UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ECOLOGIA QUÍMICA DE INSETOS E ESPÉCIES DE
PIPERACEAE

Clécio Souza Ramos

Tese de Doutorado

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Orientador

SÃO PAULO
17 de agosto de 2006

“Do que vale o homem ganhar o mundo inteiro e perder sua alma”.

Mateus, 70 DC

Dedicatórias

Dedico esta tese aos meus pais, Élson A. Ramos e Helena V. Souza pelo sublime modo que me educaste: na pureza, na bondade e na dignidade, procurando sempre com zelo a justiça, até mesmo em situações que levam ao desconforto e sofrimento.

A minha querida e amada esposa Silvana, exemplo de mulher honrosa, que desde o princípio esteve comigo, como ajudadora e conselheira. No momento mais crítico da tese e da minha vida, me apoiou com todo amor e paciência.

A minha pérola preciosa, meu filho Luan.

A minha irmã Elsilene pelo carinho, cuidado e sustento durante a minha caminhada estudantil. Ao meu irmão Joelson pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Ao prof. Massuo Jorge Kato, um grande amigo e companheiro, pela paciência, confiança depositada, formação profissional e de caráter. Pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Aos colaboradores:

Prof. Dr. Sérgio A. Vanin (IB-USP) pela valiosa contribuição na parte entomológica;

Prof^a. Dra. Elsie Guimarães (Jd. Botânico, RJ) pela classificação das plantas;

Prof^a. Dra. Arlene Gorrêa (UFSCar) e a Dra. Marisi Soares (USP) pela contribuição nos experimentos de EAG e EAD;

Prof. Dr. Harrold V. Linnert (IQ-USP) pelos cálculos realizados no capítulo seis;

Adalberto (USP) na contribuição e ajuda em laboratório.

Aos amigos e colegas de trabalho pelo convívio e ajuda: Adalberto, Dra. Lydia, Diego, Prof. Dr. João Lago, Prof. Dr. Roberto Martins, Antônio, Karina, Hiléia, Alberto, João Homero, Ana, Prof. Dr. Massayoshi, Dra. Mariko, Joaquim, Lucas, Tatiana, Seu Zé, Dra. Marisi, Renata, Elba, Luiz, Thiago, Felipe, Juliana, Denise, Claudinei, Prof. Dr. Paulo Moreno, Marcos, Sérgio, Ana Paula, Ingrid, Sabrina e Ednardo.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade e condições de trabalho oferecidas durante o doutorado.

Aos amigos e funcionários da Central Analítica do Instituto de Química.

A FAPESP pelas bolsas de Mestrado e Doutorado concedidas.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradecimentos

Toda honra e glória seja dada ao Deus criador pelo primor e diversidade na criação do Céu e da Terra, que possibilita a realização de trabalhos como este.

Ao meu tio Evaldo e família pela estada de seis meses na minha chegada a São Paulo.

A família Mota pelo carinho, hospitalidade e cuidado: Mota (*in memória*), Carmem, Demes e Dyeny.

Aos amigos e irmãos em Cristo das Igrejas Batista de Viçosa (MG), Batista do Boa Vista (SP) e Batista do Butantan (SP).

Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae

Resumo

O estudo foi dividido em capítulos que incluíram diversos aspectos da ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae como se seguem:

O Capítulo 1 descreve as informações taxonômicas, a história natural dos insetos, as observações de campo e a organização das espécies hospedeiras de Piperaceae segundo as preferências alimentares dos insetos. Observou-se forte especificidade química de espécies de Coleoptera (*Naupactus bipes*) e Homoptera (*Membracis foliata*, *Callocanophora* sp., e *Aethalium reticulatum*) por *Piper aduncum*, *P. gaudichaudianum*, *P. arboreum* e *P. hispidum* que possuem ácidos benzóicos prenilados como produtos predominantes. As Lepidoptera (*Quadrus u-lucida*, *Heraclydes brasiliensis* e *H. helicorides*) constituíram-se num segundo grupo de insetos para o qual constatou-se forte especificidade. Nesse caso as espécies de Piperaceae, *P. regnellii* e *P. solmsianum*, são nitidamente acumuladores de neolignanas e/ou lignanas.

Os Capítulos 2 e 3 (coleópteros - besouros e lepidópteros - borboletas, respectivamente) descrevem os resultados relacionados aos estudos das reações que ocorreram durante o processo de digestão de folhas de espécies de *Piper*, seqüestros de metabólitos secundários pelos insetos. O estudo de possíveis fatores atrativos presentes em óleos essenciais foram investigados mediante o uso de ensaios eletrofisiológicos. Foram observadas reações de desmetilações em lignanas tetraidrofurânicas, esterificação de ácidos benzóicos, hidrólise de amidas, reação do tipo ozonólise de lignanas, neolignanas e fenilpropanóides durante o processo digestivo das borboletas (larvas) e dos besouros adultos. Foram observados seqüestros de neolignanas das folhas e raízes de *P. regnellii* pelas larvas da borboleta *Heraclydes hectorides* e ácidos benzóicos prenilados das raízes de *P. gaudichaudianum* pelas larvas do besouro *Naupactus bipes*. Os experimentos de EAG com antenas do besouro *N. bipes* indicou que os óleos de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. hispidum* foram ativos, e tal comportamento foi confirmado por observações em campo, sendo que as respostas mais intensas foram observadas para as fêmeas em relação às respostas para os machos. A análise de GC/EM-EAD permitiu a determinação dos compostos bioativos como os monoterpenos α -pineno, β -pineno e β -mirceno.

O Capítulo 4 descreve as espécies de homópteros que têm especificidade por *P. gaudichaudianum*, *P. arboreum* e *P. aduncum* que são acumuladoras de ácidos benzóicos

prenilados. Outros possíveis fatores determinantes para tal especificidade foram atribuídos ao baixo teor de metabólitos secundários nas seivas, alto teor de micronutrientes, baixo teor de macronutrientes, ausência de lignanas ou neolignanas nas seivas, lignificação com predominância de resíduo siringila (S).

O Capítulo 5 descreve a determinação e caracterização estrutural dos 49 metabólitos secundários envolvidos neste estudo.

O Capítulo 6 descreve o estudo da estabilidade de lignanas tetraidrofurânicas realizado em função da rara ocorrência na natureza de isômeros com a configuração toda *cis*. O estudo da estabilidade para os dez possíveis estereoisômeros para a lignana tetraidrofurânica através do cálculo do funcional de densidade, B3LYP, com a base 6-316(dp) mostrou que a configuração toda *cis* é de fato menos estável do que a toda *trans*.

Chemical ecology of insect and Piperaceae species

Abstract

The study was presented in six chapters that included several aspects of chemical ecology of insects and Piperaceae species as following:

The Chapter 1 describes taxonomical aspects, natural history of the insects and field observation and the organization of hosts Piperaceae according to the observed feeding preferences of the associated insects. It was observed strong chemical specificity of Coleoptera and Homoptera species by *Piper aduncum*, *P. gaudichaudianum*, *P. arboreum* and *P. hispidum* which contain prenylated benzoic acids. The Lepidoptera showed preference for species containing neolignanas and/or lignanas such *P. regnellii* and *P. solmsianum*.

The Chapters 2 and 3 (coleopterous - beetles and lepdopterous – butterflies, respectively), were addressed for the studies of biotransformation reactions, sequestration and attractive assays. The study of possible factors present attractions in essential oils was investigated by the use of electrophysiological essays. It were observed several reactions as esterification, hydrolyses and ozonolyse-type for lignans, neolignans, phenylpropanoids and amides occurring in from species of Piperaceae during the digestive process of the butterflies and of beetles. It was observed sequestration of neolignans of *P. regnellii* by larvae of *Heraclides hectorides* and prenylated of benzoic acids from roots of *P. gaudichaudianum* by the larva of the beetle *Naupactus bipes*. The experiments of EAG using antennas of the beetle *N. bipes* showed that the oils of *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* and *P. hispidum* were active and such results were in agreement with field observations and the most intense response was observed for the females in relation to the response for the males. The analyses of GC/EM-EAD allowed the determination of the bio-actives compounds as the monoterpenes α -pinene, β -pinene and β -mircene.

The Chapter 4 describes the homopterous species that have specificity for the *P. gaudichaudianum*, *P. arboreum* and *P. aduncum* accumulative of prenylated benzoic acids. Further determinant factors for specificity included: low percentage of secondary metabolites in saps, high percentage of micro-nutrients and low percentage of macro-nutrients, absence of lignans or neolignans in the saps, lignifications with predominance of siringyl residues (S) which confer a pattern related to Angiosperms.

The Chapter 5 describes the determination and structural characterization of the 49 secondary metabólitos involved in this study.

The Chapter 6 shows the study of stability versus natural occurrence of tetrahydrofuran lignans was carried out due to the rare occurrence of all-*cis* configuration. The study of the stability for the ten possible stereoisomers for the tetrahydrofuran lignans was through the calculation of the functional of density, B3LYP, with the base 6-316(dp), it showed that the all-*cis* configuration is less stable than the all-*trans* tetrahydrofuran lignans.

Abreviaturas e símbolos

δ - Deslocamento químico

t - *Tripleto*

d - *Dubleto*

s - *Singleto*

m - *multiplete*

J - Constante de acoplamento (Hz)

IV - Infravermelho

t_r - Tempo de retenção

KV - Kilo volts

P.A. - Para análise

eV - eletrons Volt

ACN - Acetonitrila

AcOEt -Acetato de etila

AcOH - Ácido acético

CG - Cromatografia a gás

CC - Cromatografia em coluna

CPC - Cromatografia planar comparativa

CPP - Cromatografia planar preparativa

CRP - Cromatografia radial preparativa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência/Espectrometria de massas

DMSO - Dimetilsulfóxido

Da - Unidade de massa atômica (Dalton)

DC – Dicroísmo Circular

EAG – Eletroantenografia

EAD – Detector eletroantenográfico

CG-EAD - Detector eletroantenográfico acoplado ao cromatógrafo a gás

IQ-USP - Instituto de Química da Universidade de São Paulo

IB-USP - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

LQPN – Laboratório de Química de Produtos Naturais

HMBC - Hetero Multiple Bond Correlation

HMQC - Heteronuclear multiple quantum coherence

NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

PVPP - Polivinilpirrolidona

EM - Espectrometria de massas

DEPT - Distortionless enhancement by polarization transfer

m/z (int. rel.) - Relação carga massa (intensidade relativa)

RMN de ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN de ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono treze

IE - Ionização por impacto de eletrons

ESI - Electrospray ionization

HECTOR - Espectroscopia de correlação heteronuclear

COSY - Espectroscopia de correlação homonuclear

TMS – Tetrametilsilano

ABPs – Ácidos benzóicos prenilados

UV - Ultravioleta

CONTEÚDO

Pág.

CAPÍTULO 1: Ecologia Química; Interações plantas e insetos

1. – Introdução.....	1
1.1 - Ecologia Química.....	1
1.1.1 - A química de defesa.....	2
1.2 – Interações químicas entre plantas-insetos.....	2
1.2.1 - Insetos.....	2
1.2.2 - Insetos e plantas.....	4
1.2.3 - Insetos e metabólitos secundários de plantas.....	4
1.3 – Interações químicas entre espécies de Piperaceae e insetos.....	5
1.3.1 – A família Piperaceae.....	5
1.3.2 - Insetos e Piperaceae	9
1.4 - Objetivo Geral.....	10
1.4.1 - Objetivos específicos.....	10
1.5 - Considerações gerais sobre as variáveis dos estudos de interações planta-insetos.....	11
1.5.1 - Observações em campo.....	11

CAPÍTULO 2: Ecologia química entre Coleoptera e espécies de Piperaceae

2.1 – Introdução.....	20
2.1.1 - Importância econômica.....	20
2.1.2 - Ecologia química entre besouros e espécies de Piperaceae.....	21
2.2 – Resultados e discussões.....	22
2.2.1 - Taxonomia dos insetos.....	22
2.2.2 - <i>Ecologia química entre Naupactus bipes e espécies de Piperaceae.....</i>	<i>25</i>
2.2.2.1 - Função ecológica dos óleos voláteis de espécies de <i>Piper</i> no comportamento do <i>N. bipes</i>	25
2.2.2.2. Respostas dos experimentos de eletroantenograma GC-EAD.....	27
2.2.2.3 - Teste de múltipla escolha alimentar em condições de laboratório.....	32
2.2.2.4 - Seqüestros e biotransformações de metabólitos secundários de espécies de	35

<i>Piper</i> por <i>N. bipes</i>	35
2.2.2.4.1 - <i>P. gaudichaudianum</i> e <i>N. bipes</i>	38
2.2.2.4.2 - <i>P. regnellii</i> e <i>N. bipes</i>	41
2.2.2.4.3 - <i>P. arboreum</i> e <i>N. bipes</i>	43
2.2.2.4.4 - <i>P. hispidum</i> e <i>P. aduncum</i>	44
2.2.2.4.5 - Espécies de <i>Piper</i> não hospedeiras.....	45
2.2.2.4.5.1 - Metabolismo das lignanas de <i>P. solmsianum</i>	
2.2.2.4.5.2 Metabolismo das amidas de <i>P. tuberculatum</i> em <i>N. bipes</i>	52
2.2.3 – Experimental.....	55
2.2.3.1 - Material geral.....	55
2.2.3.2 Equipamentos.....	56
2.2.3.3 – Local de estudo.....	58
2.2.3.4 - Material entomológico.....	
2.2.3.5 - Bioensaios Eletrofisiológicos (EAG e CG-EAD) com o besouro <i>N. bipes</i> e óleos voláteis de <i>P. gaudichaudianum</i> , <i>P. regnellii</i> e <i>P. hispidum</i>	57
2.2.3.5.1 – Eletroantenograma.....	
2.2.3.6 – Extração e análises dos óleos essenciais de <i>P. regnellii</i> , <i>P. hispidum</i> e <i>P. gaudichaudianum</i>	59
2.2.3.7 - Extração e purificação das substâncias C1-C3 e P1 das folhas e raízes de <i>P. gaudichaudianum</i>	60
2.2.3.8 - Lignanas de <i>P. solmsianum</i> e neolignanas de <i>P. regnellii</i>	61
2.2.3.9 - Extração e purificação das substâncias N5 e N7	61
2.2.3.10 - Extração e purificação da substância P2 das folhas de <i>P. arboreum</i>	61
2.2.3.11 – Extração e purificação da substância P3	61
2.2.3.12 - Extração e purificação extração das substâncias L2 , L3 , F2 e F3	62
2.2.3.13 - Extrato polar das folhas de <i>P. solmsianum</i>	
2.2.3.14 – Extração das substâncias das folhas de <i>P. solmsianum</i> ligados à parede celular.....	62
2.2.3.15 - Amidas A1-A6 de <i>P. tuberculatum</i>	63
2.2.3.16 - Extração e purificação das substâncias F4 , F5 , D1 e D2	63
2.2.3.17 - Saponificação do extrato bruto das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	63
2.2.3.18 – Análises por CLAE e CG	65
2.2.4 – Conclusões	65
2.2.4.1 – Fago-especificidade do besouro <i>N. bipes</i> por espécies de <i>Piper</i>	

2.2.4.2 – Seqüestros de metabólitos secundários de <i>P. gaudichaudianum</i> e <i>P. regnellii</i> por <i>N. bipes</i>	66
2.2.4.3 – Biotransformações de metabólitos secundários de <i>Piper</i> por <i>N. bipes</i>	67
2.2.4.3.1 – Biotransformações de lignanas e neolignanas.....	63
2.2.4.3.2 – Biotransformações de amidas.....	

CAPÍTULO 3: Especificidade química de Lepidoptera por espécies de Piperaceae que contém lignanas ou neolignanas

	68
3.1 – Introdução	68
3.1.1 – Lignanas e neolignanas.....	71
3.1.2 – Piperaceae e Lepidoptera.....	72
3.2 – Resultados	
3.2.1 - Biotransformações de lignanas e neolignanas durante o processo digestivo das lagartas.....	75
3.2.1.1 Metabolismo da lignana (-)-grandisina e do fenilpropanóide <i>E</i> -isolemicina de <i>P. solmsianum</i> em lagartas das borboletas <i>Q. u-lucida</i> e <i>H. hectorides</i>	75
3.2.1.2 - Metabolismo das lignanas epi-grandisina (L4) e (7R,8S,7'S,8'R)-3',4'-metilenedioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (L5) das folhas de uma espécie alopatrica de <i>P. solmsianum</i> em <i>H. hectorides</i>	81
3.2.1.3 - Biotransformações de neolignanas de <i>P. regnellii</i> pelas as lagartas das borboletas <i>Q. u-lucida</i> e <i>H. brasiliensis</i>	84
3.2.1.4 - Seqüestro das neolignanas N1-N4 das folhas de <i>P. regnellii</i> pela lagarta da borboleta de <i>H. brasiliensis</i>	86
3.2.1.5 - Uma exceção na adaptação de Lepidoptera em folhas de Piperaceae.....	90
3.3 – Experimental	90
3.3.1 - Material geral.....	90
3.3.2 - Material vegetal.....	90
3.3.3 - Material entomológico.....	91
3.3.4 - Análises por CLAE e CG.....	
3.3.5 - Incubação da (-)-grandisina (L1) com o fluido digestivo da lagarta <i>Q. u-lucida</i>	92
3.3.6 - Fenilpropanóides glicosilados.....	

	15
3.3.7 - Isolamento da lignana L3 do extrato fecal de <i>Q. u-lucida</i> com dieta constituída de folhas de <i>P. solmsianum</i>	92
3.3.8 - Isolamento das substâncias L2 , D2 e D6 do extrato fecal de <i>H. hectorides</i> com dieta constituída de folhas de <i>P. solmsianum</i>	92
3.3.9 - Isolamento das lignanas L4 e L5 do extrato das folhas de uma espécie alopátrica de <i>P. solmsianum</i>	93
3.3.10 – Caracterização das lignanas L6 e L7 do extrato fecal de <i>H. hectorides</i> com dieta constituída de folhas da espécie alopátrica de <i>P. solmsianum</i>	93
3.3.11 - Isolamento das lignanas N9 e N5 do extrato fecal de <i>Q. u-lucida</i> constituída de folhas de <i>P. regnellii</i>	93
3.3.12 - Extração enzimática da folhas de <i>P. solmsianum</i>	93
3.3.13 - Dessalinização do sobrenadante obtido na extração.....	94
3.3.14 - Incubação da grandisina com preparação enzimática.....	94
3.4 – Conclusões	96
3.4.1 - Especificidade química.....	96
3.4.2 - Metabolismo das lignanas e neolignanas.....	96
3.4.3 - Seqüestro.....	97

CAPÍTULO 4: Especificidade e aspectos químicos de insetos sugadores de seivas hospedeiros de Piperaceae

4.1 – Introdução	98
4.1.1 – Importância econômica.....	98
4.1.2 – Mecanismo alimentar dos sugadores de seivas.....	99
4.2 – Resultados	102
4.2.1 – Especificidade química.....	102
4.2.2 – Ocorrência de metabólitos secundários nas seivas.....	105
4.2.3 - Presença de ABPs nos tecidos dos insetos.....	109
4.2.4 - Análises de carbono (C) hidrogênio (H), nitrogênio (N), micronutrientes e macronutrientes em espécies de Piperaceae predadas por Homóptera.....	110
4.2.4.1 - Análise elementar de C, H e N.....	110
4.2.4.2 - Análises de macronutrientes e micronutrientes em espécies de Piperaceae.....	111
4.2.4.3 – Macronutrientes.....	111
4.2.4.4 – Micronutrientes.....	112

4.2.5 - Ligninas um fator determinante para o sucesso de insetos sugadores de seiva.....	113
4.2.6 - Concentração estimada de metabólitos secundários no conteúdo das seivas de <i>P. solmsianum</i> e <i>P. aduncum</i>	116
4.2.7 - Bioensaios comportamentais.....	117
4.2.7.1 – Teste de olfatometria.....	117
4.2.7.2 – <i>A. reticulatum</i> frente aos óleos essenciais das folhas de <i>P. aduncum</i> (hospedeira) e das folhas de <i>P. regnellii</i> (não hospedeira).	117
4.2.7.3 - <i>S. Armata</i> frente óleo essencial dos frutos de <i>P. cernium</i> , planta hospedeira.....	118
4.3 – Experimental	119
4.3.1 - Extração das seivas em <i>P. aduncum</i> e <i>P. solmsianum</i>	119
4.3.1.1 – Procedimento para extração das seivas de <i>P. solmsianum</i>	119
4.3.1.2 – Procedimento para extração das seivas de <i>P. aduncum</i>	120
4.3.2 - Análises elementares e de micro-macronutrientes.....	120
4.4 – Conclusões	121
 <u>CAPÍTULO 5: Identificações e determinações estruturais</u>	
5.1 – Introdução	122
 <u>CAPÍTULO 6: Estabilidade de lignanas tetraidrofurânicas versus ocorrência natural</u>	
6.1 – Introdução	215
6.2 – Resultados	217
6.2.1 – Energia relativa das lignanas L1, L4, L5, L8 e L9	217
6.2.2 – Efeito do grau de metoxilas na estabilidade das lignanas tetraidrofurana.....	224
6.2.3 – Estudo da estabilidade das 10 possíveis configurações do anel tetraidrofurânicas para lignanas tetraidrofurânicas.....	226
6.3 – Experimental	228
6.4 - Conclusões	233
Considerações finais	234
Referências Bibliográficas	236

Lista de figuras

Figuras	Pág.
Figura 1.1. Relações entre as diversas classes de semioquímicos (modificada de Vilela e Lúcia, 2001).....	1
Figura 1.2. Número estimado de espécies vivas de plantas, animais, fungos, protistas e bactérias descritas e nomeadas (Herrera e Pellmyr, 2002).....	3
Figura 1.3. Exemplo de quatro espécies de <i>Piper</i>	7
Figura 1.4. Diversidade estrutural de produtos naturais isolados de espécies de <i>Piper</i> (Parmar <i>et al.</i> , 1997).....	8
Figura 1.5. Exemplo de cinco espécies de <i>Peperômia</i>	9
Figura 1.6. Variáveis para o estudo das interações entre Piperaceae e espécies de insetos.....	11
Figura 1.7. Ninfas de <i>Callocanophora</i> sp sugando as seivas dos caules de <i>Piper aduncum</i> (Foto, M. J. K.).....	15
Figura 1.8. Besouro adulto de <i>Naupactus bipes</i> em folha de <i>Piper regnellii</i> (Foto, M. J. K.).....	15
Figura 1.9. Besouro adulto de <i>Conoderus fuscofasciatus</i> em folha de <i>Piper solmsianum</i> (Foto, M. J. K.).....	15
Figura 1.10. Besouro adulto de <i>Chasmodia</i> sp em frutos de <i>Piper gaudichaudianum</i> (Foto, M. J. K.).....	16
Figura 1.11. Acasalamento dos insetos <i>Sibovia sagata</i> em folha de <i>Piper tuberculatum</i> (Foto, M. J. K.).....	16
Figura 1.12. Lagarta da borboleta <i>Heraclides hectorides</i> em folha de <i>Piper solmsianum</i> (Foto, M. J. K.).....	16
Figura 1.13. Lagarta da borboleta <i>Quadrus u-lucida</i> em folha de <i>Piper solmsianum</i> (Foto, M. J. K.).....	16
Figura 1.14. Colônia de homópteros sugando as seivas do caule de <i>P. aduncum</i> , Chapada Diamantina – Ba (Foto, M. J. K.).....	19
Figura 2.1. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de <i>N. bipes</i> em óleos voláteis de folhas de <i>P. regnellii</i> , <i>P. hispidum</i> e <i>P. gaudichaudianum</i> (100 mg/mL) Tukey (P<0,05).....	26

Figura 2.2. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas de fêmeas de <i>N. bipes</i> em óleos voláteis de folhas de <i>P. regnellii</i> , <i>P. hispidum</i> e <i>P. gaudichaudianum</i> (100 mg/mL) Tukey ($P<0,05$).	26
Figura 2.3. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas de <i>N. bipes</i> em diferentes concentrações do óleo volátil de <i>Piper hispidum</i> Tukey ($P<0,05$).....	27
Figura 2.4. Os cromatogramas (CG) do óleo volátil de <i>P. hispidum</i> com detecção simultânea por FID (superior) e por EAD (inferior) usando uma antena de um <i>N. bipes</i> . Os picos 1 , 2 , 3 , 5 e 6 foram identificados como sendo os terpenóides α -pineno, β -pineno, mirceno, α -copaeno e β -germacreno, respectivamente.	31
Figura 2.5. Compostos voláteis bioativos de <i>P. hispidum</i> frente às antenas do besouro <i>N. bipes</i>	31
Figura 2.6. Folhas de espécies de <i>P. hispidum</i> (a), <i>P. arboreum</i> (b), <i>P. gaudichaudianum</i> (c), <i>P. aduncum</i> (d) e <i>P. regnellii</i> (e), após uma semana na presença de oito espécimes de <i>N. bipes</i>	32
Figura 2.7. Folhas de <i>P. gaudichaudianum</i> predadas pelo besouro <i>N. bipes</i> em campo (Foto, C. S. R).....	33
Figura 2.8. Folha de <i>P. gaudichaudianum</i> sendo predada pelo besouro <i>N. bipes</i> em condições de laboratório (Foto, C. S. R).....	33
Figura 2.9. Larva de <i>N. bipes</i> coletada em raízes de <i>P. regnellii</i> (Foto, M. J. K).....	33
Figura 2.10. Besouro <i>N. bipes</i> recém eclodido criado em raízes de <i>P. regnellii</i> em condições de laboratório (Foto, C. S. R).....	34
Figura 2.11. Perfil cromatográfico dos extratos de <i>P. gaudichaudianum</i> (folhas e raízes) e de <i>N. bipes</i> (insetos, fezes e ovos).....	36
Figura 2.12. Perfil cromatográfico dos extratos dos tecidos de espécimes de <i>N. bipes</i> mantidos em cativeiros com folhas de <i>P. arboreum</i> , <i>P. hispidum</i> e <i>P. regnellii</i>	37
Figura 2.13. Perfil cromatográfico (CG) do extrato do besouro com dieta constituída de folhas de <i>P. arboreum</i>	37
Figura 2.14. Perfil cromatográfico dos extratos de tecidos de <i>P. regnellii</i> (olhas e raízes) e dos tecidos de <i>N. bipes</i> (insetos, fezes e larvas).....	39
Figura 2.15. Metabólitos isolados das folhas de <i>P. regnellii</i>	40
Figura 2.16. Neolignanas N1-N4 de <i>P. regnellii</i> e suas respectivas reações de biotransformações durante o processo digestivo do besouro <i>N. bipes</i>	41
Figura 2.17. Amidas previamente isoladas de <i>P. arboreum</i>	42

Figura 2.18. Perfil cromatográfico dos extratos das folhas de <i>P. arboreum</i> e fecal do besouro <i>N. bipes</i>	43
Figura 2.19. Metabólitos secundários isolados de <i>P. hispidum</i>	44
Figura 2.20. Metabólitos secundários isolados de <i>P. aduncum</i>	44
Figura 2.21. Metabólitos secundários isolados das folhas de <i>P. solmsianum</i>	45
Figura 2.22. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e das fezes de <i>N. bipes</i>	46
Figura 2.23. Espectros de massas (IE) da lignanas L1 , L2 e L3 e as estruturas de seus respectivos íons correspondentes aos picos bases.....	47
Figura 2.24. Reação de biotransformação da lignana L1 durante o processo digestivo do besouro <i>N. bipes</i>	48
Figura 2.25. Comparação do perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> predadas pelo besouro <i>N. bipes</i> e das folhas não predadas. As setas indicam os picos referentes às substâncias ausentes nas folhas não predadas.....	49
Figura 2.26. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> predadas pelo besouro <i>N. bipes</i> e fezes do besouro tratado com folhas de <i>P. solmsianum</i>	50
Figura 2.27. Espectro de RMN de ¹ H de uma fração pré-purificada do extrato polar das folhas de <i>P. solmsianum</i>	51
Figura 2.28. Provável origem das substâncias F2 e F3 isoladas das fezes de <i>N. bipes</i> com dieta constituída de folhas de <i>P. solmsianum</i>	52
Figura 2.29. Perfil cromatográfico (CG) dos extratos das folhas de <i>P. tuberculatum</i> hidrolisado, não hidrolisado e fecal do besouro <i>N. bipes</i>	53
Figura 2.30. Reações de hidrólise das amidas de <i>P. tuberculatum</i>	54
Figura 2.31. Esquema de um eletrodo usado nos experimentos de EAG.....	57
Figura 2.32. Esquema básico de um sistema de GC-EAD; no exemplo ilustrativo, o composto assinalado no cromatograma seria o feromônio, uma vez que apenas esse, dentre todos os presentes, teve uma resposta positiva da antena.....	59
Figura 3.1. Biogêneses de lignanas e neolignanas	70
Figura 3.2. Ciclo de vida da Lepidoptera <i>Q. u-lucida</i> (Foto, M. J. K.).....	73
Figura 3.3. Lagarta em <i>Piper solmsianum</i> e o inseto adulto de <i>H. brasiliensis</i> (Foto, M. J. K.).....	74
Figura 3.4. Ciclo de vida da Lepidoptera <i>H. hectorides</i> (Foto, M. J. K.).....	74
Figura 3.5. Lignanas e neolignanas isoladas de espécies de Piperaceae.....	75

