isoelemicina – (3,4,5-trimetóxi-propenil-benzeno) – Espectro de RMN de ^1H : p. 62. Tabela 5, p. 87. Encontrado em folhas, caule e plântulas de *P. solmsianum*.

4.3.2- Lignanas tetraidrofurânicas

(-)-Grandisina – (-)-(7*S*, 7'*S*, 8*S*, 8'*R*)-3,3', 4, 4', 5, 5'-hexametóxi-7,7'-epóxilignana. Espectro de RMN de ^1H : p. 61. Tabela 2, p. 58. Encontrada em folhas, caule, raízes e inflorescências de *P. solmsianum*.

4.4 - Atividade enzimática de PAL em folhas de plântulas e de planta adulta de *Piper solmsianum*.

A enzima fenilalanina-amônia liase (PAL) é tida como uma das mais importantes enzimas envolvidas no metabolismo fenilpropanoídico. Ela é a iniciadora do processo de reações que produzirão os metabólitos desta via, como fenilpropanóides, flavonóides e lignanas, assim como também é o responsável por produtos do metabolismo primário, como as ligninas. A PAL atua na conversão do aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico, que sofre uma série de transformações posteriores como metilações, hidroxilações, oxidações e reduções que vão dar origem aos produtos naturais acima citados Jones, 1984).

Considerando que os metabólitos secundários principais isolados de *P. solmsianum*, são originários do metabolismo fenilpropanóidico, decidiu-se avaliar a atividade da PAL nos diversos estágios de desenvolvimento da planta.

Para o estudo da PAL, foi utilizada uma preparação obtida a partir da maceração do material vegetal (planta adulta e plântula) com tampão borato (0,1 M pH 8,8), que ajuda a solubilizar as diversas proteínas presentes no tecido. A obtenção destas preparações foi realizada em uma temperatura baixa o suficiente (em torno de

4°C) para minimizar as alterações das estruturas terciárias das enzimas, o que pode acarretar na diminuição ou mesmo total destruição de sua atividade catalítica. O ensaio utiliza como substrato a *L*-fenilalanina que é incubada por 30 minutos com a preparação contendo a PAL. A interrupção da reação se deu pela adição de HCl 12 M com o objetivo de desnaturar a proteína e assim, interromper o processo de produção do ácido cinâmico.

A análise da conversão pode ser realizada por CLAE em fase reversa (figura 44) utilizando-se como padrões a *L*-fenilalanina), o ácido cinâmico e um padrão interno, sendo que neste estudo foi utilizada a cumarina metil-umbeliferona **28** (figura 43). O padrão interno compensa as variações nas condições, bem como as diferenças nos volumes de injeção e tempos de retenção durante as corridas de CLAE. Um padrão interno, se escolhido de maneira adequada pode compensar erros aleatórios e sistemáticos (Skoog, 1998).

Figura 43 – Estrutura da metil-umbeliferona.

Figura 44 – Cromatograma líquido em fase reversa do produto de incubação da fenilalanina como o extrato contendo a PAL.

Os tempos de retenção e as áreas dos respectivos picos foram utilizados nos cálculos para a determinação da atividade enzimática da PAL, conhecido por Método do Padrão Interno.

Os estudos de atividade enzimática utilizam a unidade Katal por mL de homogenato. Um Katal é definido como a quantidade de enzima necessário para transformar 1 mol de substrato em 1 mol de produto por minuto. No caso da PAL, o substrato é a *L*-fenilalanina e o produto, o ácido cinâmico. Esta atividade pode ser calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{nKatal (PAL)}}{\text{mL}} = \frac{[(\text{ac/pi}) - (\text{ac}_{\text{branco}}/\text{pi}_{\text{branco}})] \times \text{nmol pi}}{\text{R x min. inc. x 60 x mL de extrato incubado}}$$

onde:

ac - área do ácido cinâmico

pi - área do padrão interno (metil-umbeliferona)

inc - incubado

R - fator de correção para o ensaio = 8,6489

O fator de correção (R) foi obtido através da equação da reta do ácido cinâmico como mostrado na figura 45.

Figura 45 - Curva padrão do ácido cinâmico.

Os valores calculados de atividade enzimática total da PAL para os espécimes estudados foram os seguintes:

Folha de Plântula: $5,98 \times 10^{-2}$ nKatal.mL⁻¹

Folha de Planta Adulta: $55,05 \times 10^{-2}$ nKatal.mL⁻¹

A atividade enzimática pode ser expressa como atividade específica determinando-se o conteúdo de proteínas totais contidas na preparação enzimática, que pode ser feito pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976). Este ensaio é realizado preparando-se soluções de várias concentrações de uma determinada proteína, no caso a albumina sérica bovina, que reage com o corante "Comassie brilliant blue". Mede-se a absorvância das soluções que é plotada em um gráfico contra a sua concentração (curva de calibração). A equação da reta obtida serve para correlacionar a absorvância e a concentração de proteína na solução desconhecida.

A figura 46 mostra a curva de calibração da albumina sérica bovina de onde foi obtida a equação da reta que foi usada para obter o conteúdo de proteínas totais nos extratos de plântula e de planta adulta.

Figura 46- Curva de calibração da albumina sérica bovina.

Os valores de absorbância encontrados foram relacionados na equação da reta como a variável x. O valor da variável y, obtida a partir da equação da reta vai equivaler o conteúdo total de proteínas. Os resultados foram os seguintes:

- **Total de proteínas totais no extrato enzimático de plântula :**

0,0022 µg/mL

- **Total de proteínas totais no extrato enzimático da Planta Adulta: 29,22µg/mL**

A equação para a determinação da atividade específica da PAL é dada a seguir:

$$\text{Atividade específica (nKatal/mg de proteína)} = \frac{\text{Atividade (nKatal/mL)}}{\text{Quant. De proteínas} \times 1.000}$$

E, desta forma, as atividades específicas para a PAL nas folhas de plântulas e planta adulta de *P. solmsianum* serão as seguintes:

- Plântula de 03 meses de idade: $2,04 \times 10^{-2}$ nKatal/mg
- Planta adulta : **18, 84 nKatal/mg**

Observou-se que a atividade específica da PAL em plântulas propagadas e com a idade de 03 meses é extremamente menor que no caso de folhas de plantas adultas. Supõe-se que exista uma determinada fase do metabolismo em *P. solmsianum* que, aparentemente, leva as plantas a um aumento na atividade das principais enzimas atuantes tais como a PAL.

4.5- Estudos Biossintéticos em *P. solmsianum*.

Tendo-se como base os estudos fitoquímicos e a análise de atividade da PAL concluídos, foi iniciado os estudos biossintéticos visando definir etapas envolvidas na formação dos fenilpropanóides e de lignanas tetraidrofurânicas em *P. solmsianum*.

Análise preliminar da grandisina extraída de *P. solmsianum* por cromatografia quiral acoplada a um detector de quiralidade (figura 47), e de medida de α_D revelou que apenas o antípoda (-) é produzido pela espécie, o que é um indicativo da atuação de uma enzima enantiosseletiva.