Figura 3.6. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e fecal da lagarta <i>Q. u-lucida</i>	76
Figura 3.7. Metabolismo da lignana (-)-grandisina (Li) em lagarta <i>Q. u-lucida</i> formando a lignana L3	76
Figura 3.8. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e do fluido digestivo da lagarta <i>Q. u-lucida</i> com a (-)-grandisina (L1) incubada.....	77
Figura 3.9. Perfil cromatográfico (CG) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e fecal da lagarta <i>H. hectorides</i>	78
Figura 3.10. Metabolismos das substâncias L1 , D6 e F6 em lagarta de <i>H. hectorides</i> formando as substâncias L2 , D2 e F4 , respectivamente.....	79
Figura 3.11. Produtos do metabolismo da lignana (-)-grandisina (23) em lagartas das borboletas <i>Q. u-lucida</i> , <i>H. hectorides</i> e no besouro adulto de <i>N. bipes</i>	80
Figura 3.12. Perfil cromatográfico (CG) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> alopátrica e fecal da lagarta <i>H. hectorides</i>	81
Figura 3.13. Espectros de massas das substâncias L4 ($C_{24}H_{32}O_7$, M = 432 Da, IE), L6 ($C_{23}H_{30}O_7$, M = 418 Da, IE), L5 ($C_{23}H_{28}O_7$, M = 416 Da, IE) e L7 ($C_{22}H_{26}O_7$, M = 402 Da, IE).....	82
Figura 3.14. Produtos do metabolismo das lignanas L4 e L5 em lagarta da borboleta <i>H. hectorides</i> produzindo as substâncias L6 e L7	82
Figura 3.15. Perfil cromatográfico dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e fecal de uma espécie de gafanhoto.....	76
Figura 3.16. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>P. regnellii</i> e fecal de <i>H. brasiliensis</i>	84
Figura 3.17. Metabólitos secundários isolados das folhas de <i>P. regnellii</i>	85
Figura 3.18. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos do extrato das folhas de <i>P. regnellii</i> e fecal da lagarta <i>Q. u-lucida</i>	86
Figura 3.19. Metabolismo das neolignananas N1 e N3 em lagartas das borboletas <i>H. brasiliensis</i> e <i>Q. u-lucida</i> produzindo N5 e N9	86
Figura 3.20. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos dos tecidos da lagarta da borboleta <i>H. brasiliensis</i> e das folhas de <i>P. regnellii</i>	87
Figura 3.21. Perfil cromatográfico (CG-EM) dos constituintes químicos dos extratos	

das folhas de <i>P. tuberculatum</i> e fecal da lagarta <i>H. hectorides</i>	88
Figura 3.22. Reação de hidrólise das amidas de <i>P. tuberculatum</i> durante o processo digestivo da lagarta <i>H. hectorides</i>	88
Figura 3.23. Variação das massas corporais das lagartas de <i>Heraclides hectorides</i> com dieta de folhas de <i>P. regnellii</i> (Pr1 e Pr2) e <i>P. tuberculatum</i> (Pt1 e Pt2).....	89
Figura 4.1. Uma espécie de sugador se alimentando da seiva da planta.....	101
Figura 4.2. Metabólitos secundários isolados das folhas e caules de <i>P. aduncum</i> ...	106
Figura 4.3. Cromatogramas da substância padrão F6 constituinte das folhas de <i>P. aduncum</i> e do extrato de seivas.....	107
Figura 4.4. Espectro de RMN de ^1H da seiva de <i>P. aduncum</i> (CDCl_3 , 200 MHz).....	107
Figura 4.5. Cromatogramas do extrato das folhas <i>P. solmsianum</i> e seivas (bruta + elaborada).....	108
Figura 4.6. Espectro de RMN de ^1H das seivas de <i>P. solmsianum</i> (CDCl_3 , 200 MHz).....	109
Figura 4.7. Cromatograma (CLAE) do extrato dos tecidos dos insetos sugadores de seivas.....	110
Figura 4.8. Análise elementar de C, H e N das folhas e caules de espécies Piperaceae referente aos dados da tabela 4.2.....	111
Figura 4.9. Composição de macronutrientes das folhas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. regnellii</i>	112
Figura 4.10. Composição de macronutrientes dos caules de <i>P. aduncum</i> e <i>P. regnellii</i>	112
Figura 4.11. Composição de micronutrientes das folhas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. regnellii</i>	113
Figura 4.12. Composição de micronutrientes dos caules de <i>P. aduncum</i> e <i>P. regnellii</i>	113
Figura 4.13. Indicações dos modos de dimerização de álcool coniferílico para formação de ligninas. As setas indicam as posições onde ocorreram os acoplamentos durante a lignificação.....	115
Figura 4.14. Cromatograma (CG) das seivas de <i>P. solmsianum</i>	117
Figura 4.15. Olfatômetro em “Y” com dupla escolha, tratamento + controle, contendo 8 espécimes do inseto <i>A. reticulatum</i>	118
Figura 4.16. Sistema adotado para coleta de seivas.....	119
Figura 5.1. Espectro de massas de A1/A2 ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}$, $M = 317$ Da, IE).....	123

Figura 5.2. Espectro de massas de A3 ($C_{17}H_{21}O_5N$, $M = 319$ Da, IE).....	124
Figura 5.3. Representações dos mecanismos das principais fragmentações no espectro de massas de A3	124
Figura 5.4. Espectro de massas de A4 ($C_{18}H_{25}O_5N$, $M = 319$ Da, IE).....	125
Figura 5.5. Espectro de massas de A5 ($C_{16}H_{21}O_3N$, $M = 275$ Da, IE).....	125
Figura 5.6. Espectro de massas de A6 ($C_{16}H_{19}O_3N$, $M = 273$ Da, IE).....	126
Figura 5.7. Espectro de RMN de 1H da substância C1 (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) MHz respectivamente, $CDCl_3$	128
Figura 5.8. Espectro de massas da substância C2 (EI, 4,5 70 eV).....	131
Figura 5.9. Espectro no IV da substância C2 (KBr).....	131
Figura 5.10. Espectro de RMN de 1H da substância C2 (300 MHz, $CDCl_3$, TMS)....	132
Figura 5.11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância C2 (75 MHz, $CDCl_3$, TMS)....	133
Figura 5.12. Espectro de RMN de DEPT da substância C2 (75 MHz, $CDCl_3$, TMS). ..	134
Figura 5.13. Espectro de COSY 1H — 1H , 300 MHz, da substância C2	135
Figura 5.14. Espectro de HMQC, 300 MHz, da substância C2 abaixo e duas ampliações acima.....	136
Figura 5.15. Espectro de HMBC, 300 MHz, da substância C2	137
Figura 5.16. Ampliações do espectro de NOE, 300 MHz, da substância C2 mostrando os efeitos da radiação de $H2'' \rightarrow H-7$, $H-4''$, $H-5''$, $H-1''$ (A); $H-3 \rightarrow H-4$, $H-9$ (B).....	138
Figura 5.17. Correlações chaves de HMBC ^3JC-H para a substância C2	139
Figura 5.18. Interação espacial entre os hidrogênios observada no experimento de NOE para a substância C2 ($H2'' \rightarrow H-7$, $H-4''$, $H-5''$, $H-1''$; $H-3 \rightarrow H-4$, $H-9$; $H-3' \rightarrow H-6$, $H-2'$; $H-4 \rightarrow H-5$).....	139
Figura 5.19. Curva de dicroísmo circular do sargatriol $CHCl_3$ ($2,97 \times 10^{-4}$ mol/L).....	141
Figura 5.20. Curva de dicroísmo circular do ácido gaudichaudiânico em $CHCl_3$ (2×10^{-3} mol/L).....	141
Figura 5.21. Espectro de massas da substância C3 ($C_{22}H_{28}O_3$, 354 Da; EI 70 eV).....	142
Figura 5.22. Principais íons fragmentários observados nos espectros de massas das substâncias C3 e C2	143
Figura 5.23. Espectro de massas da substância C3 (EIS, 4,5 KVolt).....	144
Figura 5.24. Espectro de massas da substância D1 ($C_{13}H_{12}O_5$, $M = 254$ Da, IE).....	144
Figura 5.25. Espectro de massas da substância D2 ($C_{10}H_{12}O_5$, $M = 212$ Da, IE).....	145
Figura 5.26. Espectro de RMN de 1H da substância D2 (200 MHz, $CDCl_3$, TMS).....	146

Figura 5.27. Espectro de massas da substância F1 isolada das folhas de <i>P. solmsianum</i> (C ₁₂ H ₁₆ O ₃ , M = 208 Da, IE).....	147
Figura 5.28. Espectro de RMN de ¹ H da substância F2 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	149
Figura 5.29. Espectro de RMN de ¹³ C da substância F2 (50 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	150
Figura 5.30. Espectro de massas da substância F2 (C ₁₂ H ₁₆ O ₄ , M = 224 Da, IE).....	151
Figura 5.31. Espectro de RMN de ¹ H da substância F3 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	153
Figura 5.32. Espectro de RMN de ¹³ C da substância F3 (50 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	152
Figura 5.33. Principais correlações observadas no experimento de HMBC da substância F3	155
Figura 5.34. Espectro de HMBC ³ JC-H da substância F3	155
Figura 5.35. Espectro de massas da substância F3 (C ₁₁ H ₁₂ O ₄ , M = 210 Da, IE).....	156
Figura 5.36. Espectro de massas da substância F4 (C ₁₂ H ₁₄ O ₅ , M = 238 Da, IE).....	156
Figura 5.37. Espectro de RMN de ¹ H da substância F4 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS)....	157
Figura 5.38. Espectro de massas da substância F5 (C ₁₂ H ₁₄ O ₅ , M = 240 Da, IE).....	158
Figura 5.39. Espectro de massas da substância F7 (C ₁₂ H ₁₄ O ₄ , M = 222 Da, IE).....	159
Figura 5.40. Cromatograma do dilapiol (CLAE).....	159
Figura 5.41. Espectro de massas da substância L1 isolada das folhas de <i>P. solmsianum</i> (C ₂₄ H ₃₂ O ₇ , M = 432 Da, IE).....	160
Figura 5.42. Principais fragmentações da (-)-grandisina (Holloway e Feodor, 1974).	161
Figura 5.43. Espectro de RMN de ¹ H da substância L2 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	163
Figura 5.44. Espectro de massas da substância L2 (C ₂₃ H ₃₀ O ₇ , M = 418 Da, IE).....	164
Figura 5.45. Principais fragmentações da O-desmetilgrandisina.....	164
Figura 5.46. Espectro de RMN de ¹ H da substância L3 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	166
Figura 5.47: Espectro de massas da substância L3 (C ₂₂ H ₂₈ O ₇ , M = 404 Da, IE).....	167
Figura 5.48. Principais fragmentações da substância L3	167
Figura 5.49. Espectro de massas da substância L4 (C ₂₄ H ₃₂ O ₇ , M = 432 Da, IE).....	168
Figura 5.50. Espectro de RMN de ¹ H da lignana L4 , 200 MHz, CDCl ₃	170
Figura 5.51. Espectro de RMN de ¹³ C da lignana L4 , 50 MHz, CDCl ₃ seu espectro de massas (IE), associado com os dados dos espectros de RMN de ¹ H	171
Figura 5.52. Espectro de massas da lignana L5 (C ₂₃ H ₂₈ O ₇ , M = 416 Da, IE).....	172
Figura 5.53. Principais fragmentações das lignanas L8 e L5 baseado no padrão de fragmentação da (-)-grandisina (L1) (Holloway e Sheinmann, 1973).....	172
Figura 5.54. Espectro de RMN de ¹ H da lignana L5 200 MHz, CDCl ₃	175
Figura 5.55. Espectro de RMN de ¹³ C da lignana L5 , 50 MHz, CDCl ₃	176
Figura 5.56. Espectro de massas da substância L6 (C ₂₃ H ₃₀ O ₇ , M = 418 Da, IE).....	177

Figura 5.57. Espectro de massas da substância L7 ($C_{22}H_{26}O_7$, M = 402 Da, IE).....	177
Figura 5.58. Espectro de massas da substância L8 ($C_{24}H_{32}O_7$, M = 432 Da, IE).....	178
Figura 5.59. Espectro no IV da lignana L8 MHz, respectivamente, $CDCl_3$	178
Figura 5.60. Espectro de RMN de 1H da lignana L8 , 200 MHz, $CDCl_3$	181
Figura 5.61: Espectro de RMN de ^{13}C da lignana L8 , 50 MHz, $CDCl_3$	182
Figura 5.62. Padrões de substituição de lignanas tetraidrofurânicas relatadas na literatura.....	183
Figura 5.63. “Efeito de corrente do anel” (anisotropia diamagnética) nos grupos metílicos de lignanas tetraidrofurânicas. O anel à esquerda da figura, cis em relação a um grupo metílico que exerce efeito de blindagem. Enquanto o anel à direita da figura, trans em relação a um grupo metílico causa efeito de desblindagem sobre o metílico.....	184
Figura 5.64. Espectros de DC da (-)-grandisina e das lignanas L8 , L4 e L5	186
Figura 5.65. Possíveis configurações para lignana L4	187
Figura 5.66. Espectro de massas de N1 isolada das folhas de <i>P. regnellii</i> ($C_{18}H_{18}O_2$, M = 266 Da, IE).....	188
Figura 5.67. Espectro de massas de N2 isolada das folhas de <i>P. regnellii</i> ($C_{18}H_{16}O_2$, M = 264 Da, IE).....	188
Figura 5.68. Espectro de massas de N3 isolada das folhas de <i>P. regnellii</i> ($C_{19}H_{20}O_3$, M = 296 Da, IE).....	189
Figura 5.69. Espectro de massas de N4 isolada das folhas de <i>P. regnellii</i> ($C_{19}H_{18}O_3$, M = 294 Da, IE).....	189
Figura 5.70. Espectro de massas de N5 isolada das fezes de <i>N. bipes</i> ($C_{16}H_{14}O_3$, M = 254 Da, IE).....	190
Figura 5.71. Espectro de RMN de 1H da substância N5 (200 MHz, $CDCl_3$, TMS).....	192
Figura 5.72. Espectro de massas de N6 isolada das fezes do besouro <i>N. bipes</i> ($C_{16}H_{12}O_4$, M = 268 Da, ESI-EM).....	193
Figura 5.73. Subespectro (EM2) do íon molecular obtido do espectro de massas de N6 ($C_{16}H_{12}O_4$, M = 268 Da, ESI).....	194
Figura 5.74. Principais fragmentações atribuídas no espectro de massas de N6	194
Figura 5.75. Espectro no infravermelho da substância N6	195
Figura 5.76. Espectro de RMN de 1H da substância N7 (500 MHz, $CDCl_3$, TMS).....	197
Figura 5.77. Espectro de massas de N7 isolada do extrato fecal do besouro <i>N. bipes</i> ($C_{18}H_{16}O_3$, M = 280 Da, IE).....	198
Figura 5.78. Espectro de massas de N8 isolada do extrato fecal do besouro <i>N.</i>	

<i>bipes</i> (C ₁₇ H ₁₆ O ₄ , M = 284 Da, IE).....	198
Figura 5.79. Principais fragmentações observadas no espectro de massas de N8 ...	199
Figura 5.80. Espectro de infravermelho da substância N8	199
Figura 5.81. Espectro de massas da neolignana N9 (C ₁₇ H ₁₆ O ₅ , M = 300 Da, IES)....	200
Figura 5.82. Espectro de massas da substância P1 (C ₁₃ H ₁₄ O ₄ , 234 Da, IE, 70 eV).....	201
Figura 5.83: Proposta de formação dos principais íons fragmentários observados no espectro de massas da substância P1 (IE, 70 eV).....	202
Figura 5.84. Espectro de RMN de ¹ H da substância P1 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	203
Figura 5.85. Espectro de RMN de ¹³ C da substância P1 (75 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	204
Figura 5.86. Espectro de RMN de ¹ H da substância P2 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	207
Figura 5.87. Espectro de RMN de ¹³ C da substância P2 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	208
Figura 5.88. Espectro de massas da substância P2 (C ₁₈ H ₂₄ O ₃ , M = 288 Da, IE).....	209
Figura 5.89. Espectro no infravermelho da substância P2	209
Figura 5.90. Espectro de massas da substância P3 (C ₁₇ H ₂₂ O ₃ , M = 274 Da, IE).....	210
Figura 5.91. Espectro de RMN de ¹ H da substância P3 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	211
Figura 5.92. Espectro de massas da substância P4 isolada das folhas de <i>P. hispidum</i> (C ₂₂ H ₂₈ O ₄ , M = 356 Da, IE).....	212
Figura 5.93. Espectro de RMN de ¹ H da substância P4 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	214
Figura 6.1. Diversos esqueletos de lignanas.....	216
Figura 6.2. Lignanas tetraidrofurânicas.....	216
Figura 6.3. As energias relativas dos isômeros L1 (toda- <i>trans</i>), L8 (toda- <i>cis</i>) e L4 (<i>epi</i>).....	218
Figura 6.4. As energias relativas das lignanas L4 , L5 e L8 e L9 em relação a L1	219
Figura 6.5. Aumento de energia devido à substituição de grupos metóxi por grupos metilenodióxi em lignanas tetraidrofurânicas.....	220
Figura 6.6. Possíveis ligações de hidrogênio para as lignanas L1 , L4 , L5 e L8 e L9 . ..	220
Figura 6.7. Esquema de numeração incluindo todos os hidrogênios.....	222
Figura 6.8. Configurações espaciais para as lignanas L1 , L4 , L5 e L8 e L9	223
Figura 6.9. Energia eletrônica de lignanas tetraidrofurânicas, configuração toda <i>cis</i> e toda <i>trans</i> , variando o grau de metoxilas no substituinte aril (1 Hartree = 627,51 Kcal mol ⁻¹).....	224
Figura 6.10. Aumento de energia com a diminuição do grau de metoxilação para as lignanas tetraidrofurânicas com configurações <i>cis</i> e <i>trans</i>	225
Figura 6.11. A diferença entre as energias das configurações <i>cis</i> e <i>trans</i> à esquerda	

e seus respectivos valores relativos em relação à configuração toda <i>trans</i> -1 à direita.....	225
Figura 6.12. As 10 possíveis configurações para as lignanas tetraidrofurânicas.....	226
Figura 6.13. Energias relativas dos dez isômeros para as lignanas tetraidrofurânicas.....	215

Lista de tabelas

Tabelas	Pág.
Tabela 1.1. Espécies de Piperaceae cultivadas no canteiro do LQPN e local de coletas.....	12
Tabela 1.2. Espécies de insetos identificadas.....	17
Tabela 1.3. Correlação entre espécies de insetos por metabólitos secundários de Piperaceae.....	18
Tabela 2.1. Composições percentuais dos óleos essenciais das folhas de <i>P. gaudichaudianum</i> , <i>P. regnellii</i> e <i>P. hispidum</i>	28
Tabela 3.1. Espécies de <i>Piper</i> hospedeiras das lagartas <i>Q. u-lúcida</i> , <i>H. hectorides</i> e <i>H. brasiliensis</i>	72
Tabela 4.1. Espécies de sugadores de seivas e suas respectivas plantas hospedeiras.....	105
Tabela 5.1. Dados dos espectros de RMN de ^1H da substância C1 em 500 MHz, CDCl_3	127
Tabela 5.2. Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância C2 a 300 e 75.....	130
Tabela 5.3. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância D2 em 200 MHz, CDCl_3	145
Tabela 5.4. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância F2 em 200 MHz e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3	148
Tabela 5.5. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância F3 em 200 MHz e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3	152
Tabela 5.6. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância F4 em 200 MHz, CDCl_3	156
Tabela 5.7. Dados do espectro de RMN ^1H da substância L2 em 200 MHz, CDCl_3 ...	162
Tabela 5.8. Dados do espectro de RMN ^1H da substância L3 em 200 MHz, CDCl_3 ...	165
Tabela 5.9. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância L4 em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3	169
Tabela 5.10. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da lignana L5 em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3	174
Tabela 5.11. Dados do espectro de RMN ^1H e de ^{13}C da substância L8 em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3	180

Tabela 5.12. Comparação de dados da literatura RMN de ^1H e ^{13}C (δ e J , relativo ao TMS) para lignanas tetraidrofurânicas (A , B , C , L1 , E , F).....	183
Tabela 5.13. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância N5 a 200 MHz respectivamente, CDCl_3	191
Tabela 5.14. Dados do espectro de RMN de ^1H de N7 a 500 MHz, CDCl_3	196
Tabela 5.15. Dados dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C da substância P1 em 300 MHz e 75 MHz respectivamente, CDCl_3	202
Tabela 5.16. Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância P2 em 300 e 75 MHz respectivamente, CDCl_3	206
Tabela 5.17. Dados observados no espectro de RMN de ^1H da substância P3 a 300 MHz, CDCl_3	210
Tabela 5.18. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância P4 em 300 MHz, CDCl_3	213
Tabela 6.1. Classificação de lignanas.....	215
Tabela 6.2. Energias calculadas com geometrias otimizadas em B3LYP/6-31G(d,p), adicionado com a energia do ponto zero (ZPE), para as lignanas L1 , L4 , L5 e L8 e L9	221
Tabela 6.3. Comprimentos selecionados de ligações (in Å) calculados pelo método B3LYP/6-31G(d,p) para as lignanas L1 , L4 , L5 e L8 e L9	221
Tabela 6.4. Comparação dos ângulos diedrais ($^\circ$) selecionados das lignanas L1 , L4 , L5 e L8 e L9	222
Tabela 6.5. Ligações de hidrogênios selecionadas (Å) calculadas pelo nível de teoria B3LYP/6-31G(d,p)*	222
Tabela 6.6. Ângulos de ligações selecionados ($^\circ$) calculados pelo nível de teoria B3LYP/6-31G(d,p)*	223

Capítulo 1

Ecologia Química: Interações plantas e insetos

1. - Introdução

1.1 – Ecologia química

Ecologia química é a ciência que investiga as relações quimicamente mediadas entre organismos que podem incluir plantas e animais; animais e animais; plantas e plantas; plantas e microorganismos (Man, 1990). O estudo da ecologia química é de particular importância entre insetos sociais como formigas, abelhas, vespas e térmitas, onde as substâncias voláteis podem assumir papel primordial na comunicação e manutenção da organização social.

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre organismos foram primeiramente denominadas de *semioquímicos* (“sinais químicos”) por Nordlund e Lewis (1976). Entretanto, o termo semioquímicos é bastante amplo, referindo-se não somente as substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações, podendo também incluir as toxinas. Nesse sentido, Dicker e Sabelis (1988) utilizaram o termo *infoquímicos*, do inglês *infochemicals*, para distinguir claramente entre essa categoria de substâncias químicas mais relacionadas à comunicação das toxinas e nutrientes (Figura 1.1).

Figura 1.1: Relações entre as diversas classes de semioquímicos (modificada de Vilela e Lúcia, 2001).

Além da comunicação química entre espécies, a ecologia química também envolve os estudos com substâncias químicas defensivas que são utilizadas para afetar predadores potenciais que podem atacar uma grande variedade de espécies.

1.1.1 – A química de defesa

Independente de táxon, as substâncias químicas que têm um papel proeminente em interações interespecíficas são raramente relacionadas àquelas utilizadas por um organismo para funções do cotidiano, como respiração, digestão, excreção, ou, no caso de plantas, fotossíntese. Estas substâncias são, em plantas e animais, de "um caráter mais secundário". Os metabólitos secundários geralmente são derivados de metabólitos que participam em processos fisiológicos primários (Berenbaum, 1995). Em plantas, por exemplo, metabólitos secundários podem ser exemplificados por alcalóides, fenilpropanóides, glicosídeos cianogênicos que derivam diretamente de aminoácidos. Constituintes do ciclo de ácidos tricarboxílicos são envolvidos na formação de poliacetilenos e polifenóis (Berenbaum, 1995).

Presumivelmente, os metabólitos secundários são fisiologicamente ativos em organismos e podem ter sido selecionados ao longo do processo evolutivo como mecanismos de defesa contra inimigos naturais como insetos, animais, fungos, bactérias e vírus (Herrera e Pellmyr, 2004; Cooper-Driver *et al.*, 1984; Berenbaum, 1995; Panizzi e Parra, 1991).

1.2 – Interações químicas entre plantas-insetos

Dentre as interações entre organismos vivos em ecologia química, as interações plantas-animais têm sido exaustivamente estudadas (Herrera e Pellmyr, 2004), em particular as interações plantas-insetos nos quais diversos estudos vêm sendo realizados (Brower *et al.*, 1982; Dyer, 2004; Brown, 1984a e 1984b).

1.2.1 – Insetos

Da extraordinária diversidade observada no grupo dos insetos, cerca de 60% da biodiversidade do mundo (Figura 1.4), 46% são considerados fitófagos (Cronin e Abrahamson, 2001). Alimentando-se de plantas, base da cadeia alimentar, os insetos têm acesso a uma ampla fonte de recursos (Frenzel e Brandl, 2001), incluindo alimentos

cultivados e armazenados. Assim, os insetos são considerados os maiores competidores do homem no que diz respeito à alimentação (Ferreira *et al.*, 2001).

Figura 1.2. Número estimado de espécies vivas de plantas, animais, fungos, protistas e bactérias descritas e nomeadas (Herrera e Pellmyr, 2002).

Insetos pragas têm um expressivo impacto negativo na agricultura e na saúde do homem. As perdas mundiais em produtos armazenados devido ao ataque desses insetos na pós-colheita são estimadas anualmente em 15%. No Brasil as perdas chegam a atingir 10% de toda produção e um alto custo é envolvido para a proteção destes produtos contra infestações (Moreira *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o custo da resistência de insetos a inseticidas pode alcançar anualmente 1,4 bilhões de dólares nos Estados Unidos (Simas *et al.*, 2004).

No período compreendido entre 1955 e 1995 o mosquito da dengue, *Aedes aegyptii*, foi responsável por cerca de três milhões de casos de febre hemorrágica resultando em 58 mil mortes (Halstead, 1997).

1.2.2 - Insetos e plantas

Ecólogos e biólogos evolutivos têm um interesse comum nos estudos das interações entre plantas e insetos. Os ecólogos introduziram terminologias voltadas para a descrição de padrões de associação ou relações entre plantas e insetos, enquanto os biólogos evolutivos buscam outras para denotar características potencialmente hereditárias dos indivíduos (Singer, 2000). O intuito de ambos há décadas é de esclarecer os diferentes aspectos e mecanismos envolvidos no processo de co-evolução (gene-gene) ou co-adaptação entre plantas e insetos fitófagos (McEvoy, 2002).

Ainda que uma associação evolutiva de hospedeiro e espécies de insetos baseada na química da planta possa ser espúria (Becerra, 1997), devido à complexidade taxonômica de plantas e herbívoros, Ehrlich e Raven (1964) postularam que a escolha de insetos por novos hospedeiros é mediada por similaridade química entre esses. Além disso, muitos metabólitos secundários e nutrientes de plantas influenciam diretamente o comportamento de herbívoros, controlando seu crescimento e desenvolvimento (Espírito-Santo e Fernandes, 2002). Portanto, um estudo detalhado das interações planta-inseto, em nível molecular, é uma etapa extremamente importante para uma melhor compreensão dos efeitos de plantas em insetos e da possível co-evolução ou co-adaptação entre ambos.