Figura 47 – Cromatograma líquida em fase quiral da grandisina de *P. solmsianum*

Este trabalho apresenta uma proposta de biossíntese para as lignanas tetraidrofurânicas isoladas de *P. solmsianum*, onde pressupõe-se que seu precursor direto seja o propenilfenol *E*-5-metóxi-isoeugenol (3,5-dimetóxi-4-hidróxi-propenilfenol) **29** (figura 48).

Figura 48 – Estrutura do *E*-5-metóxi-isoeugenol **29**.

Segundo esta proposta, as lignanas tetraidrofurânicas de *P. solmsianum* são formadas a partir do acoplamento oxidativo do tipo 8-8' entre duas espécies radicalares oriundas das unidades de **29** com posterior introdução de um átomo de

oxigênio na posição 7 por adição de uma molécula de água. Reações posteriores de perda de hidrogênio são responsáveis pelo fechamento do anel e, de acordo com a regioespecificidade da enzima envolvida no processo, originaria as diversas configurações para o anel tetraidrofurânico metil-substituído nas posições 8 e 8' (esquema 6).

Esta proposta é sustentada principalmente pelo fato da mesma demandar poucas etapas posteriores ao acoplamento e não requerer redução nas posições 9 e 9'. Esta redução poderia ocorrer caso o precursor das lignanas fosse o álcool sinapílico, uma vez que a maioria das propostas apresentadas para lignanas do tipo 8-8' consideram os álcoois como possíveis precursores, em especial, o álcool coniferílico.

Esquema 6 – Biossíntese dos metabólitos secundários de *P. solmsianum*

4.6 - Preparação do *E*-5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$].

Como o composto *E*-5-metóxi-isoeugenol não é disponível comercialmente, foram pesquisadas metodologias para seu preparo a partir de compostos comerciais. O composto escolhido foi o 4-*alil*-2,6-dimetóxi-fenol **30**, que sofre uma reação de isomerização da dupla ligação catalisada por meio de base forte levando ao propenilfenol desejado (figura 49). Esta reação apresentou um bom rendimento (99%), porém, produziu ambos isômeros (*E* e *Z*) **29a** e **29b**, numa proporção de 2:3, respectivamente, segundo análise por CG (cromatograma gasoso mostrado na figura 50). Através da observação da reação de dimerização química mediada por peroxidase, tornou-se desejável apenas a obtenção do isômero *E*.

Figura 49 – Reação de isomerização da dupla ligação de **30** por meio de uma base forte.

Figura 49 – Cromatograma gasoso do produto obtido da reação entre o 4-alil-2,6-dimetóxfenol e NaOH 12 N.

Também foi necessário preparar o substrato isotopicamente marcado para monitorar as reações biossintéticas. Diante destas necessidades, foi utilizada uma metodologia que utiliza como material de partida o siringaldeído, que é convertido ao propenilfenol através de uma reação de Wittig com um sal de fosfônio marcado com ^{14}C (figura 50). Esta metodologia apresenta um número maior de etapas que a utilizada para isomerização da cadeia propenólica do alilfenol, porém possibilitou bom rendimento na marcação isotópica por ^{14}C e, principalmente, leva a produção quase que exclusiva do isômero desejado.

Como foi citado anteriormente, todas as reações envolvidas na preparação do substrato foram feitas preliminarmente com reagentes não-radioativos. Isto possibilitou a análise dos produtos formados por métodos como RMN e EM, o que garantiu a obtenção de padrões cromatográficos. Permitiu ainda a otimização dos experimentos para obter-se melhores rendimentos. As reações utilizando substratos marcados isotopicamente foram acompanhadas por CCDC e os produtos comparados com os das mesmas reações com reagentes não marcados.

Inicialmente foi feita uma reação de proteção da hidroxila fenólica do siringaldeído **31** utilizando TBS **32** catalizada por imidazol (figura 51) (Jarowicki, 2001). A finalidade desta reação é evitar a formação de possíveis sub-produtos que pudessem ser formados em etapas posteriores devido à reatividade do fenol.

Figura 51 – Reação de proteção da hidroxila fenólica de **31** pelo grupo TBS.

O produto formado na reação foi analisado por CCDC e verificou-se que houve diferença de R_f quando comparado a **29**. Isto se deve a diminuição do caráter polar da molécula pela substituição da hidroxila fenólica pelo grupo TBS.

O iodeto de etil-trifenilfosfina [$^{14}\text{C}_2$] **35** que reage com o siringaldeído protegido é obtido sob a forma de cristal na reação da trifenilfosfina **33** com o iodeto de etila [$^{14}\text{C}_2$] **34** (figura 52). O iodeto de etil-trifenilfosfina não-marcado é disponível comercialmente e foi feita uma comparação por CCDC para comprovar a identidade do mesmo como o sal de fosfônio desejado.

Figura 52 – Obtenção do iodeto de etil-trifenilfosfina a partir da trifenilfosfina e do iodeto de etila [$^{14}\text{C}_2$].

A reação de condensação de Wittig utilizando o **32** e **35**-[$^{14}\text{C}_2$] (figura 53) resultou em um produto de polaridade mais baixa do que o aldeído de partida, e após purificado, foi analisado por RMN de ^1H . Análise do espectro de RMN de ^1H de **36** (figura 54) mostrou tratar-se do 5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] e o rendimento da reação (82%) foi considerado satisfatório para uma condensação de Wittig.

Figura 53 – Reação de condensação de Wittig entre o iodeto de etil-trifenilfosfina [$^{14}\text{C}_2$] e o siringaldeído protegido.

A análise do espectro de RMN de ^1H (figura 54) mostrou sinais compatíveis com o do fenilpropanóide isoelemicina, que difere do *E*-5-metóxi-isoeugenol pela presença da metoxila em C-4. Observou-se a existência dos isômeros *E* e *Z* em mistura (3:2, *E*:*Z*), através da observação de dois dubletos referentes ao acoplamento da metila terminal com os hidrogênios 7 e 8 da cadeia insaturada. Os dubletos situam-se em δ 1,84 no caso do isômero *E* e δ 1,92 para o isômero *Z*.

Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H de 36 obtido em CDCl_3 .

Para se obter excesso do isômero *E* foi feita uma reação de fotoisomerização de **36** através da irradiação de luz (60 W) sobre a mistura, utilizando o dissulfeto de difenila como iniciador (figura 55) (Hansem, 1985). O produto da reação de fotoisomerização foi analisado por RMN de ^1H (figura 56) e observou-se o aumento de intensidade do dubleto em δ 1,87 em contrapartida da diminuição do dubleto em δ 1,92. Isto demonstra que houve isomerização da dupla ligação, favorecendo a formação do isômero *E*, mais estável termodinamicamente que o isômero *Z*. O rendimento da reação foi de 96% .

Figura 55 – Reação de fotoisomerização de **36**

Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H de 37 obtido em CDCl_3

A retirada do grupo TBS de **37** foi feita por tratamento com TBAF em meio a *n*-BuLi (figura 57) e monitorada por CCDC. Após 30 minutos de reação, observou-se desaparecimento do material de partida e formação de um produto mais polar, cuja co-eluição com padrão de 5-metóxi-isoeugenol revelou tratar-se da mesma substância. Análise por RMN de ^1H (figura 57 e tabela 7) mostrou o desaparecimento do sinal referente ao grupo de proteção e existência de um singlete largo em torno de δ 5,04. Comparação com os dados da isoeleminina comprovou tratar-se do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

Figura 57 - Desproteção da hidroxila fenólica do *E*-5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] por TBAF.