1.2.3 – Insetos e metabólitos secundários de plantas

Apesar da abundância de insetos e de sua principal fonte alimentar, as plantas, a maioria das espécies de insetos fitófagos é especificamente associada a um número limitado de espécies de plantas vasculares (Ward *et al.*, 2003). Essa especificidade de insetos por certos grupos de plantas é, em parte, devido aos metabólitos secundários de plantas que afetam de maneira significativa o comportamento de insetos.

Os besouros da casca (Scolytidae) são as principais pragas florestais e são atraídos por terpenóides liberados pela árvore hospedeira (Wood *et al.*, 1970). O besouro macho do algodão é atraído também por uma mistura complexa de terpenóides como (-)- α -pineno, (-)-limoneno, (-)- β -pineno e (+)- β -bisabolol da planta. Após a predação o macho libera um feromônio de agregação que foi identificado como sendo uma mistura de quatro terpenóides novos que atuam em sinergismo (Tumlinson *et al.*, 1969). A provável rota biossintética dos quatro terpenóides envolveria a aquisição e transformação metabólica dos terpenos ingeridos a partir do algodão.

A mosca da fruta oriental, *Dacus dorsalis*, é um inseto polífono que preda várias frutas em regiões tropicais e subtropicais. O metil eugenol é conhecido como um potente feromônio para o macho da mosca *Dacus dorsalis* (Chambers, 1977). Dois fenilpropanóides análogos ao metil eugenol, o 2-álil-4,5-dimetil-oxifenol e o álcool coniferílico foram detectados nos tecidos do corpo do macho de *Dacus dorsalis* (Nishida e Fukami, 1990).

1.3 – Interações químicas entre espécies de Piperaceae e insetos

1.3.1 – A família Piperaceae

A família Piperaceae, juntamente com a família Chlorantaceae têm sido classificadas como as mais primitivas Angiospermae, podendo ser consideradas como fósseis vegetais vivos (Taylor e Hickey, 1992). Dentro da família Piperaceae, destaca-se o gênero *Piper* (Figura 1.3), com mais de 700 espécies espalhadas pelos hemisférios norte e sul, tanto em regiões tropicais como subtropicais (Lawrence, 1951).

A química de espécies de *Piper* tem sido amplamente investigada, o que tem levado à descoberta e a elucidação estrutural de vários metabólitos fisiologicamente ativos (Figura 1.4), tais como: alcalóides, chalconas, hidrochalconas (Parmar *et al.*, 1997), propenilfenóis (Benevides *et al.* 1999), lignanas, neolignanas (Chauret *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2000), ácidos benzóicos prenilados (Lago *et al.*, 2004; Baldoqui *et al.*, 1999), terpenos (Andrade *et al.*, 1998), piperolídeos, flavonóides e flavanonas. Entretanto, apenas 10% de todas as espécies de *Piper* (112 de 1120 espécies conhecidas) foram investigadas fitoquimicamente, das quais foram isolados 667 compostos de diversas classes; 190 alcalóides/amidas, 49 lignanas, 70 neolignanas, 97 terpenos, 39 propenilfenóis, 15 esteróides, 18 kawapironas, 17 chalconas e hidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavanonas, 4 piperolídeos e 146 compostos de variadas estruturas (Dyer *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 1997).

Muitas espécies de Piperaceae são utilizadas na medicina popular e demonstraram diversas atividades biológicas. Na Jamaica, das 11 espécies conhecidas, *Piper aduncum* e *P. hispidum* são mencionadas como remédio para dores de estômago e como repelente de insetos (Asprey e Thornton, 1954). A pimenta-do-reino do leste africano é usada mundialmente como condimento, ao passo que suas folhas, raízes e sementes são usadas como medicamento no tratamento de bronquites, doenças gastrintestinais, doenças venéreas e reumatismo. No entanto, efeitos maléficos também

têm sido observados. Um extrato de pimenta-do-reino mostrou atividade carcinogênica em ratos. A evidência de tumores malignos e de múltiplos tumores foi maior em ratos tratados com pimenta do que no controle (Concon *et al.*, 1979). Assim, as atividades da piperina, a principal amida de *P. nigrum*, são bastante variáveis e merecem intensa investigação. Para outras amidas, como a desidropipernonalina, isolada dos frutos de *P. longum*, foi observada a atividade vasorelaxadora coronária (Shoji *et al.*, 1986).

O preparado de sementes de *Piper nigrum* tem encontrado amplo uso como inseticida e antialérgico (Irvine, 1961). Além disso, no caso de *P. falconeri*, os extratos diclorometânicos de folhas apresentaram atividade inseticida contra *Musca domestica* (moscas) e *Aedes aegyptii* (mosquitos) (Olsen *et al.*, 1993).

O gênero *Peperomia* (Figura 1.5) é também bastante diversificado, com muitas espécies endêmicas nos Andes e com muitas espécies ornamentais, porém são raros os estudos fitoquímicos. Nos últimos anos alguns estudos revelaram a presença de produtos fenólicos (Tanaka *et al.*, 1998), secolignanas (Wu *et al.*, 2006), cromenos (Veloza *et al.*, 2006; Malquichagua *et al.*, 2005) e lignanas (Li *et al.*, 2006). A *Peperomia japonica* tem sido usada na medicina japonesa no tratamento de tumores malignos (Tanaka *et al.*, 1998) e extratos de *Peperomia galioides* demonstraram atividade bacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Langfield *et al.*, 2004).

Figura 1.3. Exemplos de espécies de *Piper*.

Amida: piperina
P. nigrum

Lignana: (-)-grandisina
P. solmsianum

Neolignana: conocarpano
P. regnellii

Terpeno: linalol
P. gaudichaudianum

Propenilfenol: eugenol
P. sylvestre

Chalcona: asebogenina
P. aduncum

Flavona: velutina
P. clarkii

Flavanona: pinostrobin
P. hispidum

Kawapirona: yangonina
P. methysticum

Amina: dopamina
P. amalago

Figura 1.4. Diversidade estrutural de produtos naturais isolados de espécies de *Piper* (Parmar *et al.*, 1997).

Figura 1.5. Exemplos de espécies de *Peperomia*.

1.3.2 - Insetos e Piperaceae

O estudo fitoquímico de espécies de Piperaceae revelou diversos compostos com atividades biológicas, incluindo a atividade inseticida.

Várias amidas isoladas das folhas de espécies de Piperaceae e seus derivados sintéticos têm demonstrado atividade inseticida (Dyer *et al.*, 2004; Alécio *et al.*, 1998; Scott and McKibben, 1978; Paula *et al.*, 2000; Siddiqui *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2003; Mirand *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2002; Dyer *et al.*, 2001; 2003; McFerren e Rodriguez, 1998; Parmar, 1997; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002). A amida piperícida de *P. nigrum* mostrou atividade inseticida contra o gorgulho do feijão *Callosobruchus chinensis* (Miyakado *et al.*, 1979). As amidas como pipetina, piperina, triconina e piplartina são tóxicas para a mosca da fruta e outras espécies de insetos (Bernard *et al.*, 1995). As amidas guineensina, piperícida e retrofractamida mostraram potente atividade larvicida contra as espécies dos mosquitos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* e *A. togoi* (Park *et al.*, 2002). Apesar da atividade mostrada por amidas isoladas das folhas de espécies de Piperaceae, estas espécies são bastante

freqüentadas por insetos polinizadores (De Figueiredo e Sazima, 2000) e são também predadas por diversos insetos fitófagos.

O estudo das interações químicas entre as espécies de insetos hóspedes em Piperaceae é um tema muito pouco conhecido (Dyer *et al.*, 2000, 2001; 2003). A rigor, o mesmo acontece com a maioria dos insetos fitófagos em outras famílias do reino vegetal no Brasil, onde algo em torno de 2%, entre uma estimativa de duzentas mil espécies de insetos, tem conhecidas suas plantas hospedeiras habituais (Brown, 1992).

1.4 - Objetivo Geral

Investigar as interações quimicamente mediadas entre as espécies de Piperaceae e insetos procurando descrever preferências alimentares, biotransformações e seqüestros de metabólitos secundários.

1.4.1 - Objetivos específicos

- Documentar a ocorrência de espécies de insetos e espécies de Piperaceae hospedeiras e suas relações tanto em condições de cultivo quanto em campo;
- Investigar a possibilidade de espécies de insetos seqüestrarem metabólitos secundários de espécies de Piperaceae;
- Investigar o metabolismo de metabólitos secundários de Piperaceae em espécies de insetos, com dietas constituídas das folhas das plantas hospedeiras e não hospedeiras;
- Identificar os principais constituintes voláteis de Piperaceae que possam ter a função de cairomônios ou alomônios; ou que estejam de alguma forma envolvida na definição da especificidade das relações;
- Investigar outros parâmetros que possam contribuir para as relações de especificidade, incluindo o padrão de lignificação e os teores de alguns macros e micronutrientes de espécies de Piperaceae.

1.5 – Considerações gerais sobre as variáveis dos estudos de interações entre plantas e insetos

O ambiente ecológico inclui tanto fatores bióticos quanto fatores abióticos; o clima, salinidade, tipo de solo, disponibilidade de água, escassez de alimento e outras características físicas, biológicas e químicas (Futuyma, 1997). Portanto, a definição de variáveis a serem estudadas constitui-se em uma etapa primordial na investigação de organismos vivos.

Nesse estudo foram incluídas espécies de Piperaceae alopátricas (espécies ou populações que ocupam regiões geográficas diferente de uma determinada espécie ou população), parapátrica (populações que têm suas distribuições geográficas contíguas, mas não sobrepostas) e/ou simpátricas (duas espécies ou populações que ocupam a mesma localidade geográfica, de modo a conferir oportunidade de cruzamento), e suas interações com espécies de insetos considerando os aspectos químicos (Figura 1.6).

Figura 1.6. Variáveis para o estudo das interações entre Piperaceae e espécies de insetos.

1.6 - Observações em campo

Aproximadamente 65 espécies de Piperaceae vêm sendo cultivadas nos viveiros e nos jardins ao lado do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN, IQ-USP) (Tabela 1.1). Foram observados diversos insetos predadores em folhas, caules e frutos das espécies cultivadas (Figuras 1.7 – 1.13).

Tabela 1.1. Espécies de Piperaceae cultivadas no canteiro do LQPN e local de coletas.

Código (Kato- 0000)	Nome das espécies	Local da coleta
0007	1. <i>Piper arboreum</i> var. <i>hirtellum</i> Yunck	Andaraí - BA, 743m S12°53'49" WO41°18'598"
0014	2. <i>Piper hispidum</i> Sw	BR 101 - Ilhéus -BA, 118m, S14°30'43,9", WO39°19'53,4"
0017	3. <i>Piper amplum</i> Kunth	Juréia, São Paulo - SP
0031	4. <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth	CUASO, USP, São Paulo - SP
0077	5. <i>Piper aduncum</i> L.	Parque Estadual da Serra do Mar - Trilha da Praia, Picinguaba - SP
0078	6. <i>Piper cyrtopodon</i> (Miq.) C.DC.	Campus do INPA - Manaus - AM
0091	7. <i>Piper crassinervium</i> Kunth	PETAR, São Paulo - SP
0100	8. <i>Piper malacophyllum</i>	Parque Estadual Intervales, São - SP
0103	9. <i>Piper callosum</i> C.DC	Campus do INPA - Manaus - AM
0104	10. <i>Peperomia urocarpa</i> Fisch. & Mey.	Araraquara - SP
0110	11. <i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i> (Jacq.) Yunck.	São Paulo - SP
0127	12. <i>Piper hoffmannseggianum</i> Roem. & Schult.	Ilha Grande - RJ
0136	13. <i>Piper macedoi</i> Yunck.	Araraquara -SP
0137	14. <i>Piper cernuum</i> Kunth	Parque Estadual da Serra do Mar - Trilha da Praia, Picinguaba - SP
0155	15. <i>Peperomia macrostachya</i> (Vahl) A. Dietr.	Manaus -AM
0157	16. <i>Piper nigrum</i> L.	Manaus -AM
0168	17. <i>Peperomia galioides</i> Humb., Bonpl. & Kunth	Poços de Caldas -MG
0169	18. <i>Piper tuberculatum</i> Jacq	Manaus -AM
0172	19. <i>Ottonia martiana</i> Miq.	Bosque do ICB, São Paulo – SP, 766m - S23°33'906" WO46°43'669"
0175	20. <i>Piper solmsianum</i> C. DC.	CUASO, USP, São Paulo - SP
0177	21. <i>Ottonia propinqua</i> Kunth	CUASO, USP , São Paulo - SP
0180	22. <i>Piper macedoi</i> Yunck.	Praia do Félix, Ubatuba - SP
0181	23. <i>Piper hemmendorffi</i> C. DC.	Brotas - SP
0185	24. <i>Piper glabratum</i> Kunth	Brotas -SP
0190	25. <i>Piper amapense</i> Yunck.	Presidente Figueiredo - AM S01°59,293' WO60°03,712'
0192	26. <i>Piper tectoniifolium</i> Kunth	Itatiaia - RJ S22°25,275' WO44°44,389'
0193	27. <i>Piper chimonanthifolium</i> Kunth	Itatiaia -RJ S22°25,275' WO44°44,389'

0194	28. <i>Piper cubataonum</i> C. DC.	Itatiaia - RJ S22°25,649' WO44°37,213'
0195	29. <i>Piper dilatatum</i> Rich.	Itatiaia - RJ S22°25,649' WO44°37,213'
0196	30. <i>Piper hostmannianum</i> (Miq.) C. DC.	Itatiaia - RJ
0202	31. <i>Piper schenckii</i> C. DC.	Itatiaia - RJ
0211	32. <i>Piper pseudopothifolium</i> C. DC.	Itatiaia - RJ
0224	33. <i>Peperomia oreophila</i> Hensch.	Poços de Caldas - MG
0225	34. <i>Peperomia galioides</i> Humb., Bonpl. & Kunth	Poços de Caldas - MG
0226	35. <i>Piper lhotzkyanum</i> Kunth	Poços de Caldas - MG
0235	36. <i>Pothomorphe peltata</i> (L.) Miq.	INPA, Manaus - AM
0236	37. <i>Piper amapense</i> Yunck.	Reserva Ducke, Manaus - AM
0237	38. <i>Piper kegelianum</i> (Miq.) C. DC.	Reserva Ducke, Manaus - AM
0254	39. <i>Piper rivinoides</i> Kunth	Parque Previdência - São Paulo - SP
0283	40. <i>Piper permucronatum</i> Yunck.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0284	41. <i>Peperomia rupestris</i> Humb., Bonpl. & Kunth	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0285	42. <i>Peperomia arifolia</i> Miq.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0289	43. <i>Piper xylostoeoides</i> (Kunth) Steud.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0290	44. <i>Piper richardiifolium</i> Kunth	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0291	45. <i>Peperomia alata</i> Ruiz & Pav.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0293	46. <i>Peperomia glabella</i> var. <i>nervulosa</i> (C. DC.) Yunck.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0295	47. <i>Peperomia serpens</i> (Sw.) Loud.	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0300	48. <i>Peperomia rotundifolia</i> (L.) Humb., Bonpl. & Kunth	Pico do Corcovado, Ubatuba - SP
0312	49. <i>Peperomia circinnata</i> Link	CUASO, USP, São Paulo - SP
0313	50. <i>Peperomia elongata</i> Kunth	CUASO, USP, São Paulo - SP
0314	51. <i>Peperomia pereskiaefolia</i> (Jacq.) Humb., Bonpl. & Kunth	CUASO, USP, São Paulo - SP
0333	52. <i>Peperomia betle</i> L.	USP, São Paulo - SP
0334	53. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0335	54. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0336	55. <i>Piper schenckii</i> C. DC.	USP, São Paulo - SP
0337	56. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0338	57. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0339	58. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP

0340	59. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0341	60. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0342	61. <i>Peperomia</i> sp	USP, São Paulo - SP
0350	62. <i>Piper richardiifolium</i> Kunth	USP, São Paulo - SP
0354	63. <i>Peperomia blanda</i> (Jacq.) Humb., Bonpl. & Kunth	USP, São Paulo - SP
0355	64. <i>Piper regnellii</i> C. DC.	USP, São Paulo - SP

Figura 1.7. Ninfas de *Callocanophora* sp. sugando as seivas dos caules de *Piper aduncum* (Foto, MJK).

Figura 1.8. Besouro adulto de *Naupactus bipes* em folha de *Piper regnellii* (Foto, MJK).

Figura 1.9. Besouro adulto de *Conoderus fuscofasciatus* em folha de *Piper solmsianum* (Foto, MJK).

Figura 1.10. Besouro adulto de *Chasmodia* sp. em frutos de *Piper gaudichaudianum* (Foto, MJK).

Figura 1.11. Acasalamento dos insetos *Sibovia sagata* em folha de *Piper tuberculatum* (Foto, MJK).

Figura 1.12. Lagarta da borboleta *Heraclides hectorides* em folha de *Piper solmsianum* (Foto, MJK).

Figura 1.13 Lagarta da borboleta *Quadrus u-lucida* em folha de *Piper solmsianum* (Foto, MJK).

A primeira etapa constituiu-se na coleta e a preparação dos insetos visando à identificação dos mesmos. Foram identificadas dezesseis espécies de insetos (Tabela 1.2). A primeira análise revelou uma surpreendente especificidade química observada entre ordens de insetos distintas por espécies de piperaceae que possuem determinados metabólitos secundários. Os coleópteros e hemípteros preferem espécies de Piperaceae acumuladoras de ácidos benzóicos prenilados, enquanto os lepidópteros preferem espécies de Piperaceae acumuladoras de lignanas ou neolignanas (Tabela 1.3).

Tabela 1.2. Espécies de insetos identificadas.

Código	Espécies de Insetos
CSR001	1. <i>Naupactus bipes</i> (Germar, 1824), Coleoptera - Curculionidae
CSR002	2. <i>Naupactus basilicus</i> (Germar, 1824), Coleoptera - Curculionidae
CSR003	3. <i>Naupactus versatilis</i> (Hustache, 1947), Coleoptera - Curculionidae
CSR004	4. <i>Chasmodia</i> sp., Coleoptera - Scarabeidae
CSR005	5. <i>Quadrus u-lucida</i> (Plötz, 1884), Lepidoptera - Hesperüdae
CSR006	6. <i>Heraclides hectorides</i> (Esper, 1794), Lepidoptera – Papilionidae
CSR007	7. <i>Heraclides brasiliensis</i> (Rothsch & Jord, 1906), Lepidoptera - Papilionidae
CSR008	8. <i>Conoderus fuscofasciatus</i> , (Eschscholtz, 1829), Coleoptera – Elateratidae
CSR009	9. <i>Edessa meditabunda</i> (Fabricius, 1974), Hemiptera – Pentatomidae
CSR010	10. <i>Membracis foliate</i> , Hemiptera – Membracidae
CSR011	11. <i>Sibovia sagata</i> (Sigworet, 1859), Hemiptera – Cicadellidae
CSR012	12. <i>Callocanophora</i> sp, Hemiptera – Membracidae
CSR013	13. <i>Aethalion reticulatum</i> , Hemiptera – Aethalionidae
CSR014	14. <i>Sibaria armata</i> , Hemiptera – Pentatomidae
CSR015	15. <i>Monoplatus</i> sp., Coleoptera- Chrysomelidae
CSR016	16. <i>Lespesia</i> sp., Diptera - (<i>Lespesia</i> Robineau-Desvoidy, 1830), Tachynidae

Tabela 1.3. Correlação entre espécies de insetos por espécies de Piperaceae.

Insetos	Adultos	Ninfas	Larvas	Piperaceae	Metabólitos Secundários	Referências
<i>N. bipes</i>	Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas		Raízes Raízes	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. aduncum</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. arboreum</i>	Ác. benzóicos prenilados Neolignanas Ác. benzóicos prenilados Ác. benzóicos prenilados Ác. benzóicos prenilados	Lago <i>et al.</i> , 2004. Benevides <i>et al.</i> , 1999. Baldoqui <i>et al.</i> , 1999. - -
<i>N. basilicus</i> <i>N. versatilis</i> <i>Chasmodia</i> sp <i>C. fuscifasciatus</i> <i>Monoplatus</i> sp	Folhas Folhas Frutos Folhas Folhas		Raízes Raízes Raízes	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. solmsianum</i> <i>Peperomia elongata</i>	Ác. benzóicos prenilados Ác. benzóicos prenilados Ác. benzóicos prenilados Lignanas Flavanóides	Lago <i>et al.</i> , 2004. Lago <i>et al.</i> , 2004. Lago <i>et al.</i> , 2004. Martins <i>et al.</i> , 2000. -
<i>Q. u-lúcida</i>			Folhas	<i>P. solmsianum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. callosum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. richardifolium</i>	Lignanas Neolignanas Lignanas Neolignanas Lignanas	Martins <i>et al.</i> , 2000. Benevides <i>et al.</i> , 1999. - - Adalberto <i>et al.</i> , 2005.
<i>H. hectorides</i>			Folhas	<i>Piper</i> sp <i>P. regnellii</i>	Lignanas Neolignanas	- Benevides <i>et al.</i> , 1999.
<i>H. Brasiliensis</i>			Folhas	<i>P. solmsianum</i> <i>P. regnellii</i>	Lignanas Neolignanas	- Benevides <i>et al.</i> , 1999.
<i>M. foliata</i>	Caules	Caules		<i>P. arboreum</i>	Ác. benzóicos prenilados	-
<i>S. sagata</i>	Caules	Caules		<i>P. aduncum</i>	Ác. benzóicos prenilados	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999.
	Folhas	Folhas		<i>P. solmsianum</i>	Lignanas	Martins <i>et al.</i> , 2000.
<i>Callocanophora</i> sp	Caules	Caules		<i>P. turberculatum</i>	Amidas	Navickiene <i>et al.</i> , 2000.
	Caules	Caules		<i>P. gaudichaudianum</i>	Ác. benzóicos prenilados	Lago <i>et al.</i> , 2004.
	Caules	Caules		<i>P. arboreum</i>	Ác. benzóicos prenilados	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999.
<i>A. reticulatum</i>	Caules	Caules		<i>P. aduncum</i>	Ác. benzóicos prenilados	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999.
	Frutos	Frutos		<i>P. aduncum</i>	Ác. benzóicos prenilados	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999.
<i>S. Armata</i>	Frutos	Frutos		<i>P. hispidum</i>	Ác. benzóicos prenilados	-
	Frutos	Frutos		<i>P. arboreum</i>	Ác. benzóicos prenilados	-
	Frutos	Frutos		<i>P. cernuum</i>	Hidroquinonas	-

Coleoptera

Lepidoptera

Hemiptera

O estudo da especificidade entre os coleópteros, lepidópteros, hemípteros por espécies de Piperaceae não foi restrita apenas ao jardim experimental do LQPN. As mesmas relações mostradas na tabela 1.2 também foram observadas nas cidades de Itabuna - Ba, Chapada Diamantina (BA) Poços de Caldas (MG), Ubatuba (SP), Vitória (ES) e na reserva florestal CUASO (IB-USP, SP) durante os períodos de coletas.

Figura 1.13. Colônia de hemípteros sugando as seivas do caule de *P. aduncum*, Chapada Diamantina – BA (Foto, MJK).

Devido à estreita especificidade química relacionada com a ordem de insetos e metabólitos secundários observada na etapa inicial deste trabalho, os resultados envolvendo a ecologia química entre insetos e Piperaceae foi organizada por ordem de insetos: Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera.

Capítulo 2

Ecologia química entre Coleoptera e espécies de Piperaceae

2.1 – Introdução

A ordem Coleoptera agrupa insetos conhecidos popularmente como besouros que constituem-se na maior ordem no reino animal, com cerca de trezentos e cinquenta mil espécies descritas (Herrera e Pellmyr, 2002). Ocorrem em quase todas as partes do mundo, em habitats terrestres que vão desde topos de montanhas até o litoral, de florestas a desertos, em cavernas subterrâneas e habitat de água doce. Os besouros não são observados no Antártico, cerca de 60° S, em habitat marinho aberto e habitat extremo como lagos hiper-salinos (Olsen *et al.*, 1995).

O comportamento de besouros adultos é muito variável, pode ser noturno ou diurno, ter ciclo de vida longo ou curto, ser conspícuo e prontamente aparentes, imperceptíveis e camuflados. Alimentam-se de uma grande variedade de materiais vegetais e animais. Todas as partes de plantas vivas ou em decomposição podem ser utilizadas, também fungos, algas e lodo. Espécies predadoras alimentam-se de uma larga variedade de invertebrados terrestres ou aquáticos, e algumas das espécies maiores de água doce atacam peixes pequenos.

2.1.1 - Importância econômica

Devido ao número enorme de espécies de besouros e, por ocuparem uma variedade de habitats, muitos interagem inevitavelmente e diretamente com a espécie humana. Os que atacam culturas ou danificam colheitas ou produtos estocados são considerados insetos pragas (Barfield e Stimac, 1980). No entanto, algumas espécies podem ser benéficas como àquelas que vêm sendo utilizadas em controle biológico de pestes e ervas daninhas ou como polinizadores. Os predadores Coccinellidae fornecem os melhores exemplos entre os besouros (*Rodolia cardinalis* e *Cryptolaemus montrouzieri*)

de controle biológico clássico. Além dos predadores Coccinellidae, várias espécies fitófagas pertencentes à famílias Chrysomelidae e Curculionidae têm sido usadas no controle biológico de ervas daninhas (Oliveira e Filho, 1998).

2.1.2 - Ecologia química entre besouros e espécies de Piperaceae

O único relato sobre a ecologia química entre Piperaceae e besouros foi descrito por Dyer (2000), que trata de um comensalismo entre *Piper marginatum* Jarq. e uma espécie não identificada do besouro do Colorado. Outros trabalhos envolvendo espécies de Piperaceae e besouros abrangem apenas o potencial inseticida dos metabólitos da planta contra os besouros pragas, como no caso do besouro da batata do Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Scott *et al.*, 2003).

2.2 - Resultados e discussões

No canteiro de plantas do LQPN foram identificadas, durante o período de 09/2000 a 01/2004, seis espécies de besouros hospedeiros de Piperaceae.

2.2.1 - Taxonomia dos insetos

Informações Taxonômicas

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Curculionidae
Gênero	<i>Naupactus</i>
Espécie	<i>N. bipes</i>
Nome popular	gorgulho

Naupactus bipes

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *Piper gaudichaudianum*, *P. aduncum*, *P. regnellii*, *P. arboreum* e *P. hispidum*.

Informações Taxonômicas

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Curculionidae
Gênero	<i>Naupactus</i>
Espécie	<i>N. basilicus</i>
Nome popular	gorgulho

N. basilicus

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Planta hospedeira: *P. gaudichaudianum*

N. versatilis**Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Curculionidae
Gênero	<i>Naupactus</i>
Espécie	<i>N. versatilis</i>
Nome popular	gorgulho

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Planta hospedeira: *P. gaudichaudianum*.

Chasmodia sp**Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Scarabeidae
Gênero	<i>Chasmodia</i>
Espécie	<i>Chasmodia sp</i>
Nome Popular	-

Método: Acervo de coleção.

Local e data de coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 29/10/00.

Planta hospedeira: *P. gaudichaudianum*.

C. fuscofasciatus**Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Elateridae
Gênero	<i>Conoderus</i>
Espécie	<i>C. fuscofasciatus</i>
Nome Popular	-

Método: Acervo de Coleção.

Local e data de coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 09/10/00.

Planta hospedeira: *P. solmsianum*.

Monoplatus sp**Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Coleoptera
Família	Chrysomelidae
Gênero	<i>Monoplatus</i>
Espécie	<i>Monoplatus sp</i>
Nome Popular	-

Método: Acervo de Coleção.

Local e data de coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 09/01/05.

Planta hospedeira: *Peperomia elongata*.

2.2.2 - Ecologia química entre *Naupactus bipes* e espécies de Piperaceae

O gênero *Naupactus* pertence à família Curculionidae, conhecida como a família dos gorgulhos, que inclui mais de 150 espécies distribuídas no neotrópicos, do México à Argentina, sendo a maior diversidade encontrada no Brasil com 140 espécies (Wibmer e O'Brien, 1986; O'Brien e Wibmer, 1982).