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H de **29**.

H	δ (ppm), multiplicidades, J (Hz)
2,6	6,72 ,s, 2H
7	6,23 ,d, 1H, 1,5 Hz
8	6,07, m, 1H
9	1,87, d, 3H, 7,8 Hz
OMe-3	3,79, s, 3H
OMe-5	3,79, s, 3H
OH	5,4, s, 1H

Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H de 29 obtido em CDCl_3 .

4.7 – Análise dos produtos de dimerização química do substrato

O objetivo da reação do substrato *E*-5-metóxi-isoeugenol não-marcado com peroxidase comercial foi a obtenção da di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina racêmica, que, segundo a proposta sugerida, é o produto direto do acoplamento oxidativo entre as duas unidades do *E*-5-metóxi-isoeugenol. Esta lignana foi inicialmente isolada como produto natural de *Virola pavonis* (Ferri, 1978), pertencente à família Myristicaceae.

A di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina sintética pode ser obtida como um produto de reação entre o *E*-5-metóxi-isoeugenol e H₂O₂ catalisada por peroxidase de raiz forte, disponível comercialmente (Wallis, 1973).

Segundo os autores, esta reação de dimerização do (*E,Z*)-5-metóxi-isoeugenol, leva exclusivamente a produtos de acoplamento oxidativo do tipo 8-8' dando origem ao esqueleto tetraidrofurânico tetrassubstituído, característico das lignanas tetraidrofurânicas encontradas na natureza. Como se trata de uma reação radicalar, levou-se em consideração os modos espaciais de aproximação entre os radicais para explicar a formação de seis produtos para o isômero *Z* e apenas dois produtos para o isômero *E* (figura 59). Um dos produtos corresponde a di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina **39** (espectro de RMN de ¹H mostrado na figura 60) e o outro, **40**, possui configuração do anel tetraidrofurânico semelhante ao da lignana **23**. A di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina foi analisada por CLAE em fase reversa e quiral (figuras 61 e 62). No cromatograma em fase quiral, foram observados dois picos relativos aos enantiômeros (+) e (-), com 10% de excesso enantiomérico em relação ao produto (+). Este resultado era esperado, já que o acoplamento é mediado por uma peroxidase não-enantiosseletiva

Figura 59 – Produtos da dimerização química do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

A obtenção dos tempos de retenção dos enantiômeros em fase quiral foi de extrema utilidade para se determinar qual isômero era preferencialmente formado nas reações de biossíntese. Possivelmente, a existência de uma enzima enantiosseletiva leva à predominância na formação de um dos isômeros e leva à formação da grandisina através da ação de *O*-metiltransferases.

Figura 60 -- Espectro de RMN de ^1H da di-O-4,4'-desmetilgrandisina obtido em CDCl_3 .

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H para o di-O-4,4'-desmetilgrandisina

Hidrogênios	δ (ppm), multiplicidades, J (Hz)
2, 2', 6, 6'	6,60, 4H, s
7, 7'	4,65, 2H, <i>d</i> , 6,6 Hz
8,8'	1,75, 2H, <i>m</i>
9,9'	1,08, 2H, <i>d</i> , 8,8 Hz
MeO-3, MeO-3'	3,87, 6H, s
OH-4, OH-4'	5,4, 2H, s
MeO-5, MeO-5'	3,87, 6H, s

Figura 61 – Cromatograma líquido em fase reversa da di-O-4,4'-desmetilgrandisina sintética.

Figura 62 – Cromatograma líquido em fase quiral da di-O-4,4'-desmetilgrandisina sintética.

4.8 - Dimerização enzimática do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

A incubação do extrato enzimático das folhas de *P. solmsianum* com o álcool sinapílico forneceu um produto majoritário que foi identificado por RMN de ^1H como a lignana furofurânica siringaresinol **41** (figura 63). A evidência de que as enzimas extraídas das folhas da planta convertem o álcool sinapílico quase totalmente em **41** faz crer que a maior parte das peroxidases extraídas são inespecíficas para este substrato e levam ao esqueleto furofurânico.

Figura 63 – Estrutura do siringaresinol **41**.

Os dados de RMN de ^1H relativos a **41** estão listados na tabela 8 e o espectro pode ser observado na página figura 64.

Alguns sinais de baixa intensidade no espectro são compatíveis com a conversão do álcool sinapílico ao *E*-5-metóxi-isoeugenol na incubação.

Figura 64 – Espectro de RMN de ^1H de 41 obtido em CDCl_3

Tabela 8 – Deslocamentos químicos de ^1H de **41**

Hidrogênio	δ (ppm), multiplicidades, J (Hz)
H-2	6,58, s, 1H
H-6	6,58, s, 1H
H-7	4,29, dd, 1H, 7,2 Hz e 3,1 Hz
H-8	3,10, m, 1H
H-9	4,73, d, 1H, 4,2 Hz
H-2'	6,58, s, 1H
H-6'	6,58, s, 1H
H-7'	4,29, dd, 1H, 7,2 Hz e 3,1 Hz
H-8'	3,10, m, 1H
H-9'	4,73, d, 1H, 4,2 Hz

A dosagem de proteínas totais das frações enzimáticas foi feita para todos os ensaios realizados. A quantidade de proteínas utilizada no ensaio foi de 82,4 mg/mL de extrato.

Por meio da análise do esquema 6, propõe-se que o precursor da (-)-grandisina seja o *E*-5-metóxi-isoeugenol, que sofre dimerização estereoespecífica e enantiosseletiva para formar a di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina e, posteriormente, grandisina. A sugestão de que a forma *E* do 5-metóxi-isoeugenol é a preferida para a formação da (-)-grandisina vem da observação de que os fenilpropanóides encontrados em *P. solmsianum* possuem todos uma estereoquímica *E* em relação à cadeia propenílica. Além disso, a dimerização química deste composto produz compostos lignóides cujo anel tetraidrofurânico apresenta a mesma configuração que as lignanas naturais isoladas desta espécie (Martins *et al*, 2001). A dimerização química do isômero *Z* leva à formação de lignanas com quatro outros tipos de

configuração para os substituintes do anel tetraidrofurânico, nenhum dos quais encontrado em quantidade significativa nos tecidos da planta.

Até recentemente, acreditava-se que as lignanas, de um modo geral, eram derivadas unicamente do acoplamento oxidativo do álcool coniferílico, formando o (+) ou o (-)-pinoresinol. Estudos biossintéticos conseguiram, inclusive, demonstrar que o pinoresinol poderia sofrer posteriores oxidações, metilações e reduções para produzir as lignanas (+)-eudesmina extraída de *Magnolia kobus* (Miyauchi, 1998), assim como (-)-secoisolariciresinol e (+)-lariciresinol em espécies de *Forsythia* (Katayama *et al*, 1992, Katayama *et al*, 1993, Dinkova-Kostova *et al*, 1996; Davin *et al*, 1997). Outros trabalhos envolveram a biossíntese de lignanas do gergelim, onde foi estabelecido que lignanas contendo o grupamento metilenodioxílico como o (+)-piperitol, a (+)-sesamina e (+)-sesamolina são biossintetizadas a partir do (+)-pinoresinol (Kato *et al*, 1998; Jiao *et al*, 1998).