No estado de São Paulo foram relatadas oito espécies de *Naupactus* predando folhas de frutas cítricas: *N. dejean*, *N. rivulosus*, *N. tarsalis*, *N. curtus*, *N. navicularis*, *N. versatilis*, *N. ambiguus* e *N. cervinus* (Lanteri *et al.*, 2002). No sul do país, espécies de *Naupactus* predam as lavouras de soja e linho, enquanto no sul da Bahia, predam a lavoura de cacau. Os besouros adultos se alimentam de folhas e as larvas consomem as raízes avidamente. Espécies de *Naupactus* possuem uma relação química estreita com a planta na fase larval, enquanto o adulto é considerado freqüentemente polífago.

Uma população do besouro *N. bipes* foi observada alimentando-se de folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. hispidum*, *P. aduncum* e *P. arboreum* demonstrando uma especificidade inesperada para um inseto pertencente a um gênero considerado polífago. O besouro possui um ciclo de vida anual onde a presença de adultos é observada de novembro a fevereiro. Não existem relatos na literatura de plantas hospedeiras do besouro *N. bipes* em habitat natural bem como a sua ocorrência em lavouras.

2.2.2.1 - Função ecológica dos óleos voláteis de espécies de *Piper* no comportamento do *N. bipes*

Com o objetivo de determinar as bases das preferências alimentares do besouro *N. bipes* por folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. hispidum* foram investigados os constituintes presentes nos óleos voláteis das folhas dessas três espécies. Os óleos foram obtidos por hidrodestilação e analisados por EAG usando a antena do *N. bipes*. Os óleos voláteis de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. hispidum* mostraram respostas de EAG positivas de acordo com as observações de campo.

O experimento de EAG foi realizado para elucidar a seletividade das antenas receptoras de *N. bipes* frente aos óleos voláteis de *P. regnellii*, *P. hispidum* e *P. gaudichaudianum*. Foram utilizadas concentrações diferentes (1, 10, e 100 mg/mL) dos óleos voláteis das três espécies de *Piper*, na quantidade de 5µL no papel e aspergidas sobre as antenas em intervalo de 30 segundos após cada medida.

As médias das respostas dos eletroantenogramas obtidas com as antenas dos machos de *N. bipes*, usando uma concentração de 100mg/mL, indicaram que as antenas

dos machos apresentaram resposta significativa para os óleos voláteis das três espécies (Figura 2.1), o que está de acordo com as observações em campo.

Figura 2.1. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas dos machos de *N. bipes* em óleos voláteis de folhas de *P. regnellii*, *P. hispidum* e *P. gaudichaudianum* (100 mg/mL) Tukey ($P < 0,05$).

A figura 2.2 mostra as médias das respostas dos eletroantenogramas obtidas com as antenas das fêmeas de *N. bipes*, usando uma concentração de 100mg/mL.

Figura 2.2. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas de fêmeas de *N. bipes* em óleos voláteis de folhas de *P. regnellii*, *P. hispidum* e *P. gaudichaudianum* (100 mg/mL) Tukey ($P < 0,05$).

Observa-se novamente uma resposta significativa para os três óleos das espécies de *Piper*, porém foram observadas respostas bem mais intensas do que as respostas dos machos. No caso das antenas dos machos a resposta média máxima foi cerca de 370 mV, enquanto para as antenas das fêmeas a resposta foi de 530mV.

Os experimentos com diferentes concentrações de *P. hispidum* mostraram uma relação linear entre as concentrações do óleo volátil e as respostas das antenas do inseto, até sua saturação (Figura 2.3).

Figura 2.3. Média (%) das respostas eletroantenográficas das antenas de *N. bipes* em diferentes concentrações do óleo volátil de *P. hispidum* Tukey ($P < 0,05$).

2.2.2.2. Respostas dos experimentos de eletroantenograma GC/EAD

Em uma etapa seguinte aos experimentos de EAG, foi realizado experimento de CG/EAD no intuito de identificar a(s) substância(s) responsável (eis) pelas respostas apresentadas no EAG.

Assim, os óleos voláteis das folhas de *P. regnellii*, *P. hispidum*, e *P. gaudichaudianum* obtidos por hidrodestilação foram analisados por CG/FID e CG/EM. Com base nas interpretações dos espectros de massas e por comparação dos índices de Kovats relatados, a composição química e percentual de cada óleo foi determinada (Tabela 2.1).

Os óleos essenciais das folhas de *P. regnellii*, *P. hispidum*, e *P. gaudichaudianum* também foram analisados por CG-HeadSpace e os resultados obtidos comparados com os resultados das análises obtidos por hidrodestilação, sendo ambos resultados idênticos.

Tabela 2.1. Composições percentuais dos óleos essenciais das folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. hispidum*.

Substâncias	Índice de Kovats descrito (Adams, 1995)	Quantidade relativa (%) no óleo (medidas do índice de Kovats)		
		<i>P. gau.</i>	<i>P. reg.</i>	<i>P. his.</i>
2-Metill 4-heptanona	923	0,9 (922)		
Triciclono	926	0,41 (929)		0,11 (923)
Tetraidro citronelono	936	0,99 (966)		
α -Pineno	939		0,21 (923)	6,90 (930)
Fencheno	951		0,17 (943)	
β -Pineno	980	1,04 (971)		9,76 (972)
Mirceno	991	0,16 (989)	3,25 (991)	0,93 (989)
<i>p</i> - Menta-dieno 1,7,8	1004	0,09 (1004)		
Isosilvestreno	1007		0,14 (1014)	
δ -3-Careno	1011			0,14 (1008)
δ -2-Careno	1001			0,05 (1014)
<i>o</i> -Cimeno	1022		0,45 (1022)	
Silvestreno	1027		3,31 (1025)	1,58 (1025)
Limoneno	1031	5,38 (1025)		
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1050		0,46 (1046)	
γ -Terpineno	1062	0,89 (1046)	0,23 (1056)	0,10 (1055)
<i>p</i> -Menta-2,4,8-dieno	1086		0,10 (1085)	0,05 (1085)
Linalol	1098		5,96 (1101)	
<i>cis</i> -oxido-Limoneno	1134		0,20 (1127)	
Mentol	1173		0,11 (1171)	
4-Terpinol	1177		0,33 (1177)	0,13 (1176)

α -Terpinol	1189		0,98 (1189)	0,06 (1189)
Acetato de bornil	1285		0,28 (1281)	
δ -Elemeno	1339	0.16 (1332)	0,19 (1333)	
α -Cubebeno	1351		0,20 (1346)	0,79 (1345)
Ciclosativeno	1368	0.28 (1345)		0,61 (1359)
α -Copaeno	1376	0.81 (1371)	0,58 (1372)	3,96 (1372)
β -Bourboneno	1384			0,19 (1380)
β -Cubebeno	1390			0,26 (1387)
α -Gurjuneno	1409	1,21 (1406)		0,42 (1406)
Cariofileno	1418			4,97 (1416)
β -Gurjuneno	1432	2,89 (1436)	0.23 (1426)	4,86 (1426)
γ -Elemeno	1433			0,28 (1431)
α -Guaiano	1439	0,21 (1440)		0,31 (1436)
Aromadendreno	1439		0,61 (1436)	
α -Humuleno	1454	23,60 (1452)	0,34 (1451)	
Diidro aromadendrano	1459			0,17 (1441)
<i>Allo</i> -aromadendreno	1461	2,67 (1458)		
γ -Muroleno	1477	1,73 (1475)		7,07 (1476)
Germacreno D	1480	0,97 (1479)		
β -Selineno	1485	2,48 (1484)		1,68 (1484)
Viridifloreno	1493			4,25 (1493)
Biciclogermacreno	1494		2,99 (1495)	
α -Muroleno	1499		0,32 (1499)	3,48 (1500)
γ -Cadineno	1513			5,30 (1513)
Cadineno	1514	1,62 (1513)		
δ -Cadineno	1524	2,15 (1522)	2,05 (1523)	5,09 (1523)
Cadina-1,4-dieno	1532			0,88 (1531)
(<i>Z</i>)-Nerolidol	1534	1,79 (1564)		

Selina-3,7(11)dieno				0,78 (1539)
Germacreno-B	1556		0.16 (1554)	0,74 (1555)
(<i>E</i>)-Nerolidol	1564		4.00 (1564)	6,30 (1566)
Spatulenol	1576	1,29 (1575)		
Óxido de cariofileno	1581	2,82 (1580)		0,88 (1595)
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	0.99 (1622)		1.40 (1622)
1- <i>epi</i> - α -Cadinol	1640	1,06 (1633)		
<i>epi</i> - α -Murolol	1641	0,97 (1645)	0,80 (1635)	0,92 (1635)
α -Murolol	1645		0,49 (1639)	
α -Cadinol	1653		0,72 (1646)	
α -14-Hidroxi-muroleno	1775			0,19 (1774)

O óleo volátil das folhas de *P. hispidum* mostrou uma resposta mais acentuada em relação aos óleos de *P. gaudichaudianum* e *P. regnellii* na análise de EAG e por isso, o mesmo foi analisado por EAD. Assim, o óleo de *P. hispidum* foi submetido à análise simultânea de CG/FID e CG/EAD mostrando que as antenas dos besouros machos e fêmeas são sensíveis às substâncias associadas aos picos **T1-T6** (Figura 2.4). As substâncias ativas **T1**, **T2**, **T3**, **T5** e **T6** foram identificadas como sendo os monoterpenos α -pineno, β -pineno, mirceno e o sesquiterpeno germacreno, respectivamente. A substância **T4** não pôde ser identificada devido à baixa intensidade relativa de seu pico, impossibilitando a obtenção de um espectro de massas confiável.

Figura 2.4. Os cromatogramas (CG) do óleo volátil de *P. hispidum* com detecção simultânea por FID (superior) e por EAD (inferior) usando uma antena de um *N. bipes*. Os picos **T1**, **T2**, **T3**, **T5** e **T6** foram identificados como sendo os terpenóides α -pineno, β -pineno, mirceno, α -copaeno e germacrema, respectivamente.

Figura 2.5. Compostos voláteis bioativos de *P. hispidum* frente às antenas do besouro *N. bipes*.

2.2.2.3 - Teste de múltipla escolha alimentar em condições de laboratório

Um teste de múltipla escolha alimentar em condições de laboratório foi realizado colocando-se oito indivíduos do besouro *N. bipes* em um recipiente de vidro fechado na presença de folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. hispidum*, *P. aduncum* e *P. arboreum* (duplicata). O intuito do teste foi avaliar se haveria a mesma especificidade observada em campo. Após um período de uma semana, os besouros alimentavam-se apenas de folhas de *P. gaudichaudianum* (Figura 2.6), apesar do experimento de EAG ter mostrado que as antenas dos besouros machos são mais estimuladas pelo óleo de *P. hispidum* e as antenas das fêmeas pelo óleo de *P. regnellii*.

Figura 2.6. Folhas de espécies de *P. hispidum* (a), *P. arboreum* (b), *P. gaudichaudianum* (c), *P. aduncum* (d) e *P. regnellii* (e), após uma semana na presença de oito espécimes de *N. bipes* (Foto, CSR).

No experimento seguinte, as folhas de *P. gaudichaudianum* foram retiradas e os besouros começaram a alimentar-se das folhas de *P. regnellii* remanescentes. As folhas de *P. regnellii* também foram retiradas, e na presença das folhas remanescentes de *P. hispidum*, *P. aduncum* e *P. arboreum* os besouros cessaram sua alimentação. A especificidade do *N. bipes*, primeiro por folhas de *P. gaudichaudianum* e, depois, por folhas de *P. regnellii* foi corroborada com ocorrência das larvas em raízes de *P. gaudichaudianum* e *P. regnellii*.

Figura 2.7. Folhas de *P. gaudichaudianum* predadas pelo besouro *N. bipes* em campo (Foto, CSR).

Figura 2.8. Folha de *P. gaudichaudianum* sendo predada pelo besouro *N. bipes* em condições de laboratório (Foto, MJK).

Figura 2.9. Larva de *N. bipes* coletada em raízes de *P. regnellii* (Foto, MJK).

Figura 2.10. Besouro *N. bipes* recém emergido criado em raízes de *P. regnellii* em condições de laboratório (Foto, CSR).

2.2.2.4 - Seqüestros e biotransformações de metabólitos secundários de espécies de *Piper* por *Naupactus bipes*

2.2.2.4.1 - *P. gaudichaudianum* e *N. bipes*

Em função de a preferência alimentar demonstrada pelo besouro *N. bipes* pelas folhas de *P. gaudichaudianum*, tanto em condições de campo como de laboratório, foi primeiramente investigada a possibilidade do besouro seqüestrar metabólitos secundários desta planta hospedeira. Assim, os extratos das folhas, raízes, frutos e caules de *P. gaudichaudianum* bem como os extratos dos tecidos do besouro (fezes, corpo e ovos), mantidos em laboratório por 48 h em jejum, foram analisados por CLAE (Figura 2.11). Os perfis cromatográficos dos extratos dos besouros e da planta mostraram picos com t_{rs} similares indicando acúmulos de metabólitos de *P. gaudichaudianum* em *N. bipes*.

A substância majoritária das folhas de *P. gaudichaudianum* foi identificada como sendo o ácido gaudichaudiânico (**C2**), um novo produto natural. Este foi também detectado nos extratos do corpo, ovos e fezes do besouro *N. bipes*. A substância **C3**, éster metílico de **C2**, um novo produto natural, foi detectada no material fecal como o constituinte majoritário, e em menor proporção relativa nos extratos das folhas, nos tecidos dos corpos e ovos do besouro (Figura 2.11).

Observam-se no cromatograma do extrato dos tecidos do corpo do besouro a presença de duas substâncias adicionais com t_{rs} semelhantes aos picos **C1** e **P1**, associados aos constituintes majoritários das raízes de *P. gaudichaudianum*. As substâncias **C1** e **P1** foram isoladas dos extratos das raízes e identificadas como sendo 2,2-dimetil-6-carboxicromeno-4-ona e o taboganato de metila, respectivamente. A análise por CG/EM do extrato do corpo do besouro confirmou a presença das substâncias **C1** e **P1** também nos tecidos do besouro.

Figura 2.11. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos de *P. gaudichaudianum* (folhas e raízes) e de *N. bipes* (insetos, fezes e ovos).

Embora a substância **C1** possa ter sido formada a partir de **P1** por uma reação do tipo Michael durante a extração com CH₃OH e CH₂Cl₂, ambas as substâncias foram detectadas no extrato fresco através de análise por CLAE.

A presença das substâncias **C1** e **P1** em tecidos do besouro foi surpreendente devido à ausência das mesmas no extrato das folhas. Considerando o fato de que o besouro adulto alimenta-se apenas das folhas e das larvas de raízes, a hipótese plausível para a presença das substâncias **C1** e **P1** no corpo do besouro, seria o seqüestro de **C1** e **P1** pelas larvas e acúmulo até fase adulta. Está hipótese foi corroborada com a presença de larvas em raízes de *P. gaudichaudianum* em três gerações seguintes do besouro *N. bipes*. A análise de CG/EM do extrato das larvas confirmou a presença das substâncias **C1** e **P1**.

Para explorar a hipótese do seqüestro a partir da fase larval foram coletados em campo espécimes de *N. bipes* em espécies de *P. regnellii*, *P. hispidum*, *P. arboreum*. Os espécimes coletadas foram mantidos separadamente em cativeiro durante um período de uma semana, com dieta constituída de folhas de suas respectivas plantas de onde foram coletados. Após esse período, os besouros foram mantidos em jejum por 48 horas para análises em CLAE e CG/EM. Em todos os cromatogramas dos extratos dos tecidos dos besouros foram observados picos associados às substâncias **C1** e **P1** (Figuras 2.12 e 2.13).

Os besouros de *N. bipes* macho e fêmea apresentaram concentrações significativas das substâncias P1, C1, C2 e C3 (Tabela 2.2).

Substâncias	Besouro <i>N. bipes</i> macho		Besouro <i>N. bipes</i> fêmea	
	µg/mg (Peso seco, <i>n</i> = 5)	µg/indivíduo	µg/mg (Peso seco, <i>n</i> = 6)	µg/indivíduo
C1	1,3896	55,36	1,3575	66,13
P1	1,5251	60,76	1,1078	53,96
C3	0,9357	37,28	0,9798	47,73
C2	0,6677	26,6	0,5919	28,83

A presença das substâncias **C1** e **P1** nos extratos dos besouros com dieta constituída de folhas de *P. arboreum*, *P. hispidum* e *P. regnellii* foi confirmada por análise em CG/EM.

Figura 2.12. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos dos tecidos de espécimes de *N. bipes* mantidos em cativeiros com folhas de *P. arboreum*, *P. hispidum* e *P. regnellii*.

Figura 2.13. Perfil cromatográfico (CG) do extrato do besouro com dieta constituída de folhas de *P. arboreum*.

2.2.2.4.2 - *P. regnellii* e *N. bipes*

Considerando-se que larvas de gerações posteriores de *N. bipes* foram também observadas alimentando-se das raízes de *P. regnellii*, o seqüestro de metabólitos secundários desta planta hospedeira pelo besouro durante a sua fase larval e adulta foi também investigado.

Larvas alimentando-se em raízes de *P. regnellii* foram coletadas e mantidas em laboratórios até a fase de besouro adulto, sendo que três larvas tiveram seus extratos analisados por CLAE e CG/EM. Dois insetos recém emergidos sem ingestão de alimento foram extraídos e analisados por CLAE e CG/EM. Os demais insetos emergidos foram mantidos com dieta constituída de folhas de *P. regnellii* durante um período de uma semana para obtenção de fezes. Após esse período, foram obtidos os extratos fecais e dos corpos dos insetos, e ambos foram analisados em CLAE e CG/EM.

O perfil cromatográfico dos extratos dos tecidos do corpo do besouro adulto mostrou um pico com t_r similar ao pico correspondente ao conocarpano (**N1**), constituinte majoritário nas raízes e folhas de *P. regnellii* (Figura 2.14). A presença do conocarpano nos tecidos dos besouros adultos (recém eclodido e com dieta constituída de folhas de *P. regnellii*) foi confirmada por análise em CG/EM, indicando que este é seqüestrado das raízes e/ou folhas de *P. regnellii*, 80 µg/indivíduo.

Figura 2.14. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos de tecidos of *P. regnellii* (folhas e raízes) e dos tecidos de *N. bipes* (insetos, fezes e larvas).

Considerando-se que o cromatograma do extrato fecal indicou a presença de quatros picos (**N5-N8**) ausentes no cromatograma dos extratos das raízes e folhas, o extrato fecal foi submetido a etapas de purificação que resultaram no isolamento das substâncias **N5** e **N7** puras.

A análise do espectro de massas da substância **N5** indicou um íon molecular de m/z 254 Da que corresponde à fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$. Seu espectro de RMN de 1H foi muito similar ao espectro do conocarpano (**N1**), mas ao invés da unidade propenila mostrou a presença de um hidrogênio aldeídico em δ 9,85 (s, 1H). Assim, baseados nos dados de EM e RMN de 1H a estrutura da substância **N5** foi identificada como (7*R*,8*R*)-4-hidróxi-8',9'-dinor-4'7-epóxi-8,3'-neolignana-7'aldeído (decurrenal), previamente isolada das folhas de *Piper decurrens* (Chauret *et al.*, 1996).

O espectro de massas da substância **N7** mostrou um íon molecular, m/z 280 Da, em acordo com a fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_3$ como indicada por análise elementar.

Seu espectro de RMN de 1H também indicou a presença de um hidrogênio aldeídico como no caso da substância **N5**. Entretanto, o sinal deste hidrogênio aparece como um dubleto em δ 9,59 (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz) devido ao acoplamento com um sinal em δ 6,55 (1H, *dd*, $J = 7,7$ e 15,8 Hz, H-8') e este, por conseguinte, acopla com aquele em δ 7,37 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz, H-7'), sugerindo a presença do substituínte propenal. Os demais sinais em δ 5,12 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz, H-7), δ 3,57 (1H, *m*, H-8), δ 0,84 (3H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-9), δ 7,23

($d, J = 8,5$ Hz, H-2/H-6) e em δ 6,81 ($d, J = 8,5$ Hz, H-3/H-5) foram associados a ambos os anéis aromáticos e di-hidrobenzofurano, semelhantemente aos observados no espectro do conocarpano (Benevides *et al.*, 1999). Assim, esta substância foi estabelecida como sendo o 4-hidroxi-8',9'-dinor-4',7-epóxi-8,3'-neolignana-7'-[*E*]-eno-aldeído.

As estruturas das substâncias **N6** e **N8** foram identificadas com base nas interpretações de seus espectros de massas por análises em CG/EM e CLAE/EM devido a reduzida quantidade de massas relativas, aos constituintes majoritários **N5** e **N7** do extrato fecal.

Considerando-se que as substâncias **N5-N8** não foram detectadas nas folhas e raízes de *P. regnellii*, estas substâncias provavelmente são formadas a partir da clivagem oxidativa e oxidação alílica das neolignananas **N1-N4** durante o metabolismo em *N. bipes* (Figura 2.16).

Figura 2.15. Metabólitos isolados das folhas de *P. regnellii*.

Figura 2.16. Neolignanas **N1-N3** de *P. regnellii* e suas respectivas reações de biotransformações durante o processo digestivo do besouro *N. bipes*.

2.2.2.4.3 - *P. arboreum* e *N. bipes*

Considerando-se que a ocorrência de *N. bipes* em *P. arboreum* é restrita apenas a presença de alguns poucos indivíduos e que não foi observada a presença de larvas nas raízes, somente o metabolismo dos metabólitos secundários acumulados nas folhas foi investigado.

Apesar de estudos fitoquímicos prévios das folhas, raízes e caules de *P. arboreum* indicarem a ocorrência de amidas, figura 2.17 (Silva *et al.*, 2002), os espécimes cultivados no canteiro do LQPN não acumulam amidas nas folhas, mas um novo produto natural o ácido benzóico prenilado (**P2**), constituinte majoritário.

Figura 2.17. Amidas previamente isoladas de *P. arboreum*.

O perfil cromatográfico (CLAE) do extrato das fezes do besouro *N. bipes* com dieta constituída das folhas de *P. arboreum* indicou um pico majoritário (**P3**) ausente no cromatograma do extrato das folhas e uma menor proporção relativa da substância **P2** em relação às folhas (Figura 2.18). A substância **P3** foi identificada como sendo produto da biotransformação de **P2** durante o processo digestivo do besouro.

Figura 2.18. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de *P. arboreum* e fecal do besouro *N. bipes*.

2.2.2.4.4 - *P. hispidum* e *P. aduncum*

A investigação fitoquímica de *P. hispidum* havia demonstrado a presença de amidas (Navickiene *et al.*, 2000; Alécio *et al.*, 1998) e flavonóides; (Vieira *et al.*, 1980; Burke e Nair, 1986). Os espécimes cultivados no canteiro LQPN acumulam flavonóides e um novo ácido benzóico prenilado (**P4**).

Figura 2.19. Metabólitos secundários isolados de *P. hispidum*.

No caso de *P. aduncum* constatou-se a presença do dilapiol e ácidos benzóicos prenilados como previamente relatados (Baldoqui *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 1998).

Figura 2.20. Metabólitos secundários isolados de *P. aduncum*

Para ambas as espécies, *P. aduncum* e *P. hispidum*, não foi possível a investigação do metabolismo de seus metabólitos secundários no besouro *N. bipes* por falta de obtenção do material fecal.

2.2.2.4.5 - Espécies de *Piper* não hospedeiras

Algumas espécies de *Piper* não hospedeiras do besouro *N. bipes* como *P. solmsianum* e *P. tuberculatum* acumulam lignanas tetraidrofurânicas e amidas, respectivamente. Essas substâncias são bem conhecidas devido as suas atividades

inseticidas e deterrentes (Miranda *et al.*, 2003; Nawrot e Harmathan, 1994). Assim, os metabolismos destas substâncias foram investigados em *N. bipes*.

2.2.2.4.5.1 - Metabolismo das lignanas de *P. solmsianum*

O besouro *N. bipes* não tem preferência por folhas de *P. solmsianum* em condições de campo, entretanto, o besouro se alimenta destas ao serem fornecidas através de dieta em laboratório.

As folhas de *P. solmsianum* acumulam o fenilpropanóide (*E*)-isoelemicina (**F1**) e a lignana tetraidrofurana (-)-grandisina (**L1**), previamente relatadas (Martins *et al.*, 2000; Martins, 2002; Martins *et al.*, 2003).

Figura 2.21. Metabólitos secundários isolados das folhas de *P. solmsianum*.

Os extratos das folhas de *P. solmsianum* e das fezes do besouro foram analisados por CLAE. O perfil cromatográfico do extrato das fezes mostrou uma depleção completa da (*E*)-isoelemicina, mas uma quantidade remanescente da (-)-grandisina e a presença de picos adicionais que não apareciam no cromatograma do extrato das folhas (Figura 2.22).

Figura 2.22. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de *P. solmsianum* e das fezes de *N. bipes*.

As substâncias associadas aos picos **L2-L3** e **F2-F3** foram purificadas por métodos cromatográficos e as suas estruturas determinadas pela interpretação dos dados espectrométricos de EM, RMN de ^1H e de ^{13}C .

As análises dos espectros de massas das substâncias **L2-L3** e **F2-F3** indicaram os íons moleculares de m/z 210 (**F3**), m/z 224 (**F2**), m/z 404 (**L3**) e m/z 418 (**L2**). Os íons moleculares das substâncias **L2** e **L3** têm 14 e 28 unidades a menos em relação ao íon molecular da (-)-grandisina (**L1**, m/z 432), respectivamente. Os padrões de fragmentações das substâncias **L2** e **L3** estão de acordo com o esperado para as estruturas das lignanas *O*-desmetilgrandisina e di-*O*-desmetilgrandisina, respectivamente (Figura 2.23).

Figura 2.23. Espectros de massas (IE) das lignanas **L1**, **L2** e **L3** e as estruturas de seus respectivos íons correspondentes aos picos bases.

As estruturas de **L2** e **L3** foram confirmadas por comparação de seus dados de RMN de ^1H com os dados da literatura (Barbosa-Filho *et al.*, 1989). Além disso, o espectro de massas e o tempo de retenção em CLAE/EM e GC/EM de **L3** coincidiram com a substância autêntica sintetizada de acordo com um procedimento descrito (Sarkanen e Wallis, 1973). Assim, as substâncias **L2** e **L3** foram definidas como produtos da biotransformação da (-)-grandisina (**L1**) durante o processo digestivo do besouro *N. bipes* (Figura 2.24).

Figura 2.24. Reação de biotransformação da lignana **L1** durante o processo digestivo do besouro *N. bipes*.

O espectro de IE-EM da substância **F2**, metabólito principal nas fezes, apresentou um pico correspondente ao íon molecular em m/z 224 compatível com a fórmula molecular de $C_{12}H_{16}O_4$. Com base em seus dados espectroscópicos de RMN de 1H e de ^{13}C e IV, a mesma foi identificada como sendo o álcool 3,4,5-trimetoxicinâmico previamente relatado na literatura (Sadik *et al.*, 2003).

A estrutura da substância referente ao pico **F3** foi determinada com base na semelhança de seus dados espectroscópicos com a da substância **F2**. Seu espectro de RMN de 1H mostrou um par de hidrogênios aromáticos em δ 6,66 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-6) e em δ 6,51 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2), hidrogênios metilênicos em δ 4,32 (2H, dd, $J = 5,7$ Hz e 1,3, H-9), dois hidrogênios olefínicos em δ 6,47 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-7) e em δ 6,27 (1H, dt, $J = 15,8$ e 5,7 Hz, H-8). Adicionalmente, a presença de dois grupos metoxílicos em δ 3,86/3,84 e de uma hidroxila fenólica em δ 6,46 é compatível com a assimetria do anel aromático. Assim, a estrutura da substância **F3** foi determinada como sendo o álcool 3-hidróxi-4,5-metoxicinâmico. Esta estrutura foi confirmada através da comparação de seus dados espectroscópicos de RMN de 1H e de ^{13}C com aqueles obtidos para a substância previamente isolada das raízes de *Ferula sinaica* (Ahmed, 1991).

Duas hipóteses para a formação das substâncias **F2** e **F3** foram investigadas. Na primeira, as substâncias **F2** e **F3** presentes nas fezes do besouro *N. bipes* poderiam ter sido liberadas ou produzidas pela planta em resposta ao ataque do besouro, mas não seriam metabólitos predominantemente constitutivos. Essa assertiva encontra suporte quando se comparam os extratos das folhas de *P. solmsianum* não predadas e predadas pelo besouro através de uma análise por CLAE (Figura 2.25).

Figura 2.25. Comparação do perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de *P. solmsianum* predadas pelo besouro *N. bipes* e das folhas não predadas. As setas indicam os picos referentes às substâncias ausentes nas folhas não predadas.

Observa-se no cromatograma das folhas predadas de *P. solmsianum* que a planta responde quimicamente a predação pelo besouro produzindo cinco substâncias além da (-)-grandisina (**L1**) e isoelemicina (**F1**). Porém, nenhum desses picos corresponde às substâncias **F2** ou **F3** (Figura 2.26).

Figura 2.26. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de *P. solmsianum* predadas pelo besouro *N. bipes* e fezes do besouro tratado com folhas de *P. solmsianum*.

A hipótese alternativa seria a hidrólise das formas glicosiladas de **F2** e **F3** ligadas à parede celular, ou livre nas folhas, pela ação de β -glucosidases durante o processo digestivo do besouro. Assim, foi obtido o extrato polar e da parede celular das folhas de *P. solmsianum* para verificar a presença das substâncias glicosiladas através da análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Apenas no extrato polar foi observada a presença de fenilpropanóides glicosilados. O espectro de RMN de ^1H de uma fração butanólica pré-purificada mostrou um singleto em δ 7,00 relativo aos hidrogênios aromáticos, dois dubletos em 6,34 e 6,18 ($J = 15$ Hz) referentes aos hidrogênios olefinicos em configuração *E*, dois singletos relativo aos grupos metoxílicos em δ 3,97 e 3,94, sugerindo a estrutura de um fenilpropanóide trimetoxilado. O envelope de sinais entre δ 3,76-3,39 foram atribuídos aos hidrogênios de açúcares ligados ao fenilpropanóide (Figura 2.27).

Figura 2.27. Espectro de RMN de ^1H de uma fração pré-purificada do extrato polar das folhas de *P. solmsianum*.

O 3,4,5-trimetoxicinamato de D-glucosila foi identificado no extrato polar das folhas de *P. solmsianum*. Entretanto, o álcool 3,4,5-trimetoxicinâmico não foi identificado, pois o duplo dubleto em δ 4,32, característico dos dois hidrogênios metilênicos do álcool, não foi observado. Assim, a substância **F2** pode ser produto da hidrólise do 3,4,5-trimetoxicinamato de D-glucosila durante o processo digestivo de besouro ou ser produto da hidroxilação na metila terminal do fenilpropanóide **F1** (Figura 2.28). Este tipo de reação foi anteriormente observado para o fenilpropanóide *trans*-anetol após ser administrado de forma oral e tópica no último estágio da larva de *Spodoptera litura* e *Trichoplusia ni* (Passreiter *et al.*, 2004).

A substância **F3** pode ser produto da biotransformação de **F1** e/ou a partir de **F2** durante o processo digestivo do besouro *N. bipes*.

Figura 2.28. Provável origem das substâncias **F2** e **F3** isoladas das fezes de *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. solmsianum*.

2.2.2.4.5.2 - Metabolismo das amidas de *P. tuberculatum* em *N. bipes*

As amidas isoladas de Piperaceae e seus derivados sintéticos apresentam grande interesse devido as suas potentes atividades inseticidas e fungicidas (Dyer *et al.*, 2004; Alécio *et al.*, 1998; Scott e McKibben, 1978; Yang *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2002; Dyer *et al.*, 2001; 2003; McFerren e Rodriguez, 1998). Várias amidas isobutílicas, pirrolidínicas, desidropiridônicas e piperidínicas têm sido isoladas de espécies de Piperaceae (Parmar, 1997; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002; Alécio *et al.*, 1998). A amida pipericida isolada dos frutos de *Piper nigrum* mostrou atividade inseticida contra o gorgulho do feijão *Callosobruchus chinensis* (Miyakado *et al.*, 1979), e outras amidas como piperina, ticlonina e piplartina são tóxicas para a mosca da fruta e muitas outras espécies de insetos (Bernard *et al.*, 1995). Entretanto, não existem relatos sobre o destino de amidas durante o processo digestivo de espécies de insetos. Assim, o metabolismo das amidas **A1-A6** em *N. bipes* foi investigado em condições de laboratório.

Espécimes de *N. bipes* adultos foram criados em um frasco de vidro com dieta constituída de folhas de *P. tuberculatum*. As fezes foram coletadas e extraídas com CH_2Cl_2 :MeOH (2:1), e o extrato foi analisado em CG/EM.

O perfil cromatográfico do extrato fecal do besouro indicou a presença de quatro picos (**F4**, **F5**, **D1** e **D2**) que não foram detectados no cromatograma do extrato das folhas. Assim, o extrato fecal foi submetido a etapas de purificações que resultaram na obtenção das substâncias **F4**, **F5**, **D1** e **D2** (Figura 2.29).

Figura 2.29. Perfil cromatográfico (CG) dos extratos das folhas de *P. tuberculatum* hidrolisado, não hidrolisado e fecal do besouro *N. bipes*.

As estruturas das substâncias correspondentes aos picos **F4**, **F5** e **D2** foram determinadas com base na interpretação de seus dados espectroscópicos (EM, RMN de ^1H e de ^{13}C) como sendo o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, o ácido 3,4,5-trimetoxifenil-1-propanóico e o ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, respectivamente. A estrutura da substância correspondente ao pico **D1** foi identificada como sendo o ácido 3,4,5-trimetoxifenil-1-butanóico com base na análise de seu espectro de massas e por comparação com o composto autêntico sintetizado (Vorogushin *et al.*, 2001).

Aos ácidos **F4**, **F5**, **D1** e **D2** presentes no extrato fecal do besouro foram originados pela hidrólise das amidas **A1-A4** durante o processo digestivo do *N. bipes* (Figura 2.30).

Figura 2.30. Reações de hidrólises das amidas de *P. tuberculatum*.

As amidas **A5** e **A6** não sofrem hidrólise durante o processo digestivo do besouro e também por tentativa em condição básica.

2.2.3 – Experimental

2.2.3.1 - Material geral

- Para extração e fracionamento em coluna e placas cromatográficas utilizaram-se solventes da Suprind submetidos à destilação. Para análise de amostras utilizou-se solvente de grau pureza P.A., Merck e Aldrich;
- A fase estacionária empregada para cromatografia em coluna filtrante sob pressão foi sílica gel com partículas de 80 - 230 μm Ultrachem, sílica gel 60 H 63 - 210 μm Merck e sílica gel de fase reversa preparativa C18 125 Å, 55 - 105 μm Waters;
- Para cromatografia em camada planar comparativa (CPC) e cromatografia planar preparativa (CPP) utilizou-se, como fase estacionária, sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merk com partícula de 4 - 45 μm e espessuras de 0,50 mm e 1,00 mm, respectivamente.
- Para cromatografia radial preparativa (CRP) em cromatotron uso-se sílica gel 60 PF₂₅₄ com gesso e partículas de 5 - 45 μm , sob placa de vidro de 2 mm de espessura;
- Foi utilizado como reveladores de placas cromatograficas irradiações na região do UV, 254 e 360 nm, e solução de sulfato de cérico seguido de aquecimento em chapa.

2.2.3.2 – Equipamentos

- Cromatógrafo a gás, modelo HP - 5890 serie II, com coluna capilar HP-5 de silicone derivatizada com fenilmetilsilicone (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm) utilizando He como gás de arraste e detector FID;
- Cromatografia líquida de alta eficiência modelo HP series 1050 com detector UV, integrador HP 3395 e cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo Shimadzu modelo LC-10, equipado com bomba ternária e detector UV e fluorescência munido de injetor automático SIL-10A;
- A coluna utilizada para análise no cromatógrafo líquido foi: fase reversa RP-18 Supelco (5 μm d.i., 4 x 250 mm);
- Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX - 300, IQ-USP, operando em 300 MHz e espectrômetro Bruker 200, IQ-USP, operando em 200 MHz. Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados em DPX - 300 e Bruker 200, IQ-USP, operando em 75 e 50 MHz respectivamente;
- Os espectros de IV foram registrados em aparelho FT - IR 1750, Nicolet Perkin - Elmer;

- Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas de baixa, Hewlett - Packard, Finnigan operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV) e Platform operando no modo electrospray (4 KV).

2.2.3.3 – Local de estudo

As observações em campo foram realizadas em uma área adjacente ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Instituto de Química da Universidade de São Paulo, estado de São Paulo, o Brasil (S 23°,33,915'; W 46°,43,671'), no período de verão de 2000 a 2005. Nesta área estão sessenta e cinco espécies de Piperaceae cultivadas (Tabela 01, capítulo 1) onde foram introduzidas a doze anos atrás e apenas três espécies são nativas: a *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *Pothomorphe umbellata*. Além de Piperaceae, estão presentes espécies como *Virola sebifera* e *V. oleifera* (Myristicaceae); *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae); *Psidium guayava* (Myrtaceae); *Theobroma cacao* (Musaceae) e *Cecropia spp.* (Moraceae). As espécies foram previamente identificadas pela Prof^a. Dra. Elsie Franklin Guimarães, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Os tecidos das plantas coletados foram secos por 24 horas em estufa a 40° C.

2.2.3.4 - Material entomológico

Os besouros foram coletados no canteiro do LQPN (IQ-USP) e identificados com auxílio do professor Dr. Sérgio Antonio Vanin do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia (IB-USP).

Os besouros coletados foram mantidos com dietas constituídas de folhas de espécies de Piperaceae por uma semana para obtenção das fezes. Após esse período os besouros foram mortificados em um recipiente fechado contendo papel filtro umedecido com clorofórmio. Os besouros e as fezes foram secos em estufa 40 °C por 24h, macerados em tubo de ensaio com bastão de vidro e extraídos com CH₂Cl₂:MeOH 2:1 por 24 h. Os extratos foram secos em evaporador rotativo a vácuo.

Os insetos selecionados para investigar seqüestros de metabólitos secundários de plantas foram mantidos em jejum por 48 h, antes de serem mortificados, para eliminar possíveis traços de folhas não metabolizados pelo besouro.

As larvas de *N. bipes* coletadas em raízes de *P. gaudichaudianum* e *P. regnellii* foram mantidas em cuba de vidro circular, raio 15 cm e altura 20 cm, cobertas por ¼ de

terra contendo raízes e diariamente umedecida com 3 mL de água. Ambos os insetos adultos e larvas foram mantidos a temperatura ambiente e com iluminação do ambiente (14 h luz e 8 h escuro).

2.2.3.5 - Bioensaios Eletrofisiológicos (EAG e CG/EAD) com o besouro *N. bipes* e óleos voláteis de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. hispidum*

Os insetos *Naupactus bipes* foram coletados em tubos de plásticos no canteiro do IQ-USP, principal campo de estudo, onde a presença do adulto em espécies de *Piper* ocorre no mês de outubro a dezembro. Os insetos foram mantidos em cativeiro com dieta das folhas da planta hospedeira de origem.

Os ensaios foram realizados com as antenas do besouro *N. bipes*, macho e fêmea, no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos sob a responsabilidade da prof^a. Arlene G. Corrêa.

2.2.3.5.1 – Eletroantenograma

Os insetos foram mantidos em freezer por alguns segundos para que fossem feitas as extrações das antenas. Em seguida, foram colocadas em contato com um eletrodo por meio de um gel com o objetivo de gerar uma diferença de potencial, conforme mostrado na Figura 2.31. Em seguida, este eletrodo foi conectado ao CG para análise.

Figura 2.31. Esquema de um eletrodo usado nos experimentos de EAG

Primeiramente dilui-se o óleo essencial nas seguintes concentrações: 100,0 mg/mL; - 10,0 mg/mL; -1,0 mg/mL, usando os seguintes códigos:

Ar = Ar sintético; hexano = solvente;

Preg (*Piper regnelli*)

Phis (*Piper hispidum*)

Pgau (*Piper gaudichaudianum*)

Usou-se como solvente para estas diluições hexano e as amostras foram aspergidas sobre papel de filtro usando a quantidade de 5uL.

O primeiro experimento foi realizado usando-se apenas o ar, para testar a resposta mecânica da antena. Em seguida testou-se o ar passando sobre o solvente. Depois, foram realizados testes usando concentrações diferentes dos óleos, distribuídas aleatoriamente. As respostas obtidas foram da ordem de mV.

A etapa seguinte foi a realização dos experimentos de EAD onde o óleo volátil foi injetado e submetido a uma cromatografia gasosa. As substâncias separadas passaram pela antena do inseto e esta detectou aquelas que foram ativas.

Para as análises eletroantenográficas foi usado um eletroantenógrafo Syntech Original Research Equipment Micro Manipulator Type MP-12 equipado com lupa Leca LZ6.

Um cromatógrafo a gás HP 5890 Série II Plus foi modificado, para ter um fluxo da coluna dividido entre o EAD e FID. A antena do inseto foi preparada em uma estação de acrílico (Leal *et al.*, 1992), posta dentro da linha de transferência de vidro (2 cm da saída do CG) e conectado através de eletrodos de ouro ao amplificador. O sinal foi filtrado através de um filtro passivo (0,12 Hz) e gerenciado por uma interface A/D 35900E. A resposta das antenas de *N. bipes* foi registrada com um sistema EAG e CG/EAD (Struble *et al.*, 1984). As detecções no EAD e FID foram obtidas simultaneamente.

O esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector eletroantenográfico (GC-EAD), está representado na Figura 2.32. A amostra ao ser injetada, irá percorrer toda a coluna para que haja a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido em dois, sendo que uma parte vai para o FID e, conseqüentemente, o cromatograma é traçado, e a outra parte vai para o EAD, onde a resposta da antena é amplificada. Em função de ambas serem simultâneas, é possível saber se o composto registrado pelo FID é ou não ativo.

Figura 2.32. Esquema básico de um sistema de GC-EAD; no exemplo ilustrativo, o composto assinalado no cromatograma seria o feromônio, uma vez que apenas esse, dentre todos os presentes, apresentou resposta positiva da antena.

2.2.3.6 – Extração e análises dos óleos essenciais de *P. regnellii*, *P. hispidum* e *P. gaudichaudianum*

Folhas frescas de *P. regnellii*, *P. hispidum* e *P. gaudichaudianum* foram submetidas à hidrodestilação por 4 h em aparelho de Clevenger. A análise de CG-FID foi realizada em um instrumento Shimadzu modelo 17A equipado com uma coluna capilar HP DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25, 5% fenilmetil silicone). A temperatura do forno foi inicialmente de 60°C a 5.0 min, então aumentada a 3°C/min para 80°C e mantida por 1.0 min, então aumentada por 5°C/min para 110°C e mantida por 1.0 min, então aumentada a 3°C/min para 155°C (tempo total de programação foi de 40 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio com uma taxa de fluxo de 2.5 ml/min (pressão 150 kPa); a temperatura do injetor foi de 250°C e a amostra foi injetada em "splitless"; a temperatura da interface foi de 280°C. A análise em GC-MS foi realizada usando a mesma coluna capilar, mas com a programação da temperatura do forno de 100 a 280°C a uma taxa 10°C/min, e o gás de arraste (hélio) com a taxa de fluxo de 1 ml/min. IE/EM foram medidos em 70 eV em espectrômetro modelo 5990/5988A, Hewlett Packard.

Os componentes individuais dos óleos essenciais foram identificados pela determinação de seus tempos e índices de retenção relativos comparados ao de uma série de homólogos de n-alcanos (Kovats index; Adams, 1995; Marques *et al.*, 2000), por co-injeção com amostra autêntica, e por comparação das fragmentações padrões dos espectros de massas (Adams, 1995).

2.2.3.7 - Extração e purificação das substâncias P1, C1-C3 das folhas e raízes de *P. gaudichaudianum*

Folhas (20 g) e raízes (12 g) secas de *P. gaudichaudianum* foram extraídas por duas vezes com CH₂Cl₂-MeOH (2:1) (2 x 1 L), produzindo 5,5 e 2,9 g de extratos brutos, respectivamente. Parte do extrato das folhas (4,5 g) foi suspensa em MeOH:H₂O (8,5:1,5, 300 mL) e filtrada em um funil poroso com papel de filtro contendo celite (2/3 v/v) a vácuo e concentrado para produzir 2,5 g de extrato livre de clorofila. Esse extrato foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel usando como eluente hex:AcOEt 1:4 aumentado até AcOEt puro, produzindo 15 frações. A fração 7 foi submetida à CPP usando CH₂Cl₂:hex:AcOEt:AcOH, 7,7:1,5:0,5:0,3 eluindo por três vezes para produzir o composto **C2** (15 mg). Parte do extrato das raízes (245 mg) foi submetida a cromatografia circular (cromatotron, camada 4 mm) e eluída com hexano até AcOEt puro, produzindo as substâncias **C1** (77 mg) e **P1** (35 mg).

Uma quantidade de **C2** (1 mg) foi metilada com CH₂N₂ em éter anidro a 26°C por 1 h para produzir a substância **C3**, que foi identificada por análises em CLAE/EM e CG/EM no qual comparou-se os espectros com da substância autêntica identificada no extrato das folhas de *P. gaudichaudianum*.

2.2.3.8 - Lignanas de *P. solmsianum* e neolignanas de *P. regnellii*

A lignana (-)-grandisina (**Li**) e o fenilpropanóide *E*-isoelemicina (**F1**) foram isolados das folhas de *P. solmsianum* enquanto as neolignanas **N1-N4** foram isoladas das folhas de *P. regnellii* como previamente descritas (Martins *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003; Benevides *et al.*, 1999).

2.2.3.9 - Extração e purificação das substâncias N5 e N7

Fezes secas (210 mg), em estufa a 40 °C por 24 h, do besouro *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. regnellii* foram maceradas e extraída com AcOEt que após concentrado a vácuo produziu 60 mg de extrato bruto. O extrato foi submetido à coluna de sílica gel de fase reversa C18 (10 cm x 2 cm) eluída com MeOH:H₂O 3:10, isocrático, seguido por CCP usando hex:AcOEt 7:3 (elução de 3 vezes) para produzir 1,2 mg de **15** e 0,9 mg **17**.

2.2.3.10 - Extração e purificação do composto P2 das folhas de *P. arboreum*

Folhas secas (40 g) de *P. arboreum* foram extraídas com CH₂Cl₂:MeOH (2:1, 3 vezes de 500 mL) que após concentração a vácuo produziu 12 g de extrato bruto. Parte desse extrato 5 g suspenso em H₂O:MeOH (1:4, 300 mL) depois filtrada em um funil de vidro sinterizado contendo celite (2/3 v/v). Ao filtrado foram adicionados 5 mL de uma solução saturada de NaCl e em seguida extraído com CH₂Cl₂ por 3 vezes de 150 mL em funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidrido e que depois de concentrada produziu um extrato (1 g) livre de clorofila. Esse extrato foi fracionado em coluna sílica, eluída com hex:AcOEt (4:1) aumentando até AcOEt puro, que resultou em 30 frações. A fração 5 (50 mg) foi submetida à CPP usando hex:AcOEt (4:1) eluída por 3 vezes que resultou na purificação da substância **P2** (16 mg).

2.2.3.11 – Extração e purificação da substância P3

Fezes secas de *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. arboreum* (300 mg) foram extraídas CH₂Cl₂:MeOH (2:1, 3 vezes de 60 mL) produzindo 65 mg de extrato bruto. O extrato foi submetido à CPP usando hex:AcOEt:AcOH (3:6,7:0,3) eluindo por três vezes para produzir substância **P3** (1,3 mg)

2.2.3.12 - Extração e purificação das substâncias L2, L3, F2 e F3

Fezes secas (400 mg) do besouro *N. bipes* se alimentado de folhas de *P. solmsianum* foram maceradas e extraídas com AcOEt por três vezes que após concentração a vácuo produziu 90 mg de extrato bruto. O extrato foi dissolvido em AcOEt (70 ml) e extraído com uma solução de NaOH saturada (50 ml) por três vezes. As frações

orgânicas foram reunidas e secas com Na₂SO₄ anidrido e concentrada a vácuo produzindo 30 mg extrato fenólico. Esse extrato foi submetido à CC e eluída com hex:AcOEt (3:2), seguido de CCP usando hex:AcOEt (3:2) por três vezes, para produzir as substâncias **L2** (1,8 mg), **L3** (1,1 mg), **F2** (6 mg) e **F3** (1,5 mg).

2.2.3.13 - Extrato polar das folhas de *P. solmsianum*

Folhas secas de *P. solmsianum* (500 g) foram extraídas com 80 % de etanol. O extrato foi concentrado a vácuo e o resíduo foi suspenso em H₂O. A suspensão foi extraída com Et₂O e *n*-BuOH. A fração butanólica (4,5 g) foi cromatografada em coluna de sephadex G15, eluída com o gradiente de MeOH-H₂O 1:1 a 9:1 produzindo cinco frações (150 ml cada). A fração dois foi cromatografada em uma coluna de sílica-gel de fase reversa C18, eluída em gradiente isocrático (MeOH-H₂O 2:8) para obter uma fração rica em fenilpropanóides glicosilados (80 mg).

2.2.3.14 - Extração das substâncias das folhas de *P. solmsianum* ligados à parede celular

Folhas secas e maceradas de *P. solmsianum* (15 g) foram extraídas por três vezes com MeOH e H₂O 1:1 (100 ml), em temperatura ambiente por 24 h e após esse período centrifugado por 15 min em 4000 g. O sobrenadante foi removido e o resíduo foi extraído seqüencialmente com MeOH, H₂O, 0.5% SDS, 1 M NaCl, H₂O, MeOH, Me₂CO, CH₂Cl₂ e hexano (3 x 100 ml cada, extraído e centrifugado). O resíduo consistindo da parede celular foi seco a 40 °C em Speed-Vac. Para a hidrólise, 100 mg da amostra da parede celular foi transferida para um frasco sob atmosfera de N₂ em 10 ml de uma solução de NaOH (saturada) e incubada ao escuro por 24 h a 80° C. A mistura reacional foi então acidificada para pH = 3 com HCl concentrado e extraída por 3 vezes com acetato de etila (1:1, vol/vol). As frações orgânicas foram reunidas e adicionou-se sulfato de sódio anidro seguido de filtração em papel de filtro. O extrato foi seco a 30 °C sob vácuo.

2.2.3.15 - Amidas A1-A6 de *P. tuberculatum*

A extração e purificação das amidas **28-33** de *P. tuberculatum* foram previamente relatadas (Silva *et al.*, 2002; Navickiene *et al.*, 2000).

2.2.3.16 - Extração e purificação das substâncias F4, F5, D1 e D2

Fezes secas (150 mg) do besouro *N. bipes* com dieta constituída das folhas de *P. tuberculatum* foram maceradas e extraídas com AcOEt (100 ml) por três vezes. Após concentração a vácuo foram obtidos 55 mg de extrato bruto. O extrato foi dissolvido em AcOEt (50 ml) e extraído com uma solução de NaOH (1 mol/l, ml) por três vezes. A fração aquosa foi acidificada com HCl concentrado até pH 5 e extraída com AcOEt por três vezes. A fração orgânica, previamente seca com NaSO₄ anidro, foi concentrada sob vácuo produzindo 15 mg de extrato fenólico. O extrato fenólico foi submetido à coluna de sílica gel de fase reversa C18 eluída com H₂O:MeOH (4:6), seguido por CPP usando hex:AcOEt (3:2) produzindo as substâncias **F4** (1,1 mg), **F5** (1,5 mg), **D1** (0.7) mg e **D2** (1 mg).

2.2.3.17 - Saponificação do extrato bruto das folhas de *P. tuberculatum*

O extrato seco (30 mg) das folhas de *P. tuberculatum* foi dissolvido em DMSO (10 ml) e em uma solução de H₂O:*t*-ButOK 3:1 (5 mL) em aquecimento (40 °C) por 10 h. Após esse período a mistura reacional foi acidificada com HCl concentrado até pH 5 e extraída então com AcOEt por três vezes de 15 ml. A fase orgânica foi concentrada a vácuo produzindo 3 mg que foi analisada em CG/EM.

2.2.3.18 - Análises por CLAE e CG

Todas as amostras obtidas de insetos e plantas foram analisadas na concentração de 2 mg/mL em metanol. As amostras antes da análise foram tratadas em cartucho de sílica gel Sepak C18 e filtradas em microfiltros de 0,45 µm. Exceto as substâncias puras que apenas foram filtradas em microfiltros.

Condição utilizada em CLAE para obtenção dos cromatogramas das figuras 2.11, 72.12 e 2.18.

Condição utilizada em CLAE para obtenção dos cromatogramas das figuras 2.14, 2.21, 2.25 e 2.26.

2.2.3.21 - Condição utilizada em CG para obtenção dos cromatogramas das figuras 2.23 e 2.29.

Temperatura do forno: 100 °C
Tempo de equilíbrio do forno: 1 min
Temperatura do injetor: 280 °C
Temperatura da interface: 280 °C
Coluna: Capilar HP DB-5
(30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μm)
Pressão da coluna: 80 kPa
Fluxo da coluna: 1,1 mL/min
Total de fluxo: 80,3 mL/min
Gás de arraste: He
Splitless

2.2.4 – Conclusões

2.2.4.1 – Fago-especificidade do besouro *N. bipes* por espécies de *Piper*

Embora espécies do gênero *Naupactus* sejam consideradas polífagas, o besouro *N. bipes* sob condições de campo mostrou especificidade por folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. hispidum*, *P. arboreum* e *P. aduncum* entre um conjunto de sessenta e cinco espécies de Piperaceae.

Quando as folhas dessas cinco espécies foram oferecidas simultaneamente aos besouros adultos em condições de laboratórios, houve uma clara preferência pelas folhas de *P. gaudichaudianum*. Não obstante, a análise eletroantenográfica (EAG) dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de *P. regnellii*, *P. hispidum*, e *P. gaudichaudianum* demonstrou respostas positivas para as três espécies de acordo com observação em campo. Entretanto, a menor resposta relativa foi observada para o óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum* para ambas as antenas do besouro macho e fêmea, sendo que o besouro em condições de laboratório mostrou preferência alimentar justamente por essa espécie. Essas observações podem indicar que o besouro utiliza sinais químicos e táteis para seleção da planta a ser predada. Além disso, a concentração de voláteis emitidos pela a planta também poderia estar afetando a orientação dos insetos por sinais químicos (Vilela e Lucia, 2001).

A análise por EAD indicou os terpenóides α -pineno, β -pineno, mirceno, α -copaeno e β -bourboneno como responsáveis pelo estímulo das antenas do besouro frente aos óleos voláteis emitidos pela *P. hispidum*. Entretanto, esses terpenóides são bastante comuns em espécies da família Piperaceae e em outras famílias de plantas, e eles têm um papel significativo na interação planta-besouro (Tumlinson *et al.*, 1969; Wood *et al.*, 1970; Gregoire *et al.*, 1981; Erbilgin, 2000). Assim, os receptores olfativos de Coleoptera devem ter a mesma sensibilidade a componentes individuais, como é conhecido para o caso do besouro da batata do Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Visser, 1979). Foi sugerido que a habilidade do besouro do Colorado para discriminar entre as plantas hospedeiras e não hospedeira pode estar baseado nas concentrações relativas e combinações de voláteis emitidos pelas plantas (Visser e Avé, 1978).

2.2.4.2 – Seqüestros de metabólitos secundários de *P. gaudichaudianum* e *P. regnellii* por *N. bipes*

Análises por CLAE e CG/EM dos extratos dos tecidos do besouro e das plantas indicaram possíveis seqüestros dos metabólitos 2,2-dimetil-6-carboxicromeno-4-ona (**7**) e taboganato de metila (**8**) das raízes de *P. gaudichaudianum* e as neolignanas **11** e **17** das raízes de *P. regnellii* pelas larvas de *N. bipes* e mantidos até a fase adulta. Esta hipótese foi corroborada com a presença abundante de larvas de *N. bipes* observadas somente em raízes de *P. gaudichaudianum* e *P. regnellii*.

A neolignana **N1** foi previamente isolada das folhas de *P. decurrenus* e mostrou atividade inseticida enquanto a neolignana **N7** é produto da biotransformação de **N1** durante o metabolismo das folhas de *P. regnellii* em *N. bipes*. Os seqüestros das substâncias **C1** e **P1** pelo *N. bipes* sugerem que estas têm algum papel na defesa do besouro contra microorganismos e predadores devidos as suas atividades biológicas citadas anteriormente.