No entanto, não apenas o álcool coniferílico é o precursor direto das lignanas do tipo 8-8', mas também ácidos cinâmicos substituídos o são (Frias *et al*, 1991).

A primeira comprovação de que um propenilfenol está diretamente envolvido na biossíntese de neolignanas foi demonstrado na biossíntese do (+)-conocarpano **43** em *P. regnellii* (Sartorelli *et al.*, 2001). Neste estudo verificou-se a conversão do *p*-hidroxipropenilbenzeno (*E*-isoanol) **42** em **43** com 70% de excesso enantiomérico (figura 65). A enzima capaz de mediar tal acoplamento foi encontrada na fração proteica extraída das membranas celulares das folhas de *P. regnellii*. A hipótese de Gottlieb (1972) acerca da formação de neolignanas como sendo produtos do acoplamento oxidativo de monolignóis não-oxigenados nas posições 9 e 9' foi corroborada e o raciocínio foi extendido para a biossíntese da (-)-grandisina, que é formada enantiosseletivamente a partir do fenilpropanóide *E*-5-metóxi-iseugenol.

Figura 65 – Formação do (+)-conocarpano a partir do *E*-isoanil

Outra proposta (figura 66), que implicaria em maior número de etapas para formação da (-)-grandisina seria a formação de um dímero a partir do acoplamento oxidativo do tipo 8-8' do álcool coniferílico, como o observado para a formação do pinoresinol, e redução dos carbonos carbinólicos C-9 a metilas por ação de redutases específicas, que poderiam levar tanto a grandisina quanto aos seus diferentes diastereoisômeros. Como o álcool coniferílico é substituído por OH na posição 4 e MeO na posição 3, haveria a possibilidade de metilação da hidroxila, além de hidroxilação e posterior metilação (ou concomitante com a da hidroxila-4) da posição 5 de ambos anéis aromáticos da grandisina. O aumento do número de etapas que levaria ao produto final implica em um número maior de enzimas envolvidas no processo. Ainda existe discordância no meio científico sobre a relação entre o número de enzimas utilizadas para a biossíntese de um dado produto final encontrado na natureza e a escala evolutiva. No entanto, é plausível acreditar que a natureza tende a utilizar menor número de etapas e, conseqüentemente, de enzimas para obter um produto estruturalmente simples, como é o caso das lignanas, e mais especificamente, das tetraidrofurânicas.

Figura 66 – Outras possíveis rotas de formação a partir do álcool coniferílico para a (-)-grandisina

Uma proposta semelhante (figura 67) sugere o álcool sinapílico sofrendo o acoplamento oxidativo e posterior redução das hidroxilas em C-9 e metilação da posição 4, 4' dos anéis aromáticos.

Figura 67 – Proposta de formação da (-)-grandisina a partir do álcool sinapílico.

A administração de fenilalanina [$U-^{14}C$] foi utilizado como experimento preliminar para verificar incorporação de radioatividade nas lignanas extraídas das folhas de *P. solmsianum* (i.e, (-)-grandisina e lignana **23**). Os resultados demonstraram que a (-)-grandisina e a lignana **23** incorporam radioatividade e, assim, são originárias do metabolismo fenilpropanoídico, que utiliza este aminoácido como precursor. Análises prévias já haviam demonstrado que existe uma atividade específica da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) nos tecidos de planta adulta dez vezes maior que em tecidos de plântula nesta espécie vegetal, demonstrando que existe fenilalanina sendo convertida a ácido cinâmico, que passa por todas as transformações subsequentes para dar origem aos fenilpropanóides e lignanas tetraidrofurânicas.

O experimento de administração de fenilalanina [$U-^{14}C$] também demonstrou que o metabolismo de formação das lignanas tetraidrofurânicas é lento (figura 68). Somente 48 horas após a absorção da solução radioativa é que foi observada incorporação de radiação na (-)-grandisina e em **23**, atingindo um máximo de incorporação de radioatividade entre 48 e 72 horas (0,02%) e decrescendo após 96 horas para a (-)-grandisina e 72 horas para **23**. A maior parte da radiação absorvida é encontrada em picos que aparecem no início do cromatograma de CLAE em fase reversa dos extratos (figuras 69 e 70). Pressupõe-se que estes compostos de polaridade acentuada sejam ácidos, aldeídos e álcoois presentes nos estágios preliminares do metabolismo (esquema 2, p. 11), ou mesmo fenilalanina que não foi metabolizada. Como os metabólitos secundários encontrados em *P. solmsianum* são extremamente oxigenados, é razoável propor a presença de catecóis ou compostos tri-hidroxilados na estrutura destes álcoois, aldeídos e ácidos, aumentando consideravelmente a sua polaridade. A sugestão se torna plausível pelo fato de que se desconhece a verdadeira sequência de substituições por que passam as porções aromáticas antes do acoplamento oxidativo.

Figura 68 – Análise do experimento de incorporação de fenilalanina [U-¹⁴C] em *P. solmsianum*

Figura 69 – Radiocromatograma em fase reversa do extrato de folhas de *P. solmsianum* obtido 24 horas após a administração de fenilalanina [$U-^{14}C$].

Figura 70 - Radiocromatograma em fase reversa do extrato de folhas de *P. solmsianum* obtido 48 horas após a administração de fenilalanina [$U-^{14}C$].

Benevides (1996) realizou um estudo similar de incorporação de fenilalanina [$U-^{14}C$] em *Piper regnellii* e observou que as lignanas desta espécie incorporam radiação apenas 90 minutos após total absorção da solução radioativa (Benevides, 1996, Sartorelli *et al*, 2001). Em contrapartida, estudos feitos com cascas de *Sesamun indicum* mostraram incorporação de fenilalanina [$U-^{14}C$] em sesamina e sesamolina 48 horas após administração do aminoácido marcado (Kato *et al*, 1998). Em pteridófitas, estudos biossintéticos mostraram incorporação de fenilalanina marcada com ^{13}C nas posições 1,2 e 3 nos ácidos blécnicos encontrados em *Blechnum spicant* 5 dias após a administração da solução (Wang, 2001).

A etapa seguinte do trabalho consistiu na demonstração da conversão enzimática do *E*-5-metóxi-iseoeugenol ^{14}C (0,068 $\mu Ci/mg$) em di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina. Por desconhecimento da localização exata desta enzima, nos tecidos de *P. solmsianum* foram obtidos extratos contendo as proteínas solúveis ligadas à membrana plasmática das células, as proteínas ligadas ao sistema citocromo P-450 encontrado nos microsossomos celulares e as proteínas ligadas às paredes celulares. Estas preparações poderiam conter a enzima capaz de catalisar o acoplamento oxidativo específico quando incubadas com o precursor *E*-5-metóxi-iseoeugenol.

Neste experimento, o substrato radioativo foi incubado com as diversas preparações na presença ou ausência de co-fatores e o produto foi analisado por CLAE em fase reversa acoplado a um cintilador de fluxo. Uma vez que o produto esperado da reação (di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina) foi adicionada como carreador durante a extração da mistura reacional, a presença de radioatividade no pico relativo a este composto, que elui aos 15 minutos nas condições pré-estabelecidas, indicou a formação do mesmo.

Os cromatogramas relativos aos controles mostraram que o substrato não sofre auto-dimerização ou dimerização na ausência de enzimas e co-fatores que conduziriam a produtos de acoplamento 8-8'. Não se observa a presença de di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina nos extratos enzimáticos de *P. solmsianum*, sugerindo que esta lignana não poderia ter sido extraída da folha juntamente com o extrato enzimático. A

análise fitoquímica já havia revelado ausência de di-O-4,4'-desmetilgrandisina nas folhas da planta.

Dentre as proteínas solúveis obtidas após extração com tampão a pH 7 enquadram-se diversas peroxidases e oxidases capazes de catalisar acoplamentos oxidativos de monolignóis (Davin, 1992). Estas proteínas são facilmente liberadas pela ruptura das membranas durante o processo de pulverização do tecido e solubilizam-se no tampão de extração. O primeiro registro de biossíntese de lignanas, demonstrando conversão do álcool coniferílico a (-)-pinoresinol por meio da ação da chamada "proteína-dirigente", mostrou que a mesma se encontrava entre proteínas solúveis extraídas das folhas de *Forsythia intermedia* (Katayama, 1992), assim como a formação de (-)-secoisolariciresinol a partir do álcool coniferílico por enzimas presentes em *Forsythia koreana* (Umezawa *et al*, 1994). No entanto, é necessário observar que peroxidases não específicas podem também estar presentes nos extratos enzimáticos e também podem mediar o acoplamento oxidativo, sem que a reação obedeça a um controle enantiosseletivo. Em *P. solmsianum*, verifica-se que existe um certo impedimento estérico causado pelas metoxilas nas posições 3 e 5 do anel aromático dos monolignóis, o que dificulta, por exemplo, a aproximação espacial dos radicais para promover acoplamentos do tipo 8-5' ou mesmo 8-O-4'. Assim, peroxidases não-específicas presentes entre as proteínas solúveis de *P. solmsianum* poderiam favorecer o acoplamento do tipo 8-8' do propenilfenol levando à produção tetraidrofuranos substituídos com diversas configurações e misturas racêmicas dos compostos obtidos, como é observado na reação do 5-metóxi-isoeugenol com uma peroxidase inespecífica (i.e., de raiz forte). No entanto, não houve dimerização do substrato quando estas proteínas foram utilizadas. O radiocromatograma do produto desta incubação pode ser visto na figura 72, assim como os cromatogramas relativo ao substrato (figura 71).

Figura 71- Cromatograma líquido em fase reversa do substrato *E*-5-metóxi-
isoeugenol.

Figura 72 – Radiocromatograma do produto de incubação do *E*-5-metóxi-
isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] com proteínas solúveis extraídas de *P. solmsianum*.

A preparação enzimática extraída dos microsossomos celulares converteu o *E*-5-metóxi-isoeugenol em (-)-di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina em presença de H₂O₂ e NADPH, segundo análise do produto de reação por CLAE em fase reversa e fase quiral (figuras 73 e 74). De acordo com a leitura de radioatividade foram incorporados 1,2 % da radiação do substrato no pico da (-)-di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina, que foi coletado e analisado por CLAE em fase quiral. Os resultados mostraram que o enantiômero (-) havia sido preferencialmente formado (99% ee).

Figura 73 – Radiocromatograma em fase reversa do produto de incubação do *E*-5-metóxi-isoeugenol [¹⁴C₈] com preparações microsossomais extraídas de *P. solmsianum*.

Figura 74 – Radiocromatograma em fase quiral do produto de incubação do *E*-5-metóxi-isoeugenol [$^{14}\text{C}_8$] em 15 minutos com preparações microssomais extraídas de *P. solmsianum*.

O sistema citocromo P-450 caracteriza-se por ser o responsável por uma grande variedade de reações oxidativas em plantas (Donaldson, 1991). Enzimas ligadas a este sistema atuam comprovadamente nas vias biossintéticas de formação de esteróides, fenólicos e fitoalexinas (West, 1980). Dentre outras atividades, foi comprovada a participação de enzimas do citocromo P-450 na formação de pontes metilenodioxílicas em isoflavonóides e alcalóides berberínicos (Bauer, 1991, Rueffer, 1994 e Clemens, 1996). Também se verificou que muitas enzimas, em especial redutases e oxidases do citocromo P-450 são dependentes de co-fatores como NADH e NADPH. O oxidante NADPH é requerido como co-fator principal na maioria das reações de redução enzimáticas estudadas.

Por se tratarem de enzimas lábeis e facilmente degradáveis, as preparações microsossomais devem ser utilizadas imediatamente após extração ou armazenadas a -80° C, embora não por um longo período de tempo, o que vai diminuir suas atividades específicas de maneira considerável. Assim, foram utilizadas preparações frescas para incubação com o *E*-5-metóxi-isoeugenol, testando diversas combinações de co-fatores.

Em relação aos experimentos de incubação do substrato radioativo com as proteínas ligadas às paredes celulares tanto na ausência como na presença de co-fatores, não foi verificada formação de (-)-di-O-4,4'-desmetilgrandisina ou quaisquer outros produtos de acoplamento 8-8' (figura 75).

Figura 75 – Radiocromatograma do produto de incubação do *E*-5-metóxi-iseugenol [$^{14}\text{C}_8$] com proteínas ligadas a paredes celulares extraídas de *P. solmsianum*.

A demonstração de que as enzimas contidas nos microsossomos convertem o *E*-5-metóxi-isoeugenol em di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina leva à conclusão de que existe controle estereoespecífico na dimerização. Este é o primeiro relato envolvendo tanto a utilização de oxidases do sistema citocromo P-450 envolvidas na biossíntese de neolignanas, quanto a evidência de que um propenilfenol é o substrato envolvido nessa reação.

Outra observação das análises dos ensaios biossintéticos diz respeito a formação de produtos menos polares incorporando radioatividade no final da eluição e que podem ter sido formados por outros tipos de reações do substrato.

4.8.1 - Otimização da conversão do *E*-5-metóxi-isoeugenol em di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina

O experimento de cinética de reação utilizando tempos de 0,15, 20, 30, 60, 90, 120 e 160 minutos de incubação mostrou que entre 0 e 20 minutos ocorre um aumento na taxa de conversão do substrato e esta permanece praticamente constante até 160 minutos (figura 76).

Figura 76 - Gráfico da cinética de reação entre a grandisina sintase e o substrato.

O ensaio para determinação do pH ótimo para a reação revelou que a atividade específica (p. 92) da enzima (4,67 nKatal/mg de proteína) encontra-se entre 6,6 e 7,0 (figura 77).

Figura 77 – Determinação do pH ótimo para a dimerização.