2.2.4.3 – Biotransformações de metabólitos secundários de *Piper* por *N. bipes*

2.2.4.3.1 – Biotransformações de lignanas e neolignanas

A biotransformação da lignana (-)-grandisina (**L1**) durante o processo digestivo do besouro *N. bipes* através da reação de *O*-desmetilação no grupo metoxílico aromático foi observada com a larva da borboleta *Spodoptera litura* por Miyazawa (1995) e Kasahara (1996) formando as substâncias *O*-desmetilgrandisina (**24**) e de-*O*-desmetilgrandisina (**L3**). Adicionalmente, para as neolignanas **N1-N3** foi observada clivagem oxidativa do tipo ozonólise e oxidação seletiva nas posições 7' and 9', respectivamente, para seus respectivos aldeídos (**N5** e **N7**) e ácidos carboxílicos (**N6** e **N8**).

A atividade fagoinibidora de lignanas e de simples fenilpropanóides muitas vezes é reduzida devido à presença de substituintes polares, como grupos hidroxílicos ou glicosílicos, enquanto substituintes não polares como metoxílico ou metilenedioxifenílicos, aumentam a atividade (Harmatha e Nawrot, 2002). Assim, considerando que ambas as lignanas e neolignanas foram biotransformadas para suas formas mais polares durante o metabolismo do besouro *N. bipes* e a sua atividade inseticida e fago inibidora (Chauret *et al.*, 1996; Harmathan and Nawrot, 2002), as reações de biotransformações aqui observadas sugerem uma estratégia do besouro para superar as possíveis toxicidades desses metabólitos.

2.2.4.3.2 – Biotransformações de amidas

A presença de amidas em espécies de *Piper* pode estar associada com a defesa da planta contra herbívoros (Dyer *et al.*, 2001). Embora amidas isoladas de espécies *Piper* tenham sido relatadas como fagoinibidoras e como inseticidas contra várias espécies de insetos (Dyer *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; McFerren e Rodriguez, 1998) o seu destino metabólico em insetos não era conhecido.

As amidas em condições fisiológicas exibem uma meia vida na faixa de sete anos devido à estabilização por ressonância e assim suas hidrólises podem ter um alto custo para insetos (Yan *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2003).

A primeira tentativa para conhecer o metabolismo de amidas acumuladas em folhas de Piperaceae em inseto, aqui descrita, mostrou que algumas amidas de *P. tuberculatum* foram hidrolisadas pelo besouro *N. bipes* formando seus respectivos ácidos. Entretanto, foi observado que a amida **32** não sofre hidrólise durante o processo digestivo do besouro, nem tão pouco durante a tentativa com saponificação.

A hidrólise das amidas de *P. tuberculatum* representa um fato relevante principalmente por envolver o catabolismo de compostos com atividade inseticida em uma espécie de besouro polífago e considerada uma praga no Brasil, por predação várias culturas como de linho, soja, algodão e frutas cítricas (Lanteri *et al.*, 2002). O inseto adulto se alimenta das folhas enquanto as larvas possuem hábito rizófago e não existe controle eficiente no combate a espécies do gênero *Naupactus*.

Capítulo 3

Especificidade química de Lepidoptera por espécies de Piperaceae que contém lignanas ou neolignanas

3.1 – Introdução

Lepidoptera é a segunda maior ordem de insetos com mais de 160.000 espécies descritas e nomeadas (Herrera e Pellmyr, 2002) e suas larvas têm forte atração por plantas que constituem-se na sua principal fonte alimentar.

A interação química entre Lepidoptera e plantas é um dos assuntos mais investigados em ecologia química com muitos artigos e revisões disponíveis (Trigo, 2000; Brower e Brower, 1964; Nishida, 2002; Schulz, 1998; Brown, 1984a/1984b). Alguns estudos anteriores demonstraram claramente as atividades deterrentes de substâncias de plantas como cardenolídeos, alcalóides pirrolizidínicos e ácidos aristolóquicos que são seqüestrados por espécies de Lepidoptera, podendo ser utilizados para sua própria defesa (Klitzke e Brown, 2000; Abe *et al.*, 2001; Nishida, 1995). Em lagartas das borboletas Danainae, os cardenolideos têm assumido funções de defesa química contra predadores como pássaros (Brower *et al.*, 1982) e, os alcalóides pirrolizidínicos, têm sido utilizados tanto para a defesa química quanto para a produção de feromônios (Schneider *et al.*, 1975).

3.1.1 – Lignanas e neolignanas

Do ponto vista químico lignanas e neolignanas mostram uma ampla diversidade estrutural, embora suas moléculas consistam apenas de duas unidades de fenilpropanóides (C_6C_3). As lignanas são formadas pelo acoplamento oxidativo do álcool cinâmílico e/ou com o ácido cinâmico, enquanto as neolignanas são formadas pelo acoplamento oxidativo de propenilfenóis e/ou com alilfenóis (Figura 3.1).

Lignanas têm recebido atenção por causa de sua ampla ocorrência na natureza, principalmente no reino vegetal, e também devido as suas diversas atividades biológicas (MacRae e Towers, 1984). Neolignanas, embora mais diversificadas em estruturas, são

menos numerosas quando comparadas com as lignanas e, obviamente, são mais específicas para certas famílias de plantas (Harmathan e Nawrot, 2002).

Em muitos casos lignanas e neolignanas têm sido utilizadas como modelos para a síntese de derivados na otimização de atividades biológicas e estudo de relações estrutura-atividade (Nihei *et al.*, 2005; Apers *et al.*, 2003).

Lignanas isoladas de espécies de *Piper* possuem atividade fagoinibidora contra pragas de grãos em armazenamento (Nawrot e Harmathan, 1994). As lignanas sesamina e sesamolina atuam como sinergistas com certos inseticidas sintéticos quando ambas são combinadas (Singh *et al.*, 1976). A sesamina mostrou atividade fagoinibidora contra a lagarta da borboleta *Spilarctia oblique* Walker (Srivastava *et al.*, 2001) e as neolignanas conocarpano, eupomatenóide-5 e decurrenal, isoladas de *P. decurrenal*, mostraram atividade inseticida contra a larva do mosquito *Aedes atropalpus* (Chauret *et al.*, 1996).

Figura 3.1. Biogêneses de lignanas e neolignanas.

3.1.2 – Piperaceae e Lepidoptera

Espécies de Piperaceae introduzidas como *Piper aduncum* (29 espécies por 1500 m²) e *Pothomophe umbellatum* (23 espécies) são mais freqüentadas por lagartas de Lepidoptera do que as 69 hospedeiras nativas em floresta tropical da Nova Guiné (Novotny *et al.*, 2003). A *Piper amalago* é hospedeira da lagarta da borboleta *Heraclides hectorides*, em população sulista do Brasil, em uma área reflorestada caracterizada por uma flora nativa secundária com árvores de eucaliptos (Pénz e Araújo, 1990).

Considerando que não existem estudos relacionados à química de *Piper* e Lepidoptera, objetivou-se investigar a possível especificidade química das lagartas de três espécies de Lepidoptera; *Heraclides brasiliensis* (Esper, 1794), *Heraclides hectorides* (Rothsch e Jord, 1906) e *Quadrus u-lucida* (Plötz, 1884) por folhas de espécies de *Piper* acumuladoras de lignanas e/ou neolignanas.

3.2 - Resultados

As lagartas das borboletas *H. hectorides*, *H. brasiliensis* e *Q. u-lúcida* apareceram de forma espontânea no canteiro do LQPN predando folhas de espécies de *Piper*. As três espécies de lagartas mostraram uma estreita especificidade por folhas de espécies de *Piper* que acumulam lignanas e/ou neolignanas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Espécies de *Piper* hospedeiras das lagartas *Q. u-lúcida*, *H. hectorides* e *H. brasiliensis*.

Família de Insetos	Espécies de Insetos	Espécies de <i>Piper</i>	Metabólitos
Hesperiidae	<i>Q. u-lúcida</i>	<i>Piper solmsianum</i>	LTHF
		<i>P. regnellii</i>	NDHBF
		<i>P. callosum</i>	LTHF
		<i>P. richardifolium</i>	LDBL, LFF
		<i>Piper sp</i>	LTHF
Papilionidae	<i>H. hectorides</i>	<i>P. solmsianum</i>	LTHF
		<i>P. regnellii</i>	NDHBF
Papilionidae	<i>H. brasiliensis</i>	<i>P. regnellii</i>	NDHBF

LTHF: Lignanas tetraidrofurânicas; NDHBF: neolignanas diidrobzofurânicas; LDBL: lignanas dibenzilbutirolactônicas; LFF: lignanas furofurânicas.

As lagartas da borboleta *Q. u-lúcida* foram observadas alimentando-se das folhas de *P. regnellii* ($N = 40$), *P. solmsianum* ($N = 8$), *P. callosum* ($N = 3$), *P. richardifolium* ($N = 4$) e *Piper sp* ($N = 3$). A principal planta hospedeira é a *P. regnellii* onde a ocorrência de lagartas e adultos é predominante durante todo ano, exceto nos meses de julho e agosto. As lagartas se alimentam da folhas de *P. regnellii* durante aproximadamente vinte dias entrando em seguida na fase de pupa, permanecendo nesse estágio por trinta dias dando origem ao inseto adulto (Figura 3.2).

Figura 3.2. Ciclo de vida da Lepidoptera *Q. u-lucida* (Foto, M. J. K.).

A borboleta *Heraclides brasiliensis* pertence à família Papilionidae, tribo Papilionini sendo este gênero conhecido em literaturas mais antigas como o gênero *Papilio* e não *Heraclides*. As lagartas das borboletas são observadas nos meses de fevereiro a maio e de outubro a dezembro.

Três lagartas foram coletadas e mantidas em cativeiro em recipiente de vidro contendo ramos de *P. regnellii* mantidos em água para observar o processo de metamorfose. Os espécimes mantidos em cativeiro apresentaram praticamente o mesmo comportamento, sendo que apenas uma apresentou defasagem de um dia entre os eventos observados.

Durante 18 dias as larvas consumiram rapidamente o material vegetal produzindo grande quantidade de excrementos. Após este período as larvas entraram em estado de pupa, fixando-se nos caules secos de *P. regnellii* colocados no recipiente. A aparência da pupa é semelhante a dos gravetos, sendo uma forma de mimetismo utilizada pelo inseto para evitar ataque de predadores. Os espécimes permaneceram neste estado por aproximadamente 36 dias, dando origem às borboletas de cores preta e amarela (Figura 3.3).

Figura 3.3. Lagarta em *Piper solmsianum* e o inseto adulto de *H. brasiliensis* (Foto, MJK).

As lagartas de *H. hectorides* foram observadas alimentando-se das folhas de *P. regnellii* ($N = 6$) e *P. solmsianum* ($N = 3$). A borboleta *H. hectorides* tem metamorfose semelhante à espécie *H. brasiliensis* (Figura 3.4).

Figura 3.4. Ciclo de vida da Lepidoptera *H. hectorides* (Foto, MJK).

As lagartas também foram observadas alimentando-se de folhas de espécies de *Piper* em outras localidades. As lagartas *H. hectorides* ($N = 4$) e *Q. u-lucida* ($N = 3$) em *P. solmsianum* (Ubatuba – SP, Brasil, S 23°27',731" W 45°11.760"), *H. hectorides* em *P. solmsianum* ($N = 4$) (Poços de Caldas – MG, Brasil, S 21°58',300" W 46°22,296"), *H. hectorides* em *P. solmsianum* ($N = 4$) e *P. regnellii* ($N = 3$) (Instituto de Biociências - USP, São Paulo – SP, Brasil, S 23°33'906" WO 46°43'634") e *H. hectorides* em *Piper* sp1 ($N = 9$) (Itabuna-Ba, Brasil).

Figura 3.5. Lignanas e neolignanas isoladas de espécies de Piperaceae.

3.2.1 - Biotransformações de lignanas e neolignanas durante o processo digestivo das lagartas

Como objetivo de avaliar o metabolismo das lignanas e neolignanas de espécies de *Piper* em *H. brasiliensis*, *H. hectorides* e *Q. u-lucida*, as lagartas foram coletadas e mantidas em laboratório durante uma semana com dieta constituída de folhas de suas respectivas plantas hospedeiras para obtenção do material fecal.

As fezes coletadas foram secas e extraídas com $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$, sendo que os mesmos procedimentos foram realizados com as folhas não infestadas das plantas hospedeiras.

Os extratos foliares e fecais foram submetidos à análise em CG/EM, CLAE e CLAE/EM. Em todos os cromatogramas dos extratos fecais foram observados picos adicionais quando comparados com os cromatogramas dos extratos das folhas (Figuras 3.6, 3.10, 3.12, 3.16 e 3.17).

3.2.1.1 Metabolismo da lignana (-)-grandisina e do fenilpropanóide *E*- isoelemicina de *P. solmsianum* em lagartas das borboletas *Q. u-lucida* e *H. hectorides*

O perfil cromatográfico (Figura 3.6-A) do extrato das folhas de *P. solmsianum* revelou o acúmulo da lignana (-)-grandisina, constituinte majoritário, e o fenilpropanóide *E*-isoelemicina, como previamente relatado (Martins *et al.*, 2003). O perfil cromatográfico do

extrato fecal da lagarta *Q. u-lucida* foi consideravelmente diferente quando comparado com aquele extrato das folhas (Figura 3.6-B).

Figura 3.6. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos das folhas de *P. solmsianum* (A) e fecal da lagarta *Q. u-lucida* (B).

O decréscimo na proporção relativa da lignana (-)-grandisina (**L1**) quando comparada a *E*-isoelemicina (**F1**) e a presença adicional de uma substância com tempo de retenção em 4,3 min observado no cromatograma do extrato das fezes, indicou a possibilidade da biotransformação de **L1** para a substância **L3**. A elucidação da estrutura deste novo constituinte foi baseada na análise por espectrometria de massas (IE e IES) da substância **L3** que um pico em m/z 404 que corresponde ao íon molecular da (-)-grandisina (**L1**, m/z 432) subtraído de 28 Da. O padrão da fragmentação para a substância **L3** foi de acordo com o esperado para a estrutura da di-*O*-desmetilgrandisina. Tais reações de desmetilação da (-)-grandisina em lagartas de *Q. u-lucida* foram também observadas para o besouro adulto da espécie *Naupactus bipes*. Entretanto, para o *N. bipes* também foi observado a substância *O*-desmetilgrandisina (**L2**) também produto do metabolismo da (-)-grandisina (Figura 3.10).

Figura 3.7. Metabolismo da lignana (-)-grandisina (**L1**) em lagarta *Q. u-lucida* formando a lignana **L3**.

A biotransformação foi confirmada com a incubação de **L1** com o fluido digestivo removido da lagarta *Q. u-lucida* e análise posterior em CLAE-EM. Verificou-se a presença da substância **L3** com tempo de retenção em 4,3 min e massa molecular de 404 Da que coincide com a observada para a substância autêntica (Figura 3.8).

Figura 3.8. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. solmsianum* e do fluido digestivo da lagarta *Q. u-lucida* com a (-)-grandisina (**L1**) incubada.

A (-)-grandisina também foi incubada com o extrato enzimático das folhas de *P. solmsianum* no intuito de investigar se a enzima responsável pela reação de biotransformação era proveniente do inseto, das folhas ou de microorganismos contidos nas folhas. O perfil cromatográfico do extrato, após incubação, não indicou nenhum pico correspondente às substâncias **L2** e **L3** produtos do metabolismo da (-)-grandisina em *N. bipes* e *Q. u-lucida*. Deste modo os dados indicam que o processo de desmetilação da (-)-grandisina envolve uma reação mediada por enzimas digestivas dos insetos.

O cromatograma do extrato fecal da lagarta da borboleta *H. hectorides* com dieta constituída de folhas de *P. solmsianum* apresentou três picos adicionais quando comparado com o cromatograma das folhas de *P. solmsianum* (Figura 3.9).

Figura 3.9. Perfil cromatográfico (CG) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. solmsianum* e fecal da lagarta *H. hectorides*.

A substância **L2** com $[M]^+$ em m/z 418 Da no IE/EM, 14 Da a menos que a (-)-grandisina, foi anteriormente identificada no extrato fecal do besouro *N. bipes* como sendo lignana *O*-desmetilgrandisina.

A substância **D2**, anteriormente observada no extrato fecal do besouro *N. bipes* com dieta constituída das folhas de *Piper tuberculatum*, foi identificada no extrato fecal da lagarta da borboleta *H. hectorides* baseado na análise dos dados espectrométricos de EM e RMN de H^1 . O espectro de massas (IE/EM) mostrou um pico correspondente ao íon molecular em m/z 212 Da compatível com a fórmula molecular de $C_{10}H_{12}O_5$. O espectro de RMN de H^1 mostrou a presença de hidrogênios aromáticos (δ 7,38, s, 2H) e três metoxilas aromáticas (δ 3,90, s, 6H; 3,89, s, 3H).

A estrutura da substância referente ao pico **F4** foi determinada através da interpretação dos dados de RMN de H^1 e IE/EM. O espectro de RMN de H^1 mostrou um singlete δ 6,79 atribuído aos dois hidrogênios do anel aromático, dois dubletos em δ 7,71 e 6,37 ($J = 15,8$ Hz) relacionados aos hidrogênios olefínicos e adicionalmente três metoxilas aromáticas sendo duas em δ 3,90 e outra em δ 3,83. A substância **F4** foi então determinada como o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (Lloyd *et al.*, 1976). A hipótese para a presença das substâncias **D2** e **F4** foi baseada na hidrólise de suas formas glicosiladas (**D6** e **F6**) durante o metabolismo *H. hectorides*. Assim, visando determinar a presença de **D6** e **F6**, a fração solúvel em água do extrato das folhas de *P. solmsianum* foi submetida à análise de RMN de 1H e de ^{13}C . A interpretação dos dados de ambos os espectros indicou a presença dos fenilpropanóides 3,4,5-trimetoxibenzoato de D-glicosila (**D6**) e 3,4,5-

Figura 3.11. Produtos do metabolismo da lignana (-)-grandisina (**L1**) em lagartas das borboletas *Q. u-lucida*, *H. hectorides* e no besouro adulto de *N. bipes*.

3.2.1.2 - Metabolismo das lignanas *epi-grandisina* (L4) e (7R,8S,7'S,8'R)-3',4'-metilenedioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (L5) das folhas de uma espécie alopatrica de *P. solmsianum* em *H. hectorides*

Uma espécie alopatrica de *P. solmsianum* foi coletada no Horto Florestal - SP e o estudo fitoquímico do extrato de suas folhas revelou a ocorrência das lignanas *epi-grandisina* (**L4**) e (7R,8S,7'S,8'R)-3',4'-metilenedioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (**L5**). Três espécimes da lagarta *H. hectorides* foram observadas alimentando-se das folhas dessa planta. Os espécimes foram coletados e mantidos em condições de laboratório com dieta constituída de folhas frescas de *P. solmsianum* para obtenção das fezes. As fezes secas foram extraídas com CH₂Cl₂:MeOH 2:1 e analisadas por CG/EM. O cromatograma do extrato fecal mostrou a presença adicional de dois picos **L6** e **L7** quando comparado com o cromatograma das folhas (Figura 3.12).

Figura 3.12. Perfil cromatográfico (CG) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. solmsianum* alopatrica e fecal da lagarta *H. hectorides*.

Os espectros de massas das substâncias **L6** e **L7** indicaram íons moleculares em m/z 418 e 404 Da, respectivamente. As massas moleculares de **L6** e **L7** correspondem a 14 Da a menos do que as massas moleculares das lignanas **43** e **44**, respectivamente, indicando uma desmetilação em ambas lignanas. As biotransformações das lignanas **L4** e **L5** produzindo as lignanas **L4** e **L5** foram confirmadas comparando-se as fragmentações padrões dos espectros de massas das lignanas (Figura 3.13).

Figura 3.13. Espectros de massas das substâncias **L4** ($C_{24}H_{32}O_7$, $M = 432$ Da, IE), **L6** ($C_{23}H_{30}O_7$, $M = 418$ Da, IE), **L5** ($C_{23}H_{28}O_7$, $M = 416$ Da, IE) e **L7** ($C_{22}H_{26}O_7$, $M = 402$ Da, IE).

Figura 3.14. Produtos do metabolismo das lignana **L4** e **L5** em lagarta da borboleta *H. hectorides* produzindo as substâncias **L6** e **L7**.

A evidência clara no espectro de massas da biotransformação da substância **L5** para a **L7** é a ausência do fragmento de m/z 236 no espectro da substância **L7** e a presença do fragmento de m/z 222, 14 unidades a menos que o m/z 236, indicando a possibilidade da reação de desmetilação.

Considerando-se que a desmetilação da (-)-grandisina ocorreu em insetos de duas ordens investigadas (Lepidoptera e Coleoptera), uma quarta espécie de inseto não identificada da ordem Orthoptera, conhecida popularmente como gafanhoto, foi coletada em folhas de *P. solmsianum* (planta hospedeira) para investigar se esse tipo de reação poderia ocorrer em um inseto de outra ordem. O gafanhoto foi mantido em cativeiro com dieta constituída de folhas frescas de *P. solmsianum* por um período de uma semana para obtenção de fezes. O extrato fecal do gafanhoto foi então analisado em CG/EM e foi observado em seu cromatograma nenhum produto da desmetilação da (-)-grandisina (**L1**) (Figura 3.15).

Figura 3.15. Perfil cromatográfico (CG) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. solmsianum* e fecal de uma espécie de gafanhoto.

3.2.1.3 - Biotransformações de neolignanas de *P. regnellii* pelas lagartas das borboletas *Q. u-lucida* e *H. brasiliensis*

As folhas e raízes de *P. regnellii* são fontes de fenilpropanóides altamente oxigenados como elemicina, apiol, dilapiol e uma série de neolignanas dihidrobenzofurânicas (Benevides *et al.*, 1999).

As folhas frescas de *P. regnellii* foram administradas às lagartas para obtenção das fezes com objetivo de investigar o destino metabólico das neolignanas.

As fezes secas de *H. brasiliensis* e *Q. u-lucida* foram extraídas com CH₂Cl₂:MeOH 2:1 e os extratos, após serem secos, foram analisados em CLAE.

O perfil cromatográfico do extrato fecal de *H. brasiliensis* revelou a presença de dois picos **N9** e **N5** além das neolignanas **N1-N4** (Figura 3.16).

Figura 3.16. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. regnellii* e fecal de *H. brasiliensis*.

Figure 3.17. Metabólitos secundários isolados das folhas de *P. regnellii*.

A análise dos espectros de massas (IES e IEEM) das substâncias **N9-N5** indicou os íons moleculares em m/z 270 m/z e m/z 254, respectivamente. Os espectros RMN de ^1H das substâncias **N9** e **N5** foram similares ao espectro da neolignana **N1**, mas mostrou um hidrogênio de ácido carboxílico e outro de aldeído em δ 8,58 (s, 1H) e 9,85 (s, 1H), respectivamente, ao invés da unidade propenila. Assim, a substância **N9** foi determinada como o ácido carboxílico (7*R*,8*R*)-3-metóxi-4-hidróxi-4',7-epóxi-neolignana. A estrutura da substância **N5** foi determinada como decurrenal também identificada no extrato fecal do besouro *N. bipes* e previamente isolada das folhas de *Piper decurrens* (Chauret *et al.*, 1996).

As substâncias **N9** e **N5** foram definidas como produtos do metabolismo das neolignanas **N3** e **N1** em lagartas da borboleta de *H. brasiliensis*, respectivamente. O mesmo metabolismo para neolignana **N1** foi também observado em lagartas da borboleta de *Q. u-lucida* (Figura 3.18).

Figure 3.18. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos do extrato das folhas de *P. regnellii* e fecal da lagarta *Q. u-lucida*.

Figure 3.19. Metabolismo das neolignanas **N1** e **N3** em lagartas das borboletas *H. brasiliensis* e *Q. u-lucida* produzindo **N5** e **N9**.

3.2.1.4 - Seqüestro das neolignanas N1-N4 das folhas de *P. regnellii* pela lagarta da borboleta de *H. brasiliensis*

As lagartas das borboletas de *Q. u-lucida*, *H. brasiliensis* e *H. hectorides* foram coletadas alimentando-se das folhas de suas espécies de *Piper* hospedeiras e criadas em condições de laboratório até a fase adulta com dieta constituída de folhas frescas de suas respectivas plantas de onde foram coletadas.

As borboletas recém eclodidas foram sacrificadas em recipiente fechado contendo papel de filtro umedecido com clorofórmio. As borboletas secas foram extraídas com $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1) e seus extratos avaliados por meios de análises de CLAE e CG/EM. O cromatograma do extrato dos tecidos da borboleta de *H. brasiliensis* indicou as presenças das neolignanas **N1-N4** (Figura 3.20) que foram confirmadas com os espectros de massas obtidos através da análise de CG/EM.

Figure 3.20. Perfil cromatográfico (CLAE) dos constituintes químicos dos extratos dos tecidos da lagarta da borboleta *H. brasiliensis* e das folhas de *P. regnellii*.

3.2.1.5 - Uma exceção na adaptação de *Lepidoptera* em folhas de *Piperaceae*

Foram observadas duas lagartas coortes da borboleta *H. brasiliensis* predando folhas de *P. tuberculatum*, sendo que essa *Piper* não acumula nas folhas lignanas ou neolignanas, mas uma série de amidas (Navickiene *et al.*, 2000). Esse fato é novo e considerado uma exceção, pois todas as lagartas de espécies de *Lepidoptera* foram encontradas em folhas de *Piper* que acumulam lignanas ou neolignanas.

Considerando-se que as amidas de *Piper* possuem potente atividade inseticida, as lagartas foram coletadas e mantidas com dieta constituída de folhas de *P. tuberculatum* em cativeiro para obtenção de suas fezes no intuito de investigar o destino metabólico das amidas. O extrato fecal foi analisado por CG/EM e constatou-se que as amidas **A1** e **A2** foram parcialmente hidrolisadas, as amidas **A3** e **A4** totalmente hidrolisadas, e constatou-

se que as amidas **A5** e **A6** não sofrem hidrólises durante o processo digestivo (Figuras 3.21 – 3.22).

Figura 3.21. Perfil cromatográfico (CG/EM) dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *P. tuberculatum* e fecal da lagarta *H. hectorides*.

Figura 3.22. Reação de hidrólise das amidas de *P. tuberculatum* durante o processo digestivo da lagarta *H. hectorides*.

Considerando-se que amidas são conhecidas por sua potente atividade inseticida as duas coortes lagartas de *H. hectorides* mantidas com dieta constituída das folhas de *P. tuberculatum* visando avaliar a variação da massa corporal e também para a obtenção de

fezes. O mesmo procedimento foi realizado com dieta constituída de folhas de *P. regnellii*, planta hospedeira das larvas de *H. brasiliensis*, para fins de comparação e controle (Figura 3.23).

Figura 3.23. Variação das massas corporais das lagartas de *Heraclides hectorides* com dieta de folhas de *P. regnellii* (Pr1 e Pr2) e *P. tuberculatum* (Pt1 e Pt2).

Apesar da amostragem não ser estatisticamente significativa, observa-se que as larvas mantidas com dieta baseada em folhas de *P. tuberculatum* têm cerca de 50 % de massa corporal reduzida na 1ª pesagem, 69 % na 2ª pesagem, 34% na 3ª pesagem, 63 % na 4ª pesagem e de 30 % na 5ª pesagem, com relação às larvas mantidas com folhas de *P. regnellii*.

3.3 – Experimental

3.3.1 - Material geral

Utilizou-se Sílica gel (230 – 400), sílica gel de fase reversa (C₁₈) e Sephadex da Merck para as colunas cromatográficas e os solventes foram destilados para uso. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em 300 e 75 MHz (Bruker DPX-300) e 200 e 50 MHz (Bruker AC-200), respectivamente, usando CDCl₃ e MeOD como solvente e TMS como referência (Aldrich). Os espectros de IV foram obtidos em um espectrômetro Nicolet. Os espectros de massas (IE) foram medidos a 70 eV em um espectrômetro Hewlett Packard modelo 5990/5988A. Cromatografia líquida de alta eficiência modelo HP series 1050 com detector UV, integrador HP 3395 e cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo Shimadzu modelo LC-10, equipado com bomba ternária e detector UV e fluorescência munido de injetor automático SIL-10A. A coluna utilizada para análise foi uma de fase reversa RP-18 Supelco (5 µm d.i., 4 x 250 mm)

3.3.2 - Material vegetal

As folhas das espécies de *Piper* foram coletadas no Campus da Universidade de São Paulo em dezembro de 2000 e no horto florestal - SP em 2003 (uma espécie alopatrica de *P. solmsianum*). As folhas foram secas em estufa a 40°C por 48 h e depois trituradas em moinho de lâminas foram extraídas com CH₂Cl₂:MeOH (2:1, três vezes). Os extratos foram secos a vácuo e submetido às análises cromatográficas e espectrométricas.

3.3.3 - Material entomológico

Os insetos foram coletados no Campus da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP (S 23°33'906" WO 46°43'634", Ubatuba – SP (Brasil), S 23°27',731" W 45°11.760"), Poços de Caldas – MG (Brasil) S 21°58',300" W 46°22,296') e Itabuna-Ba (Brasil), e foram identificados pelo Prof^o. Dr. Sérgio Antônio Vanin (Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo). Os exemplares das espécies estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; *Quadrus u-lucida* (CSR005), *Heraclides brasiliensis* (CSR006) e *Heraclides hectorides* (CSR007). O material fecal e os tecidos dos insetos foram secos em estufa a 40 °C por 48 h e

macerados em porcelanas e em seguida extraídos com $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1, três vezes). Os extratos secos a vácuo foram submetidos às análises cromatográficas e espectrométricas.

3.3.4 - Análise por CLAE e CG

Condição utilizada em CLAE para obtenção dos cromatogramas das figuras 3.6 e 3.8.

Condição utilizada em CLAE para obtenção dos cromatogramas das figuras 3.16, 3.18 e 3.20.

Condição utilizada em CG para obtenção dos cromatogramas das figuras 3.9, 3.12, 3.15 e 3.20.

Temperatura do forno: 100 °C
Tempo de equilíbrio do forno: 1 min
Temperatura do injetor: 280 °C
Temperatura da interface: 280 °C
Coluna: Capilar HP DB-5
(30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm)
Pressão da coluna: 80 kPa
Fluxo da coluna: 1,1 mL/min
Total de fluxo: 80,3 mL/min
Gás de arraste: He
Splitless
Detector: FID

3.3.5 - Incubação da (-)-grandisina (L1) com o fluido digestivo da lagarta *Q. u-lucida*

50 µg do substrato (-)-grandisina (**L1**) foi incubado com fluido digestivo removido da lagarta da borboleta *Q. u-lucida* (0,5 mL) em tubo eppendorf contendo 1 mL de DMSO em pH 6,0 (Tampão fosfato) em banho maria a 30 °C. Após 1 h de incubação, a mistura foi extraída com AcOEt (3 mL, duas vezes). O extrato foi seco com N₂ e dissolvido em 0,3 mL de MeOH e analisado por CLAE/EM.

3.3.6 - Fenilpropanóides glicosilados

Ver capítulo 2, página 60.

3.3.7 - Isolamento da lignana L3 do extrato fecal de *Q. u-lucida* com dieta constituída de folhas de *P. solmsianum*

Fezes secas (150 mg) de *Q. u-lucida* com dieta constituída de folhas de *P. solmsianum* foram trituradas e extraída com AcOEt por três vezes de 100 mL, que após concentrada a vácuo produziu 40 mg de extrato bruto. O extrato foi dissolvido em AcOEt (50 mL) e extraído com uma solução de 1 mol/L de NaOH por três vezes de 30 mL. Após remoção da fração neutra a fração aquosa foi acidificada com HCl concentrado e extraído com AcOEt (30 mL) por três vezes. O extrato foi concentrado e produziu 10 mg que foi submetido à TLC e eluído três vezes com hexano-AcOEt (3:2) para produzir 1 mg da substância **L3**.

3.3.8 - Isolamento das substâncias L2, D2 e D6 do extrato fecal de *H. hectorides* com dieta constituída de folhas de *P. solmsianum*

As fezes secas (400 mg) de *H. hectorides* foram extraídas usando o mesmo procedimento para o isolamento da lignana **L3**. O fracionamento do extrato fecal das fezes de *H. hectorides* resultou no isolamento das substâncias **L2** (3 mg), **D2** (2 mg) e **D6** (1,3 mg).

3.3.9 - Isolamento das lignanas L4 e L5 do extrato das folhas de uma espécie alopátrica de *P. solmsianum*

Folhas secas de *P. solmsianum* (6 g) foram maceradas e extraídas com CH₂Cl₂ por 48 h que após concentração a vácuo produziram 400 mg de extrato bruto. O extrato foi dissolvido em uma solução de MeOH:H₂O 4:1 (150 mL) e filtrada a vácuo em um funil de Buchner com papel de filtro e preenchido com celite (3/4 v/v). O extrato filtrado foi extraído com CH₂Cl₂ por três vezes que após concentração produziu 70 mg de extrato bruto. O extrato concentrado (25 mg) foi submetido à cromatografia planar preparativa usando como fase móvel hexano-AcOEt 3:2 eluindo cinco vezes que resultou no isolamento da lignana **L4** (3 mg) e **L5** (5 mg).

3.3.10 – Caracterização das lignanas L6 e L7 do extrato fecal de *H. hectorides* com dieta constituída de folhas da espécie alopátrica de *P. solmsianum*.

As estruturas das lignanas **L6** e **L7** foram determinadas baseadas nas interpretações dos dados de seus espectros de massas obtidos a partir da análise do extrato fecal por CG/EM.

3.3.11 - Isolamento das lignanas N9 e N5 do extrato fecal de *Q. u-lucida* constituída de folhas de *P. regnellii*.

Fezes secas (0.57 g) foram extraídas com CH₂Cl₂:MeOH 2:1 que após concentrada produziu 58 mg de extrato bruto. O extrato bruto foi aplicado em duas placas preparativas, 25 mg cada, com fase móvel hexano-AcOEt 3:2 eluindo por três vezes e, após as extrações com AcOEt, foram obtidas as neolignanas N9 (2 mg) e N5 (1,5 mg).

3.3.12 - Extração enzimática da folhas de *P. solmsianum*

Para a obtenção do extrato enzimático, triturou-se o material vegetal previamente congelado em N₂ líquido 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 para 1 g de material com objetivo de quelar os fenóis porventura extraídos e que pudessem interferir na atividade enzimática, 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 correspondente à preparação enzimática foi armazenado em banho de gelo 4 °C e o precipitado foi descartado.

3.3.13 - 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. Em seguida eluiu-se 3,5 mL do tampão borato 0,1 M e este volume que corresponde à preparação enzimática, 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, seqüencialmente. Finalmente eluiu-se 5 mL de uma solução de azida 0,2 % e a coluna foi armazenada a 4 °C em 5 mL desta solução.

3.3.14 - Incubação da grandisina com preparação enzimática

A preparação enzimática contendo o extrato enzimático foi incubada com o substrato a lignana (-)-grandisina para verificar a formação da lignana *O*-4-desmetilgrandisina. Esta incubação foi realizada adicionando-se as seguintes soluções em tubo cônico de 2,0 mL.

- 20 µL NADH 50 mM;
- 20 µL H₂O₂;
- 50 µg de (-)-grandisina (Solução preparada em DMSO);
- 200 µL da preparação enzimática;
- 250 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5;
- Também foi realizada a incubação com 250 µL de tampão borato 0,1 M, pH 8,0.

A reação foi incubada a 29 °C por 30 minutos e interrompida pela adição de HCl 12 N, com objetivo de desnaturar a enzima.

Foram preparados também vários controles (branco) para a análise, onde a reação do extrato enzimático sobre o substrato foi imediatamente inibida pela adição de HCl 12 N.

1º Controle:

- 50 µg de (-)-grandisina (solução preparada em DMSO); 250 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 ou 250 µL de tampão borato 0,1 M, pH 8,0; 200 µL da preparação enzimática.

2º Controle:

- 20 µL NADH 50 mM; 20 µL H₂O₂; 50 µg de (-)-grandisina (solução preparada em DMSO); 250 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5m ou 250 µL de tampão borato 0,1 M, pH 8,0.

3º Controle:

- 20 µL NADH 50 mM; 20 µL H₂O₂; 200 µL da preparação enzimática; 250 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 ou 250 µL de tampão borato 0,1 M, pH 8,0.

4º Controle:

- 50 µg de (-)-grandisina (solução preparada em DMSO); 200 µL da preparação enzimática desnaturada em 100 °C.

3.4 - Conclusões

3.4.1 - Especificidade Química

Lignanas e neolignanas têm recebido grande atenção em diversas áreas devido as diversas atividades biológicas (Umezawa *et al.*, 2003; Apers e Pieters, 2003), incluindo inseticida (Gao *et al.*, 2004) e fago inibidora (Srivastava *et al.*, 2001). Entretanto, as borboletas *H. hectorides*, *H. brasiliensis* e *Q. u-lucida* possuem uma estreita especificidade por folhas de espécies de *Piper* acumuladoras de lignanas e/ou neolignanas mesmo em populações ou espécies alopátricas. Esta especificidade constitui-se em num dado inédito para o estudo das funções ecológicas de lignanas e neolignanas em plantas e que assume significado de grande relevância quando se objetiva o estudo da co-evolução de plantas e insetos. O termo coevolução é muito amplo e complexo, pois o mesmo foi usado pela primeira vez para descrição sobre prováveis influências mútuas que plantas e insetos herbívoros têm sobre a evolução (Ehrlich e Raven, 1964). O fato das espécies de *Piper* serem primitivas, entre as Angiospermas (Taylor e Hickey, 1992), e o fato de neolignanas possuírem ocorrência bastante restrita para certas famílias de plantas pode indicar a importância do evento à luz de aspectos evolutivos (Umezawa, 2003).

Pode-se sugerir que as espécies de *Piper*, ou seus ancestrais, sendo consideradas espécies estáticas, ocasionalmente, desenvolveram uma “defesa química de amplo aspecto” como lignanas e neolignanas que as protegem da predação da maioria dos predadores. Porém, tais substâncias podem ter assumido um papel importante para a definição de especificidade de predadores como *H. brasilienses*, *Q. u-lucida* e *H. hectorides* que adquiriram adaptações para superar a defesa química de espécies de *Piper* utilizando-as como suas plantas hospedeiras.

Em suma, pode-se afirmar que essas espécies de Lepidoptera são completamente adaptadas e especializadas a essas espécies de *Piper* acumuladoras de lignanas e neolignanas por provável mecanismo de co-evolução ou co-adaptação.

3.4.2 - Metabolismo das lignanas e neolignanas

Embora as lignanas e neolignanas sejam bem conhecidas por possuírem atividades biológicas contra insetos, existem poucos relatos sobre seus destinos metabólicos em insetos (Miyazawa, 2001). A investigação do metabolismo de lignanas e neolignanas

acumuladas em folhas de espécies de *Piper* em lagartas das borboletas *H. hectorides*, *H. brasiliensis* e *Q. u-lucida* mostrou que ambas as substâncias são biotransformadas em suas formas mais polares como observado anteriormente no Capítulo 2 para o besouro *N. bipes*. As lignanas são desmetiladas produzindo seus respectivos fenóis. As neolignanas sofrem clivagem oxidativa na unidade propenila gerando os respectivos ácidos ou aldeídos. O metabolismo de lignanas e neolignanas vem corroborar o trabalho relatado por Harmathan (2002), que a presença de substituintes mais polares, especialmente grupos hidroxílicos, muitas vezes reduz a atividade deterrente de lignanas. Portanto, é plausível argumentar que as lagartas são capazes de biotransformar as lignanas e neolignanas para suas formas mais polares visando reduzir suas prováveis toxicidades.

3.4.3 - Seqüestros

O seqüestro de metabólitos secundários tóxicos de suas respectivas plantas hospedeiras e seu uso para diversos propósitos próprios é um tema bem conhecido em ecologia química. Um dos estudos clássicos é o seqüestro de alcalóides pirrolizidínicos por mariposa e borboletas (Aplin *et al.*, 1968; Brown, 1984a/1984b; Trigo, 2000).

Nesse trabalho é relatado o primeiro dado de seqüestro de neolignanas por uma espécie de borboleta. A lagarta da borboleta *H. brasiliensis* seqüestra as neolignanas **N1-N4** de folhas de *P. regnellii* e as mantém até fase adulta. Os insetos nas fases larval e adulta da *H. brasiliensis* possuem coloração aposemática característica de insetos capazes de seqüestrar ou acumular substâncias tóxicas de sua dieta (Wink *et al.*, 2000).

Capítulo 4

Especificidade e aspectos químicos de insetos sugadores de seivas hospedeiros de Piperaceae

4.1 – Introdução

Os insetos sugadores de seivas, como o próprio nome indica, são aqueles que se alimentam das seivas do floema e xilema de várias partes das plantas. O floema transporta a seiva elaborada que é rica em açúcares e alguns aminoácidos biossintetizados nas folhas para outras partes da planta (Figura 4.1). Por sua vez o xilema transporta primeiramente a seiva bruta que é constituída de água e sais minerais das raízes para as partes aéreas da planta (Hopkins, 1995).

Os insetos sugadores de seivas são pertencentes a ordem Hemiptera, e esta pode se dividida em duas; Homoptera e Heteroptera. Entre as famílias mais importantes, em termos de impacto econômico, encontram-se as famílias Miridae, Pentatomidae e Lygaeidae na ordem Heteroptera. Entre a Homoptera, os sugadores mais importantes são os afídeos que são os saltadores de folhas (McNaughton, 1983).

4.1.1 – Importância econômica

O seqüenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, realizada por cientistas brasileiros (Simpson *et al.*, 2000), é um entre os 24 genomas completos de bactéria até então disponíveis (Bevan, 2000) e surgiu da necessidade de controlar as perdas de safras de frutas cítricas infestadas pela *X. fastidiosa*. A bactéria *X. fastidiosa* é altamente especializada e sua multiplicação ocorre no intestino anterior dos saltadores de folhas (Homoptera) que sugam a seiva da planta via xilema. O inseto injeta a bactéria diretamente na planta via xilema e, quando esta se multiplica, causa perda de clorofila, amarelamento e a produção prematura dos frutos, acarretando prejuízos nas safras cítricas. A doença é potencialmente devastadora e seu controle é limitado à remoção das

plantas infestadas, aplicação de inseticida e o uso de plantas saudáveis para novos pomares (Simpson *et al.*, 2000).

A principal praga da cultura de arroz é o inseto saltador de planta marrom, *Nilaparvata lugens*, que tornou-se um dos mais prejudiciais em termos de perdas de colheita nos últimos 20 a 30 anos (Khush, 1990). O *N. lugens* não só causa dano direto ao arroz por remoção de seiva do floema e a produção de “hopperburn” na colheita devido a bloqueio de nutrientes ao floema, mas também age indiretamente como um vetor para vários vírus. O controle do *N. lugens* pelo uso de inseticidas é inviável, pois o inseto adquiriu resistência rapidamente em campo (Whitten e Oakenshott, 1991). Além disso, o uso indiscriminado de pesticidas resultou em diminuições drásticas nas populações de seus predadores naturais.

Considerando-se o impacto causado pelos sugadores de seivas na produção mundial de alimento, a inviabilidade do uso de inseticidas na maioria dos casos e a resistência ao uso de plantas transgênicas, torna-se urgente a busca de métodos alternativos para o controle desses insetos pragas. Assim, uma etapa primordial é conhecer e entender os fatores químicos envolvidos que influenciam diretamente de modo positivo ou negativo as interações entre os sugadores de seivas e suas plantas hospedeiras.

4.1.2 – Mecanismo alimentar dos sugadores de seivas

O mecanismo alimentar dos insetos sugadores de seivas é complexo, altamente especializado e envolve várias etapas (Kerkute e Gilbert, 1984):

- 1) Conexão mecânica: uma conexão mecânica de seu aparelho sugador deve ser feita para permitir que o inseto possa penetrar nos tecidos das plantas;
- 2) Perfuração: a perfuração inicial é extremamente importante, pois a camada superficial da fonte alimentar muitas vezes difere estruturalmente e mecanicamente das camadas subjacentes e por isso demanda um aparato especializado;
- 3) Profundidade da perfuração: a profundidade da perfuração é variada dependendo do local do material nutritivo e também requer um aparato especializado;
- 4) A planta hospedeira: são necessários sinais mecânicos ou químicos apropriados para indicar que a fonte de alimento foi alcançada;
- 5) Sistema de bombeamento: um sistema de bombeamento é necessário para criar um gradiente de pressão negativa entre o líquido e o intestino. Considerando que o

líquido nutritivo pode estar a uma pequena distância da boca do inseto, uma estrutura para sua captação pode ser necessária; um canal resistente a consideráveis diferenças de pressão entre o lúmen e exterior, e ter uma resistência mínima ao fluxo de fluido;

6) Saliva: uma secreção especial através da saliva do inseto é necessária para ajudar na penetração, agindo como lubrificante ou por rupturas químicas de componentes dos tecidos.

Em sumário, as principais dificuldades mecânicas para os insetos sugadores de seiva envolvem as localizações exatas das fontes de alimentos, o rompimento dos tecidos através da perfuração e um gradiente de pressão que permita o fluido chegar até o intestino do inseto.

O padrão de lignificação da planta está diretamente relacionado com as barreiras mencionadas anteriormente na alimentação dos insetos sugadores de seivas. A dureza do caule da planta pode contribuir de forma positiva ou negativa para o inseto e para tanto, a composição da lignina deve exercer papel dos mais importantes. Além, disso o teor de macronutrientes e micronutrientes é essencial na seletividade da planta hospedeira pelos sugadores.

Outro fator determinante na seletividade é a presença de aleloquímicos como metabólitos secundários nas seivas (Molyneux *et al.*, 1990; Ehmke *et al.*, 1988), floema e xilema, que podem inibir a alimentação de predadores e são conhecidos como defesa química da planta (Herrera e Pellmyr, 2002).

Assim, a seletividade e especificidade de insetos sugadores de seivas em espécies de Piperaceae foram investigadas considerando-se os seguintes aspectos: 1) metabólitos secundários acumulados nas folhas e caules das plantas; 2) o padrão de lignificação das plantas; 3) conteúdo da seiva e o teor de nutrientes das plantas (Figura 4.1).

Figura 4.1. Uma espécie de sugador alimentando-se da seiva da planta.

4.2 – Resultados

4.2.1 – Especificidade química

Os insetos sugadores, assim como os besouros e as borboletas, apareceram naturalmente no canteiro do LQPN onde cinco espécies, adultos e ninfas, foram identificadas.

M. foliata

Informações Taxonômicas

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Hemiptera
Família	Membracideo
Gênero	Membracis
Espécie	<i>M. foliata</i>

Foto, MJK

Nome popular -

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *P. aduncum* e *P. arboreum*.

Callocanophora sp.**Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Hemiptera
Família	Membracideo
Gênero	<i>Callocanophora</i>
Espécie	<i>Callocanophora</i> sp.
Nome popular	Cigarrinha

Foto, MJK

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *P. gaudichaudianum*, *P. aduncum* e *P. arboreum*.

*A. reticulatum***Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Hemiptera
Família	Aethalionidae
Gênero	<i>Aethalium</i>
Espécie	<i>A. reticulatum</i>

Foto, MJK

Nome popular Cigarrinha

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *P. gaudichaudianum*, *P. tuberculatum*, *P. aduncum* e *P. arboreum*

*S. armata***Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Hemiptera
Família	Pentatomidae
Gênero	<i>Sibaria</i>
Espécie	<i>S. armata</i>
Nome popular	Maria fedida

Foto, CSR

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *P. hispidum*, *P. cernuum*, *P. aduncum* e *P. arboreum*.

*S. sagata***Informações Taxonômicas**

Filo	Artropoda
Classe	Hexapoda
Ordem	Hemiptera
Família	Pentatomidae
Gênero	<i>Sibovia</i>
Espécie	<i>S. sagata</i>

Foto, MJK

Nome popular -

Método: Acervo de coleção.

Local e data coleta: Instituto de Química da USP - São Paulo, 27/11/00.

Plantas hospedeiras: *P. solmsianum*, *P. regnellii* e *P. tuberculatum*.

A preferência alimentar dos sugadores de seivas por espécies de Piperaceae cultivadas no canteiro do IQ-USP foi claramente definida durante um período de quatro anos. Foi observada uma estreita especificidade química dos sugadores associados com os caules das espécies de Piperaceae acumuladoras de ácidos benzóicos prenilados (ABPs), principalmente por *Piper aduncum* (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Espécies de sugadores de seivas e suas respectivas plantas hospedeiras.

Insetos	Adultos Ninfas	Piperaceae	Metabólitos secundários
<i>S. sagata</i>	folha	<i>P. regnellii</i>	neolignanas
	folha	<i>P. solmsianum</i>	lignanas
	folha	<i>P. turberculatum</i>	amidas
<i>M. foliata</i>	caule	<i>P. arboreum</i>	ABPs
	caule	<i>P. gaudichaudianum</i>	ABPs
	caule	<i>P. arboreum</i>	ABPs
<i>Callocanophora</i> sp	caule	<i>P. aduncum</i>	ABPs
<i>A. reticulatum</i>	caule	<i>P. aduncum</i>	ABPs
	caule	<i>P. arboreum</i>	ABPs
	caule	<i>P. arboreum</i>	ABPs
<i>S. armata</i>	fruto	<i>P. hispidum</i>	ABPs
	fruto	<i>P. cernium</i>	hidroquinonas

ABPs: ácidos benzóicos prenilados

Considerando-se a complexidade envolvida no hábito alimentar dos sugadores de seivas e as muitas variáveis a serem consideradas incluindo o teor de nutrientes, lignificação e semioquímicos, os estudos foram direcionados, quando possível, comparando-se essas variáveis das plantas hospedeiras (acumuladoras de ABPs) e não hospedeiras (não acumuladoras de ABPs).

4.2.2 – Ocorrência de metabólitos secundários nas seivas

Uma etapa inicial foi investigar se os metabólitos secundários acumulados nos tecidos dos caules e folhas das plantas hospedeiras e não hospedeiras estariam também presentes em suas seivas. Assim, as seivas coletadas de quatro espécies de Piperaceae, duas hospedeiras (*Piper aduncum* e *P. arboreum*) e duas não hospedeiras

(*P. solmsianum* e *P. regnellii*) foram submetidas a análises em CLAE. Nas quatro espécies de Piperaceae foram detectadas a presença de metabólitos secundários.

A espécie *P. aduncum* acumula em suas folhas e caules ABPs e o fenilpropanóide dilapiol (Orjala *et al.*, 1993).

Figura 4.2. Metabólitos secundários isolados das folhas e caules de *P. aduncum*.

O cromatograma (Figura 4.3) das seivas de *P. aduncum* não indicou a presença de ácidos benzóicos prenilados, mas apenas presença da substância **F6** (dilapiol), também constituinte das folhas de *P. aduncum*. A presença significativa de dilapiol nas seivas foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.4).

Figura 4.3. Cromatogramas (CLAE) da substância padrão **F6** constituinte das folhas de *P. aduncum* e do extrato de seivas.

Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹H da seiva de *P. aduncum* (CDCl₃, 200 MHz).

O espectro de RMN de ¹H do dilapiol mostrou apenas um singlete em δ 6,36 na região de hidrogênios aromáticos, referente a um hidrogênio aromático; três intensos singletos em δ 5,91, 4,01 e 3,76, característicos de um grupo metilenodioxifenílico e de

dois metoxílicos, respectivamente. Um singlete intenso em δ 1,25 indicou que além do dilapiol, a seiva contém substâncias alifáticas de cadeia longa.

O cromatograma (Figura 4.5) das seivas de *P. solmsianum* indicou a presença da lignana **L1** [(-)-grandisina] e do fenilpropanóide **F1** (*E*-isoeleminicina) cujas estruturas foram confirmadas também pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.6)

Figura 4.5. Cromatogramas do extrato das folhas *P. solmsianum* e seivas (bruta + elaborada).

Figura 4.6. Espectro de RMN de ¹H das seivas de *P. solmsianum* (CDCl₃, 200 MHz)

Foi também observado no espectro de RMN de ¹H das seivas de *P. solmsianum* um singlete predominante em δ 1,25 indicando novamente a ocorrência de substâncias alifáticas.

4.2.3 - Presença de ABPs nos tecidos dos insetos.

Uma etapa seguinte foi investigar se os metabólitos secundários presentes nas seivas também ocorreriam nos tecidos dos insetos hospedeiros. Assim, os extratos dos insetos *Callocanophora sp.* e *E. reticulatum* mantidos em jejum por 48 h foram analisados por CLAE.

Os cromatogramas dos extratos dos insetos indicaram metabólitos secundários presentes nas seivas de suas plantas hospedeiras (Figura 4.7).

Figura 4.7. Cromatograma (CLAE) do extrato dos tecidos dos insetos sugadores de seivas.

4.2.4 - Análises de carbono (C) hidrogênio (H), nitrogênio (N), micronutrientes e macronutrientes em espécies de Piperaceae predadas por Hemiptera

4.2.4.1 - Análise elementar de C, H e N

A análise elementar de C, H e N foi realizada em espécies de Piperaceae hospedeiras (*P. arboreum*, *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum*) e duas espécies não hospedeiras (*P. solmsianum* e *P. regnellii*), com o objetivo de procurar outros fatores eventualmente envolvidos nas especificidades.

As composições de C, H e N foram bastante semelhantes nas folhas das cinco espécies de Piperaceae analisadas. O mesmo foi observado nos caules (C), porém a porcentagem de N nas folhas (F) foi aproximadamente duas vezes maior em relação a observada nos caules (Figura 4.8)

Figura 4.8. Teores de C, H e N das folhas e caules de espécies Piperaceae.

4.2.4.2 - Análises de macronutrientes e micronutrientes em espécies de Piperaceae

Por via de regra, serão considerados aqui macronutrientes aqueles que possuem concentrações relativamente elevadas, da ordem de 1 g/Kg (MS). Enquanto, os micronutrientes aqueles que possuem concentrações relativamente baixas, da ordem 100 mg/Kg (MS).

O objetivo inicial era realizar as análises nas cinco espécies de Piperaceae onde foram determinadas as composições de C, H e N. Entretanto, por questões técnicas e de padronização na abertura das amostras foi possível analisar apenas os macronutrientes e micronutrientes em *P. aduncum* e *P. regnellii*, espécies hospedeira e não hospedeira de insetos sugadores seivas, respectivamente.

4.2.4.3 – Macronutrientes

Os macronutrientes analisados foram P, Ca e Mg nas folhas e caules de *P. aduncum* (Pad) e *P. regnellii* (Pr) (Figuras 4.9 e 4.10).

Figura 4.9. Composição de macronutrientes nas folhas de *P. aduncum* e *P. regnellii*.

Figura 4.10. Composição de macronutrientes nos caules de *P. aduncum* e *P. regnellii*.

Foi observado nos gráficos que a quantidade dos três macronutrientes nas folhas e caules em *P. regnellii* é maior em relação a *P. aduncum*.

4.2.4.4 – Micronutrientes

Os micronutrientes analisados foram Mn, Fe, Cu, Zn, Na e B nas folhas e caules de *P. aduncum* (Pad) e *P. regnellii* (Pr) (Figuras 4.11 e 4.12).

Figura 4.11. Composição de micronutrientes nas folhas de *P. aduncum* e *P. regnellii*.

Figura 4.12. Composição de micronutrientes nos caules de *P. aduncum* e *P. regnellii*.

Foi observado que a quantidade de micronutrientes em *P. aduncum* é maior em relação a *P. regnellii*, principalmente nos caules onde os insetos sugam a seiva. Resultado oposto foi observado para os macronutrientes.

4.2.5 – Ligninas: um fator determinante para o sucesso de insetos sugadores de seiva

Os fatores físicos associados à dureza dos tecidos internos de plantas, tais como os feixes de fibras lignificadas nas folhas e caules podem constituir-se em obstáculos para os insetos sugadores (Edwards e Wratten, 1980).

As espécies de angiospermas, grupo onde a família Piperaceae está incluída, são classificadas como madeira dura e que possuem como precursores o álcool coniferílico (resíduo guaiacila, **G**) e o álcool sinapílico (resíduo siringila, **S**), enquanto as

gimnospermas são classificadas como madeiras moles e possuem predominantemente o resíduo **G** (Budziak *et al.*, 2004).