A curva de saturação do substrato demonstrou que a atividade máxima da enzima (4,3 nKatal/mg de proteína) ocorre quando se utiliza 50 mM do substrato (figura 77).

Figura 78 – Curva de saturação do substrato.

Conclusão

5- Conclusões

A espécie *Piper solmsianum* notabiliza-se pelo acúmulo maciço de metabólitos secundários originários da via do ácido chiquímico, mais especificamente do metabolismo fenilpropanoídico. Estes metabólitos são fenilpropanóides (apiol, dilapiol, elemicina, *E*- isoelemicina e miristicina) e lignanas tetraidrofurânicas (grandisina e lignana 23) tri- ou tetra-oxigenados no padrão de substituição dos anéis aromáticos.

A (-)-grandisina é o constituinte majoritário (cerca de 70%) nos extratos de folhas, caule, raiz e inflorescências. No entanto, esta lignana não é encontrada em plântulas da espécie com menos de 9 meses de idade. Muitas podem ser as explicações para o fenômeno: a ausência da enzima capaz de mediar o acoplamento oxidativo entre as unidades C₆-C₃ para originar o esqueleto tetraidrofurânico, a inibição desta enzima por algum fator endógeno, a intensa atividade de *O*-metiltransferases sobre os propenilfenóis fazendo com que haja um impedimento da formação de radicais e, por consequência, da dimerização. No entanto, ainda são necessários estudos mais detalhados durante essa fase do desenvolvimento da planta para obter a explicação, ou explicações para esta observação.

A atividade específica da PAL se mostrou dez vezes maior na planta adulta do que em plântulas até 9 meses de idade. O aminoácido *L*-fenilalanina foi incorporado nos metabólitos secundários encontradas na espécie. Em relação às lignanas, observou-se incorporação de radioatividade nas lignanas após 48 horas. É um metabolismo lento, se comparado, por exemplo, ao da espécie *Piper regnellii*, da mesma família e mesmo gênero e que é capaz de incorporar fenilalanina radioativamente marcada em suas lignanas já após 6 horas da administração da solução (Sartorelli *et al*, 2001).

O estudo da biosíntese da (-)-grandisina demonstrou que o propenilfenol diretamente envolvido na biossíntese da (-)-grandisina na planta é o *E*-5-metóxi-isoeugenol (3,5-dimetóxi-4-hidróxi-propenilfenol). Este sofre acoplamento oxidativo estereosseletivo e enantioespecífico para produzir a (-)-di-*O*-4,4'-

desmetilgrandisina. Esta etapa de dimerização é promovida por uma enzima encontrada nos microsossomos celulares e que provavelmente faz parte do sistema citocromo P-450. A ação desta enzima é dependente de H_2O_2 e de NADPH. Esta probabilidade deverá ser comprovada através de testes mais específicos como inibição do sistema P-450. A (-)-di-O-4,4'-desmetilgrandisina é tida como o precursor direto da (-)-grandisina, por ação de O-metiltransferases que são capazes de metoxilar as posições 4 e 4' deste produto.

Este foi o segundo relato da dimerização de um propenilfenol para formar uma neolignana, corroborando a hipótese de Gottlieb acerca da formação desta classe de metabólitos. Porém, este é o primeiro relato da ação de um monolignol não-oxigenado na posição 9 sofrendo uma acoplamento oxidativo do tipo 8,8'. Diante destes fatos, classificamos a (-)-grandisina como uma neolignana tetraidrofurânica.

Apesar dos resultados conclusivos obtidos neste trabalho, há que se convir que, diante do campo da biossíntese de lignanas e neolignanas, apenas conseguimos vislumbrar a pequena ponta do iceberg. Muitos testes ainda deverão ser realizados, inclusive envolvendo outras etapas do metabolismo, que levarão a um mapeamento completo da seqüência metabólica utilizada pela natureza para a produção destes compostos. Neste ponto é que observamos a influência cada vez maior das ciências irmãs, como a bioquímica e a biologia molecular, prestando seu auxílio na busca do conhecimento.

Os resultados obtidos também deverão ser utilizados como testes no estudo detalhado da enzima responsável pela dimerização, o que inclui a sua purificação e a clonagem do gene responsável pela sua expressão.

Referências Bibliográficas

6 - Referências Bibliográficas

- Alécio, A.A.; Bolzani, V. da S.; Young, M.C.M.; Kato, M.J. e Furlan, M. (1997) Antifungal amides from *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* **61** (5), 637.
- Al-yahya, M. A., Muhammad, I., Mirza, H. H. e El-Ferally, F. S. (1998) Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Res.* **12** (5), 335.
- Aires, D.C e Loike, J. D (1990) "Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Lignans: Chemistry, Biological and Clinical Properties." Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Barata, L.E.S, Baker, P.M., Gottlieb, O. R. e Rúveda, E. A. (1978) Neolignans of *virola surinamensis*. *Phytochemistry* **17**, 783.
- Bauer, W. e Zenk, M. H. (1991) Two methylenedioxy bridge forming cytochrome P-450-dependent enzymes are involved in (S)-stylopine biosynthesis. *Phytochemistry* **30**, 2.953.
- Benevides, P. J. C. (1996) Estudo Químico e Biossintético de *Piper regnellii* Miquell (Piperaceae), Dissertação de Mestrado, IQ-USP, São Paulo-SP.
- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P. e Kato, M. J. (1999) Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* **52** (2), 339.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proetin-dye binding. *Anal. Biochem.* , **72**, 248.
- Braz-Filho, R. (1994) Química de Produtos Naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Química Nova* **17** (5), 405.
- Broomhead, A. J., Rahman, M. M. A., Dewick, P. M., Jackson, D. E. e Lucas, J. A. (1991) Biosynthesis of Podophyllum lignans. 5 Matairesinol as precursor of Podophyllum lignans. *Phytochemistry* **30** (5), 1.489.
- Candolle, C. (1986) Piperaceae. In. *Produmus Sistemalis Naturalis Regni Vegetali*. Vol. **16** (1), 235. Candolle, A. P. (ed), São Paulo, Brasil.

- Chang, M. N., Han, G. Q., Arison, B. H., Springer, J. P., Hwang, S. B. e Shen, T. Y. (1985) Neolignans from *Piper futokadsura*. *Phytochemistry* **24**, 2.079.
- Chu, A., Dinkova-Kostova, A. T., Davin, L. B., Bedgar, D. L. e Lewis, N. G. (1993) Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.* **268** (36), 27.026.
- Clemens, S. e Barz, W. (1996) Cytochrome P-450-dependent methylenedioxy bridge formation in *Cicer arietinum*. *Phytochemistry* **41**, 457.
- Costantin, M. B. (2001) Metabolismo secundário em tecidos diferenciados e suspensões celulares de *Piper cernuum* Vell. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP-São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Cronquist, H. (1981) *An Integrated System of Classification of Flowering Plants* ; New York, Columbia University Press, EUA .
- Davin, L. B., Bedgar, D. L., Katayama, T. e Lewis, N. G. (1992) On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa*. *Phytochemistry* **31**, 3.869.
- Davin, L. B., Wang, W. B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Sarkanen, S. e Lewis, N. G. (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362.
- Dinkova-Kostova, A. T., Gang, D. R., Davin, L. B., Bedgar, D. L., Chu, A. e Lewis, N. G. (1996) (+)-pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*: protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase. *J. Biol. Chem.* **271**, 29.473.
- Donaldson, R. P. e Leister, D. G. (1990) Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* **96**, 669.
- Enriquez, R. G., Chavez, M. A. e Jauregui, F. (1980) Propenylbenzenes in *Guatteria gaumeri*. *Phytochemistry* **19**, 2.024.
- Evans, P. H., Bowers, W. S., Funk, E. J. e Evangeline, J. (1984) Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). *J. Agric. And Food Chem.* **32**, 1.254.
- Ferri, P. H. e Barata, L. E. S. (1978) (-)-di-de-O-methylgrandisin, a lignan from *Virola pavonis* leaves. *Phytochemistry* **30** (12), 4.204.

- Frias, I, Siverio, J. M., Gonzalez, C., Trujillo, J. M. e Perez, J. A . (1991) Purification of a new peroxidase catalysing the formation of lignan-type compounds. *Biochemical Journal* **274**, 109.
- Gang, D. R., Costa, M. A ., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A . T., Wang, H. B., Burlat, V., Martin, W. e Sarkanen, S. (1999) Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem. and Biology* **6** (3), 143.
- Gottlieb, O.R., Borin, M.R. de M.B. e Kaplan, M.A.C. (1995) Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. *Phytochemistry* **40** (1), 99.
- Gottlieb, O. R. (1978) Neolignans. In Herz, W., Grisebach, H., e Kirbi, Q. W. (eds.). *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **35**, 1.
- Gottlieb, O. R. (1974) Lignans and neolignans. *Rev. Latinoam. Química* **5**, 1.
- Gottlieb, O. R. (1972) Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* **11**, 375.
- Hammond, D. G. e Kubo, I. (1999) Structure-relationships of alkanols as mosquitos larvicides with novel findings regarding their mode of action. *Bioorgan. Med. Chem.* **7**: (2), 271.
- Hansen Jr., D. W. e Pilipauskas, D. (1985) Chemoselective N-ethylation of Boc-aminoacids without racemization". *J. Org. Chem.* **50**, 945.
- Holloway, D. e Scheinman, F. (1974) Extractives from *Litsea* species. 2. 2 Lignans from *Litsea grandis* and *Litsea gracilipes*. *Phytochemistry* **13**, 1.233.
- Jackson, D. E. e Dewick, P. (1984) Biosynthesis of *Podophyllum* lignans-I Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* **23** (4), 1.073.
- Jackson, D. E. e Dewick, P. (1984^a) Tumour-inhibitory aryltetralin lignans from *Podophyllum pleianum*. *Phytochemistry* **24**, 1.029.
- Jackson, D. E. e Dewick, P. (1984^b) Biosynthesis of podophyllum lignans.2. Interconversions of aryltetralin lignans. *Phytochemistry* **24**, 1.037.
- Jarowicki, K. e Kocienski, P. (2001) Protecting groups. *J. Chem. Soc., Perkin-Trans* **1**, 2.109.

- Jensen, S., Hansen, J. e Boll, P. M. (1993) Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry* **33**, 523.
- Jiao, Y., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1998) Furofuran lignans metabolism as a function of seed maturation in *Sesamuin indicum*: methylenedioxy bridge formation. *Phytochemistry* **49**, 387.
- Joly, A.B. (1985) *Introdução à Taxonomia Vegetal*, Ed. Nacional, São Paulo -SP, Brasil.
- Jones, H. D. (1984) Phenylalanine ammonialiase: regulation of its induction and role in plant development. *Phytochemistry* **23** (7), 1.349.
- Kaitia, S., Matikainen, J. e Hax, T. (1991) The *E-Z* photoisomerization of homoactivated carbon-carbon double bonds. *Synth. Comm.* **21** (12-13), 1.397.
- Kamil, W. M. e Dewick, P. M. (1986^a) Biosynthesis of Podophyllum lignans. 3. Biosynthesis of the lignans alpha-peltatin and beta-peltatin. *Phytochemistry* **25** (9), 2.089.
- Kamil, W. M. e Dewick, P. M. (1986^b) Biosynthesis of Podophyllum lignans. 4. Biosynthetic relationship of aryltetralin lactone lignans to dibenzylbutyrolactone lignans. *Phytochemistry* **25** (9), 2.093.
- Katayama, T. e Ogaki, A. (2001) Biosynthesis of (+)-syringaresinol in *Liriodendrum tulipifera*. I: Feeding experiments with L-[U-¹⁴C]-phenylalanine and [⁸C₁₄]-sinapyl alcohol. *J. Wood Science* **47** (1), 41.
- Katayama, T., Masaoka, T. e Yamada, H. (1997) Biosynthesis and stereochemistry of lignans in *Zanthoxylum ailanthoides*. 1. (+)-lariciresinol formation by enzymatic reduction of (+/-)-pinoresinols. *Mokuzai Gakkaishi* **43** (7), 580.
- Katayama, T., Davin, L.B., Chu, A. e Lewis, N.G. (1993) Novel benzylic reductions in lignan biogenesis in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **33** (2), 581.
- Katayama, T., Davin, L.B. e Lewis, N.G. (1992a) On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* **31** (11), 3.869.
- Katayama, T., Davin, L.B. e Lewis, N.G. (1992b) An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: Evidence for enantioespecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry* **31** (11), 3.875.

- Kato, M. J., Chu, A., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1998) Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamun indicum* seeds. *Phytochemistry* **47**, 583.
- Kawai, S., Sugishita, K. e Ohashi, H. (1999) 4-O-demethylatein from the branch wood of *Thuja occidentalis*. *Phytochemistry* **51** (2), 243.
- Kitagawa, S., Nishibe, S., Benecke, R. e Thieme, H. (1988) Phenolic compounds from *Forsythia leaves*. *Chem. Pharm Bull.*, **36**, 3.667.
- Kwon, M., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (2001) *In situ* hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: implications for heartwood formation. *Phytochemistry* **57** (6), 899.
- Lewis, N.G. e Davin, L. B. (1994) in "Isopentenoids and other natural products: Evolution and Function" , Ed. W.D Nes, ACS Symposium Series, Washington D.C., **562**, 202.
- Lewis, N.G., Kato, M.J., Lopes, N. e Davin, L. B. (1995) in "Chemistry of the Amazon. Biodiversity, Natural Products and Environmental Issues", eds P. R. Seidl, O. R. Gottlieb e M.A.C. Kaplan, ACS Symposium Series, Washington D.C., **588**, 135.
- Lewis, N. G. e Davin, L. B. (1999) Lignans: Biosynthesis and Function. In "Comprehensive Natural Products Chemistry", vol. **1**, Barton, Sir, D. H. R. e Nakanishi, K. (eds), Academic Press Inc., EUA.
- Lopes, N.P., Chicaro, P., Kato, M.J., Albuquerque, S. e Yoshida, M. (1998) Phenylpropanoids and Lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica*, **64**, 667.
- Ludley, F. H. e Ralph, J. (1996) Improved preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2.942.
- Mann, J. H. (1994) Chemical Aspects of Biosynthesis, Oxford Press Inc., Oxford, Inglaterra.
- Marchand, P. A ., Zajicek, J. e Lewis, N. G. (1997) Oxygen insertion in *Sesamun indicum* furanofuran lignans. Diastereoselective synthesis of enzyme substrate analogues. *Can. J. Chem.* **75** (6), 840.
- Martins, R. C. C., Latorre, L., Sartorelli, P. e Kato, M. J. (2001) Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **55**, 843.

- Miyauchi, T. e Osawa, S. (1998) Formation of (+)-eudesmin in *Magnolia kobus* DC. var. *Borealis* sarg. *Phytochemistry* **47**, 665.
- Montanari, C. A. e Bolzani, V. D. (2001) Drug design based on natural products. *Quím. Nova* **24** (1), 105.
- Moreira, D.L., Guimarães, E. F. e Kaplan, M. A. C. (1998) A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **48** (6), 1.075.
- Moreira, D.L., Guimarães, E. F. e Kaplan, M.A.C. (1995) Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C. Dc. (Piperaceae). *Rev. Bras. Farm.* **76** (4), 106.
- Nabeta, K., Nakahara, K., Yonekubo, J., Okuyama, H. e Sasaya, T. (1991) Lignan biosynthesis in *Larix leptolepis* callus. *Phytochemistry* **30** (11), 3.591.
- Neish, A. C. (1965) *Plant Biochemistry*. Bonner, J. e Varner, J. E. (eds), Academic Press, New York, EUA.
- Okunishi, T., Umezawa, T. e Shimada, M. (2001) Isolation and enzymatic formation of lignans of *Daphne genkwa* and *Daphne odora*. *J. Wood Science* **47** (5), 383.
- Okunishi, T., Umezawa, T. e Shimada, M. (2000) Enantiomeric composition and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans. *J. Wood Science* **46** (3), 234.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T. e Sticher, O. (1993) 2 chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **34** (3), 813.
- Osawa, S., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1993) Formation of (-)-arctigenin in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **32** (3), 643.
- Parmar, S.V., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R.; Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. e Boll, P.M. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**(4), 597.
- Parmesan, C. (2000) Unexpected density-dependent effects of herbivory in a wild population of the annual *Collinsia torreyi*. *J. Ecol.* **88**: (3), 392.
- Rahman, M. M. A., Dewick, P. M., Jackson, D. E. e Lucas, J. A. (1990) Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **29**: (6), 1.841.
- Rueffer, M. e Zenk, M. H. (1994) Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell cultures catalyses the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthases. *Phytochemistry* **36**, 1.219.

- Russell, M. G. e Warren, S. (1998) Wittig reactions in water. Synthesis of new water soluble phosphonium salts and their reaction with substituted benzaldehydes. *Tetrahedron Letters* **39**, 7.995.
- Santos, B. V.D., da-Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. D. e Gray, A. L. (1998) Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry* **49**: (5), 1.381.
- Sarkanen, K. V. e Walis, A. F. (1973) Oxidative dimerizations of (*E*)- and (*Z*)-2,6- isoeugenol (2-methoxy-4-propenylphenol) and (*E*)- and (*Z*)- 2,6-dimethoxy-4-propenylphenol. *J. C. S. Perkin I* , 1.869.
- Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. (1972) em *Lignins: Ocurrence, Formation, Structure and Reactions.*, eds. K.V. Sarkanen e C.H. Ludwig, Willey-Interscience, New York, EUA.
- Sartorelli, P., Benevides, P. J. C., Ellensohn, R. M., Grazini, M.V., Moreno, P. R. H. e Kato, M. J. (2001) Enantioselective conversion of *p*-hidroxypropenilbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Science* **161**, 1.083.
- Sartorelli, P. (2000) Biossíntese de neolignanas benzofurânicas em *Piper regnellii* (Piperaceae). Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP-São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Sartorelli, P., Young, M. C. M. e Kato, M. J. (1998) Antifungal lignans from arils of *Virola oleifera*. *Phytochemistry* **47**, 1.003.
- Saeed, S. A., Farnaz, S., Simjee, R. U. e Malik, A. (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 462.
- Singer, M. C. (2000) Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: "preference", "acceptability" and "electivity". *Ecol. Lett.* **3**: (3), 159.
- Shaw, C. H. (ed.) (1988) Plant molecular biology: a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington, EUA.
- Singh, Y. (1992) Kava: an overview. *Journal of Ethnopharmacology* **37**, 13.
- Skoog, D. A., Höller, F. J. e Nieman, T. A. (1998) Introdução. In *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, New York - USA.
- Shen, T. Y., Hwang, S. B., Chang, M. N., Doebber, T. W., Lam, M. H. T., Wu, M. S., Wang, X., Han, G. e Li, R. (1985) *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **82**, 672.

- Stöckigt, J. e Klischies, M. (1977) Biosynthesis of lignans.1. Biosynthesis of arctiin (3) and phyllirin (5). *Holzforschung* **31** (2), 41.
- Swan, E. P., Jiang, K. S. e Gardner, J. A. F. (1969) The lignans of *Thuja plicata* and the sapwood-heartwood transformation. *Phytochemistry* **8**, 345.
- Tazaki, H., Hayashida, T., Ishikawa, F., Taguchi, D., Takasawa, T. e Nabeta, K. (1999) Lignan biosynthesis in liverworts *Jamesoniella autumnalis* and *Lophocolea heterophylla*. *Tetrahedron Letters* **40** (1), 101.
- Umezawa, T., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1990) Formation of the lignan (-)-secoisolariciresinol by cell-free extracts of *Forsythia intermedia*. *Biochem. Biophysisical Res. Comun.* **171**, 1.008.
- Umezawa, T., Davin, L. B., Yamamoto, E., Kingston, D. G. I. e Lewis, N. G. (1991) Lignan biosynthesis in *Forsythia species*. *J. Chem. Soc. Chem. Comun.*, 1.405.
- Umezawa, T. (1996) Biological activity and biosynthesis of lignans. *Mokuzai Gakkaishi* **42** (10), 911.
- Umezawa, T., Kuroda, H., Isohata, T., Higuchi, T. e Shimada, M. (1994) Enantioselective lignan biosynthesis by cell-free extracts of *Forsythia koreana*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58** (2), 230.
- Umezawa, T., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1992) Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* **266**, 10.210.
- Wang, C. Z., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (2001) Stereoselective coupling in *Blechnum spicant*: formation of 8-2' linked (-)-*cis*-blechnic, (-)-*trans*-blechnic acid and (-)-brainic acid. *Chem. Commun.* 113.
- West, C. A. (1980) *Biochemistry of Plants*, v.2, Davies, D. D. (ed.), Academic Press, New York, USA, 317.
- Taylor, D. W. e Hickey, L. J. (1992) Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiospermae. *Plant Syst. evol.* **180**, 177.
- Xia, Z. Q., Costa, M. A ., Proctor, J., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (2000) Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* **55** (6), 537.

Zhuang, L. G., Seligmann, O., Jurcic, K. e Wagner, H. (1982) Constituents of *Daphne tangutica*. *Planta Medica*, **45**, 172.