Portanto, todas as espécies de Piperaceae são consideradas madeiras duras. No entanto, existem variações na relação dos resíduos **G/S** em espécies de Piperaceae em proporções que afetam essa dureza. Assim, foi realizada uma comparação da relação **G/S** da espécie hospedeira (*P. aduncum*, acumuladora de ácidos benzóicos prenilados) e não hospedeiras (*P. regnellii* e *P. solmsianum*, acumuladoras de lignanas e neolignanas), e observou-se uma predominância do resíduo **S** na espécie hospedeira (Silva *et al.*, 2005).

Os possíveis modos de ligações que ocorrem no processo de lignificação (Figura 4.13) envolvem os quatros modos de acoplamentos possíveis entre o álcool coniferílico e o resíduo **G**. Essa diversidade de modos de acoplamentos não seria possível para o resíduo **S**, onde apenas o acoplamento β -O-4 seria observado.

Figura 4.13. Indicações dos modos de dimerização de álcool coníferílico para formação de ligninas. As setas indicam as posições onde ocorreram os acoplamentos durante a lignificação.

O resíduo **S** deve ter menor potencial de redução em relação ao resíduo **G** devido à presença adicional de um grupo metoxílico doador de prótons. O resíduo **G** pode ser condensado pelo acoplamento adicional C-C no C_5 contribuindo especialmente para a formação de ligninas condensadas e recalcitrantes. Esse acoplamento adicional não é possível entre os resíduos **S** devido à posição do C_5 ser ocupada pelo grupo metoxílico (Martinez *et al.*, 1999). Desse modo, a biodegradação e a organização estrutural de ligninas podem ser afetadas pela composição em termos da relação entre os resíduos **G/S** e de seus acoplamentos.

Com base nas informações citadas anteriormente, as ligninas com predominância de resíduo **S** são mais biodegradáveis devido ao baixo potencial de redução. Possuem vãos condutores resultantes da fusão devido a desaparecimento dos septos intermediários de séries longitudinais de elementos vasculares. Assim, formam-se longos tubos contínuos, cujo comprimento pode alcançar vários metros oferecendo uma resistência menor à circulação de seiva.

Portanto, a predominância do resíduo **S** em ligninas constitui em um fator que contribui positivamente para o sucesso de insetos sugadores de seiva, pois as ligninas são mais biodegradáveis para os insetos, ou seja, são menos resistentes à perfuração.

Além disso, possuem um fluxo de seiva maior que favorece um gradiente de pressão negativo que favorece ingestão das seivas pelos insetos.

Dessa forma pode-se sugerir que a preferência de insetos sugadores de seiva por espécies de Piperaceae que acumulam ácidos benzóicos prenilados pode ser em parte devido ao alto teor de resíduos **S** em suas ligninas.

Considerando que Gottlieb (1994) propôs a interdependência biossintética de ligninas e metabólitos secundários em Angiosperma, pode-se sugerir que os ácidos benzóicos prenilados acumulados nas folhas e caules em espécies de Piperaceae têm uma relação direta com o padrão de lignificação, ou seja, uma espécie de Piperaceae que acumula esse tipo de ácido resultaria em processos de lignificação com altos teores de resíduos **S**.

4.2.6 - Concentração estimada de metabólitos secundários no conteúdo das seivas de *P. solmsianum* e *P. aduncum*

Em ambas as seivas de *P. aduncum* e *P. solmsianum* foram identificados metabólitos secundários. A concentração desses metabólitos no conteúdo das seivas é uma variável importante devido ao fato de que muitos metabólitos secundários de plantas atuam como aleloquímicos, agindo como deterrentes, fago-inibidores ou estimulantes, e que causam efeitos fisiológicos e comportamentais significativos em insetos. Assim, foi realizada uma estimativa na concentração desses metabólitos nas seivas de *P. aduncum* e *P. solmsianum*.

Os rendimentos obtidos de massa seca da fase orgânica para as seivas coletadas foram de 1,91 mg e de 8,67 mg em 100 mL para *P. aduncum* e para *P. solmsianum*, respectivamente. Portanto, a concentração de metabólitos secundários em *P. solmsianum* é de aproximadamente 4,5 vezes maior do que em *P. aduncum*. Entretanto, a princípio esperava-se um resultado oposto devido ao fato das seivas de *P. solmsianum* conterem a lignana (-)-grandisina, um composto insolúvel em água e de massa molecular relativamente alta (432 Da). Aparentemente, a elevada concentração de metabólitos secundários nas seivas de *P. solmsianum* pode ser devida à presença de ácidos graxos que agiriam como um emulsificante.

A análise por CG/EM das seivas de *P. solmsianum* (Figura 4.14) mostrou a presença somente da isoeleicina (**F1**), grandisina (**L1**) e ácidos graxos.

Figura 4.14. Cromatograma (CG) das seivas de *P. solmsianum*

4.2.7 - Bioensaio comportamentais

4.2.7.1 – Teste de olfatometria

O teste de olfatometria foi adotado no estudo comportamental dos insetos sugadores de seivas, pois as antenas dos mesmos apresentam baixas respostas em ensaios eletroantenográficos (EAG e CG-EAD). Assim duas espécies de sugadores de seivas foram escolhidas; as espécies *Aethalium reticulatum* e *Sibaria armata*.

4.2.7.2 – *A. reticulatum* frente aos óleos essenciais das folhas de *P. aduncum* (hospedeira) e das folhas de *P. regnellii* (não hospedeira)

Em um olfatômetro em “Y” com dupla escolha (controle/tratamento) foram colocados oitos indivíduos de *A. reticulatum*. O experimento controle envolvia apenas a passagem de ar, enquanto que no tratamento foram utilizados ar e o óleo essencial de *P. aduncum* (1 µL). Após dez minutos de experimento, foi observado que seis dos oitos indivíduos foram atraídos até o tratamento, enquanto, dois indivíduos permaneceram na bifurcação, entre o controle e tratamento (Figura 4.15).

Figura 4.15. Olfatômetro em “Y” com dupla escolha, tratamento + controle, contendo 8 espécimes do inseto *A. reticulatum*.

Um segundo teste foi realizado com oitos novos indivíduos de *A. reticulatum* no mesmo olfatômetro, entretanto, com dois óleos essenciais; o óleo essencial de *P. aduncum* (hospedeira, 1 μ L) e o óleo essencial de *P. regnellii* (não hospedeira, 1 μ L). Após dez minutos de experimento, os sete indivíduos foram atraídos até a fonte de estímulo que continha o óleo de *P. aduncum* e apenas um permaneceu na posição inicial. Um terceiro teste foi realizado com oito indivíduos de *A. reticulatum* frente ao composto puro do dilapiol (tratamento, 1 μ L), constituinte majoritário do óleo essencial de *P. aduncum*, e o controle contendo apenas a passagem de ar. Foi observado que seis indivíduos foram atraídos até o tratamento.

4.2.7.3 - *S. armata* frente óleo essencial dos frutos de *P. cernuum*, planta hospedeira.

Oitos indivíduos de *S. armata* foram colocados frente ao óleo essencial dos frutos de *P. cernuum* (1 μ L), tendo como controle apenas a passagem de ar. Foi observado que os oitos indivíduos foram atraídos até o óleo.

4.3 - Experimental

4.3.1 - Extração das seivas em *P. aduncum* e *P. solmsianum*

As seivas foram coletadas utilizando-se um sistema de vácuo (Figura 27). Na medida em que as seivas eram coletadas os vasos condutores de seivas na parte superior do caule fechavam-se interrompendo o fluxo das seivas, devido à presença de ar nesses vasos. Assim, foram feitos cortes a cada 5 cm na parte superior do caule com uma tesoura de poda a cada 1 min.

Figura 4.16. Sistema adotado para coleta de seivas.

4.3.1.1 – Procedimento para extração das seivas de *P. solmsianum*

4.3.1.2 – Procedimento para extração das seivas de *P. aduncum*

4.3.2 - Análise elementar e de micro e macronutrientes.

Para a análise elementar de C, N, e H os caules e folhas foram secos em estufa a 40° C durante 48h e, em seguida pulverizados em moinho de lâminas. Para análises de micro e macronutrientes os materiais foram enxaguados em água destilada para eliminar possíveis impurezas, pois alguns desses nutrientes estão presentes em pequenas quantidades na planta. Em seguida foram secos em estufa a 40° C durante 48h e triturados em cadinho de porcelana.

4.4 - Conclusões

O estudo das interações químicas entre espécies de insetos sugadores de seivas e Piperaceae é de grande complexidade devido ao número de variáveis a serem considerados. Tais variáveis incluem a composição de metabólitos secundários dos caules e das folhas, composição de C, H e N e de macro e micronutrientes, composição de seivas, o padrão de lignificação da planta, análises dos tecidos dos insetos e seus excrementos. Assim, baseados nos dados obtidos das análises de cada variável acima citada foi possível especificar quais espécies de Piperaceae contribuem para o sucesso da adaptação dos insetos sugadores de seivas.

Considerando-se o fato que a *Piper aduncum* é a espécie preferida pelos insetos sugadores de seivas, a mesma foi tomada como padrão de espécies de Piperaceae que possuem fatores químicos que contribuem positivamente para o sucesso dos sugadores seivas. Os fatores químicos que possuem funções ecológicas importantes e positivas para os insetos são:

1. O padrão de lignificação com predominância de resíduo siringila em relação ao resíduo guaiacila;
2. A ocorrência de ácidos benzóicos prenilados nas folhas e caules;
3. Uma quantidade acentuada de nutrientes nos caules principalmente de micro nutrientes em relação aos macronutrientes analisados;
4. Baixo teor de metabólitos secundários nas seivas.

Capítulo 5

Identificações e determinações estruturais

5.1 – Introdução

A caracterização estrutural de produtos naturais é uma etapa que deve ser realizada de forma criteriosa e passar pela determinação das configurações absolutas. Se, por um lado o avanço das técnicas espectroscópicas tem permitido a determinações estruturais de forma bastante rápida, a disponibilidade de muitos modelos confiáveis e de técnicas quirópticas ou de difratometria de raios-X, tem possibilitado descrever de forma completa as estruturas de compostos aleloquímicos. Como consequência do conhecimento das interações químicas, tem sido possível interferir nas mesmas através da obtenção dos produtos envolvidos através de sínteses enantiosseletivas. Assim, a determinação estrutural das substâncias é uma etapa de crucial importância, pois uma atribuição correta pode resultar em sucesso de uma possível aplicação, como no caso do controle de populações utilizando-se algum tipo de feromônio.

As quarenta e nove substâncias isoladas ou identificadas foram caracterizadas baseadas nas interpretações de dados espectrométricos, especialmente de RMN de ^1H e de ^{13}C e de massas. A identificação das substâncias, quando baseadas em produtos naturais conhecidos, envolve a citação da referida literatura. No caso de novos produtos naturais, procurou-se obter o maior número possível de dados e uma atribuição mais criteriosa.

As lignanas tetraidrofurânicas constituem-se num tópico, na qual as configurações relativas e absolutas foram determinadas com base na interpretação dos dados de dicroísmo circular.

As amidas **A1-A6** foram identificadas com base na comparação dos seus espectros de massas com aqueles obtidos das amidas isoladas das folhas de *P. tuberculatum* (Silva *et al.*, 2002; Navickiene *et al.*, 2000).

Amidas A1/A2:

A1

A2

Figura 5.1. Espectro de massas de **A1/A2** ($C_{17}H_{19}O_5N$, $M = 317$ Da, IE).

Amida A3:

Figura 5.2. Espectro de massas de **A3** ($C_{17}H_{21}O_5N$, $M = 319$ Da, IE).

Figura 5.3. Representações dos mecanismos das principais fragmentações no espectro de massas de **A3**.

Amida A4:

Figura 5.4. Espectro de massas de **A4** ($C_{18}H_{25}O_5N$, $M = 319$ Da, IE).

Amida A5:

Figura 5.5. Espectro de massas de **A5** ($C_{16}H_{21}O_3N$, $M = 275$ Da, IE)

Amida A6:

Figura 5.6. Espectro de massas de **A6** (C₁₆H₁₉O₃N, M = 273 Da, IE).

Cromenos

Cromeno C1

A substância **C1**, um sólido cristalino, apresentou características físicas e espectrais similares à substância **P1**. O espectro de RMN de ^1H (Figura 5.7) da substância **C1** indicou a presença de um éster metílico e um anel aromático 1,2,4-substituído. A presença de um singlete referente ao grupo metileno, bem como a equivalência magnética de duas metilas alifáticas, sugeriu a estrutura de **C1** como sendo o 2',3'-dimetil-6-carboxicromeno-4-ona, previamente isolado de *P. taboganum* (Roussis *et al.*, 1990).

Apesar de **P1** ser, a princípio, um produto natural, o mesmo poderia ter sido formado a partir de **C1** por uma reação do tipo Michael.

Tabela 5.1. Dados dos espectros de RMN de ^1H da substância **C1** em 500 MHz, CDCl_3 .

Posição	$\delta^1\text{H}$ (J ou Hz)
3	2,76 (2H, s)	
5	8,55 (1H, d, 2,22)	
7	8,14 (1H, dd, 2,22 e 8,7 Hz)	
8	6,97 (1H, d, 8,7 Hz)	
2'	1,48 (6H, s)	
3'	1,48 (6H, s)	
OCH_3	3,90 (3H, s),

Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H da substância **C1** (300 MHz, CDCl_3 , TMS).

Cromeno C2:

A substância **C2** foi isolada das folhas de *P. gaudichaudianum* como um sólido branco amorfo. A fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_3$ foi deduzida por análises do espectro de massas (IE) (Figura 5.8) e análise elementar. O espectro no infravermelho mostrou bandas de absorções em 1681 e 1601 cm^{-1} assinaladas para uma carbonila conjugada e ao anel aromático, respectivamente (Figura 5.9). O espectro de RMN de 1H (Figura 5.10) indicou a presença de dois dubletos em δ 5,58 (1H, $J = 10,0$ Hz) e 6,38 em δ (1H, $J = 10,0$ Hz) quatro singletos em δ 1,41 (3H, s), 1,67 (3H, s), 1,56(3H, s) e 1,73 (3H, s), que foram associados com uma unidade de isopreno ligado a um cromeno. Além disso, dois dubletos em δ 7,59 (1H, $J = 2,1$ Hz) e 7,75 (1H, $J = 2,1$ Hz), assinalados para os hidrogênios meta aromáticos, indicaram um derivado do ácido benzóico 3,4,5-trissubstituído, que foi corroborado pela interpretação dos dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.11). Um sinal em δ 172,1 foi assinalado ao carbono carboxílico e o cromeno foi confirmado pela presença dos sinais em δ 79,9, 129,5 e 121,9 referentes aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente. O espectro de DEPT 135 ° (Figura 5.12) confirmou essas prévias identificações e mostrou a presença de três metilenos em δ 41,9 (C-1'), 22,7 (C-2') e 28,2 (C-1''), que foram associados com os respectivos prótons em δ 1,78 (H-1'), 2,25 (H-2') e 3,28 (H-1'') por meio do espectro de HMQC (Figura 5.14).

As posições de ligações das duas unidades de isoprenos ao cromeno e ao anel aromático foram determinadas por experimentos de HMBC (Figura 5.17) e NOESY (Figura 5.16 A – D). O espectro de HMBC mostrou as correlações (Figura 5.17) entre os sinais em δ 128,9 (C-8) e 5,28 (H-2''), entre δ 131,8 (C-7) e 3,28 (H-1''), entre δ 41,9 (C-1') e 1,41 (H-9), entre 123,9 (C-3') e 1,78 (H-1').

Os resultados dos experimentos de NOE confirmaram a presença de duas cadeias alifáticas mono e di-preniladas. Ao irradiar o hidrogênio H2'' (δ 5,28) foi observado efeito NOE em δ 7,75, 1,73 e 3,21 relativos aos hidrogênios H-7, H-4''/H-5'' e H-1'', respectivamente, indicando uma prenila ligada ao anel aromático (Figura 5.18). A di-prenila associada ao cromeno foi confirmada pela irradiação do H-3 (δ 5,58) e observando-se um efeito NOE em δ 6,38 e 1,41 referentes aos hidrogênios H-4 e H-9, respectivamente. A substância **C2** foi determinada como sendo o ácido gaudichaudiânico, um novo produto natural (Lago *et al.*, 2004).

Tabela 5.2. Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **C2** a 300 e 75 MHz respectivamente, CDCl_3 .

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$, (<i>J</i> em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
2		79,9
3	5,58 (1H, d, 10,0)	129,5
4	6,38 (1H, d, 10,0)	121,9
4a		120,6
5	7,59 (1H, d, 2,1)	126,7
6		120,8
7	7,75 (1H, d, 2,1)	131,8
8		128,9
8 ^a		155,8
9	1,41 (3H, s)	26,9
1'	1,78 (2H, m)	41,9
2'	2,25 (2H, m)	22,7
3'	5,09 (1H, m)	123,9
4'		131,8
5'	1,67 (3H, s)	25,6
6'	1,56 (3H, s)	17,6
1''	3,28 (2H, d, 7,3)	28,2
2''	5,28 (1H, m)	121,9
3''		132,6
4''	1,73 (3H, s)	17,3
5''	1,73 (3H, s)	25,8
CO_2H		172,0

Figura 5.8. Espectro de massas da substância **C2** (EI, 4,5 70 eV).

Figura 5.9. Espectro no IV da substância **C2** (KBr).

Figura 5.10. Espectro de RMN de ^1H da substância **C2** (300 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **C2** (75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.12. Espectro de RMN de DEPT da substância **C2** (75 MHz, CDCl₃, TMS).

Figura 5.14. Espectro de HMQC, 300 MHz, da substância **C2** abaixo e duas ampliações acima.

Figura 5.15. Espectro de HMBC, 300 MHz, da substância **C2**.

Figura 5.16. Ampliações do espectro de NOE, 300 MHz, da substância **C2** mostrando os efeitos da radiação de H2'' → H-7, H-4'', H-5'', H-1'' (**A**); H-3 → H-4, H-9 (**B**); H-3' → H-6', H-2' (**C**); H-4 → H-5 (**D**).

Figura 5.17. Correlações chaves de HMBC $^3J_{C-H}$ para a substância **C2**.

Figura 5.18. Interação espacial entre os hidrogênios observada no experimento de NOE para a substância **C2** (H-2'' $\rightarrow$ H-7, H-4'', H-5'', H-1'; H-3 $\rightarrow$ H-4, H-9; H-3' $\rightarrow$ H-6, H-2'; H-4 $\rightarrow$ H-5).

Determinação configuração absoluta do ácido gaudichaudiânico

A estrutura do ácido gaudichaudiânico, substância majoritária das folhas de *P. gaudichaudianum* foi determinada. No entanto, sem a determinação da configuração do centro estereogênico C-2.

Ácido gaudichaudiânico

A configuração do C-2 foi determinada através do valor da rotação óptica e da curva de dicroísmo circular (DC) do ácido comparado com a substância sargatriol, isolada da alga *Sargassum tortile* (Kikuchi *et al.*, 1983).

Sargatriol

A rotação óptica do ácido gaudichaudiânico, $[\alpha]^{25}_D +21$ (c 0.1, CHCl_3), foi similar ao observada para sargatriol $[\alpha]^{25}_D +16$ (c 0.1, CHCl_3), mas o sargatriol não seria a melhor referência por possuir dois carbonos quirais adicionais (C-5' e C-6') em sua cadeia lateral e por isso não é apropriado para uma comparação direta. Entretanto, a curva DC obtida para o ácido gaudichaudiânico foi completamente oposta à descrita para o sargatriol incluindo o efeito Cotton positivo em 260-280 nm (cromóforo estireno). Assim, apesar da diferença no padrão de substituição no anel aromático para o ácido gaudichaudiânico, foi sugerida a configuração *S* ao C-2.

Figura 5.19. Curva de dicroísmo circular do sargatriol CHCl_3 ($2,97 \times 10^{-4}$ mol/L).

Figura 5.20. Curva de dicroísmo circular do ácido gaudichaudiânico em CHCl_3 (2×10^{-3} mol/L).

(S)-Ácido gaudichaudiânico

Cromeno C3

A substância **C3** foi identificada com base nas interpretações dos dados das análises de CG/EM (IE) e CLAE/EM (ESI).

O espectro por IE/EM (70 eV) de **C3** mostrou um íon molecular $[M^+]$ em m/z 354 (3), 14 Da a mais do que o íon molecular da substância **C2**, com fragmentos em m/z 281 (11), 271 (100), 207 (39), e 69 (12) (Figura 5.21). Os íons fragmentários observados nos espectros de **C3** e **C2** foram idênticos, sugerindo uma similaridade aparente entre as estruturas.

Figura 5.21. Espectro de massas da substância **C3** ($C_{22}H_{28}O_3$, 354 Da; EI 70 eV).

Figura 5.22. Principais íons fragmentários observados nos espectros de massas das substâncias **C3** e **C2**.

Considerando a diferença de 14 Da entre as substâncias **C3** e **C2**, e que a metilação de **C2** formaria a substância **C3**, 1 mg de **C2** foi metilada com CH_2N_2 em temperatura de 26 °C por 1 h para produzir 1,1 mg da substância **C3**. Após um período de 30 min o produto da reação foi analisado por LC/EM. O cromatograma do produto reacional indicou a presença de um pico intenso diferente do tempo t_r de **C2** e idêntico a um dos picos do cromatograma do extrato das folhas de *P. gaudichaudianum* de onde foi isolada a substância **C2**. O espectro de massas desse pico obtido por LC/EM mostrou um íon pseudomolecular em m/z 355 Da $[M^+ + 1]$, confirmando a substância **C3** como o éster metílico do ácido **C2**.

Figura 5.23. Espectro de massas da substância **C3** (EIS, 4,5 KVolt).

Substância D1:

Esta substância também foi identificada com base na interpretação dos dados de seu espectro de massas obtido através da análise em CG/EM do extrato fecal do besouro *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. tuberculatum*.

Figura 5.24. Espectro de massas da substância **D1** ($C_{13}H_{12}O_5$, $M = 254$ Da, IE).

Substância D2:

O ácido 3,4,5-trimetóxiбенzóico (**D2**) foi identificado com base na interpretação dados de RMN de ^1H que mostraram apenas um singlete em δ 7,38 atribuído aos dois hidrogênios do anel aromático e pela presença de três metoxilas; duas em δ 3,90 e uma em 3,89. O espectro de massas indicou um íon molecular de 212 Da que corresponde à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

Tabela 5.3. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância **D2** em 200 MHz, CDCl_3

Posição	δ ^1H , (J em Hz)
2	7,36 (1H, s)	
6	7,36 (1H, s)	
3,6 OCH_3	3,88 (3H, s)	
4 OCH_3	3,90 (6H, s)

Figura 5.25. Espectro de massas da substância **D2** ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$, $M = 212$ Da, IE).

Figura 5.26. Espectro de RMN de ^1H da substância **D2** (200 MHz, CDCl_3 , TMS).

Substância F1: *E*-Isolemicina

A substância, a *E*-isolemicina, tem sido isolada das folhas de *P. solmsianum* (Martins et al., 2000). A identificação de **F1** foi baseada com a comparação de seu espectro de massas obtido por análises de CG/EM e LC/EM dos extratos fecal e das folhas de *P. solmsianum* com o espectro de massas da substância original (Figura 5.27).

Figura 5.27. Espectro de massas da substância **F1** isolada das folhas de *P. solmsianum* ($C_{12}H_{16}O_3$, $M = 208$ Da, IE).

Fenilpropanóide F2:

O espectro de RMN de 1H da substância **F2** mostrou (Figura 5.28) um singlete em δ 6,61 referente a um par de hidrogênios aromáticos, um duplo dubleto em δ 4,31 ($J = 5,7$ e $1,3$ Hz) referente aos hidrogênios metilênicos, um duplo tripleto em δ 6,29 ($J = 15,8$ e $5,7$ Hz) e um dubleto em δ 6,55 ($J = 15,8$ Hz) referentes aos dois hidrogênios olefínicos (H-8 e H-7), respectivamente, em uma configuração *trans*. Apresentou ainda três grupos metoxílicos; um em δ 3,83 e dois em 3,87. Assim, através do conjunto dos dados, a substância **26** foi identificada como sendo o álcool 3,4,5-trimetoxicinâmico, previamente isolado das cascas *Loranthus globus* Roxb. (Sadik et al., 2003).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 29) confirmou ser a substância **F2** o álcool 3,4,5-trimetoxicinâmico. O sinal em δ 63,00 referente ao C-9 no espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído ao carbono $\underline{C}H_2$ do álcool primário. Os sinais em δ 131,11 e 128,06 são referentes ao C-7 e C-8, respectivamente, e os carbonos aromáticos em δ 132,44 (C-1),

103,70 (C-2), 153,35 (C-3 e C-5), 138,05 (C-4) e 103,70 (C-6), e os sinais em δ 56,09 e 60,88 foram atribuídos aos grupos metoxílicos.

Tabela 5.4. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **F2** em 200 MHz e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (<i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C
1		132,44	
2	6,63 (2H, d, 9,2)	103,70	
3		153,35	
4		138,05	
5		153,35	
6	6,63 (2H, d, 9,2)	103,70	
7	6,55 (1H, d, 15,8)	131,11	
8	6,29 (1H, dd, 15,8 e 5,7)	128,06	
9	4,32 (2H, dd, 5,7 e 1,3)	63,00	
3,5 OCH_3	3,87 (6H, s)	60,88	
4 OCH_3	3,82 (3H, s)	56,09

Figura 5.28. Espectro de RMN de ¹H da substância **F2** (200 MHz, CDCl₃, TMS).

Figura 5.29. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **F2** (50 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.30. Espectro de massas da substância **F2** ($C_{12}H_{16}O_4$, $M = 224$ Da, IE).

Fenilpropanóide F3:

A estrutura da substância referente ao pico **F3** foi determinada baseada na semelhança de seus dados espectroscópicos com o da substância **F2**. Seu espectro RMN de 1H mostrou um par de aromático em δ 6,66 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-6) e em δ 6,51 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2), dois hidrogênios metilênicos em δ 4,32 (2H, dd, $J = 5,7$ Hz e 1,3, H-9), dois hidrogênios olefínicos em δ 6,47 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-7) e em δ 6,27 (1H, dt, $J = 15,8$ e 5,7 Hz, H-8). Adicionalmente, a presença de dois grupos metoxílicos em δ 3,89 e 3,87, e um hidroxila fenólica em δ 6,46 que estão de acordo com a assimetria do anel aromático. Assim, a estrutura da substância **F3** foi determinada como sendo o álcool 3-hidroxi-4,5-metoxicinâmico. Esta estrutura foi confirmada comparando-se seus dados espectroscópicos de RMN de 1H e de ^{13}C com aqueles descritos para a substância isolada das raízes de *Ferula sinaica* (Ahmed, 1991).

Tabela 5.5. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **F3** em 200 MHz e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$, (<i>J</i> em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
1		132,29	
2	6,66 (2H, d, 2,2)	101,93	
3		151,92	
4		148,70	
5		153,96	
6	6,55 (2H, d, 2,2)	105,63	
7	6,21 (1H, d, 15,8)	30,30	
8	6,27 (1H, dd, 15,8 e 5,7)	127,55	
9	4,32 (2H, dd, 5,7 e 1,3)	63,00	
4, OCH_3	3,87 (6H, s)	60,37	
5, OCH_3	3,89 (3H, s)	55,21	
OH	6,46 (1H, s)

Figura 5.31. Espectro de RMN de ¹H da substância **F3** (200 MHz, CDCl₃, TMS).

Figura 5.32. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **F3** (50 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.33. Principais correlações observadas no experimento de HMBC da substância **F3**.

Figura 5.34. Espectro de HMBC $^3J_{C-H}$ da substância **F3**.

Figura 5.35. Espectro de massas da substância **F3** ($C_{11}H_{12}O_4$, $M = 210$ Da, IE).

Fenilpropanóide F4:

Os dados de RMN de 1H referente à substância **F4** mostraram, além do singlete em δ 6,79 atribuído aos dois hidrogênios do anel aromático, dois dubletos em δ 7,71 e 6,37 ($J = 15,8$) referente aos hidrogênios olefínicos e a presença de três metoxilas em δ 3,90 (6H) e outra em δ 3,83 (3H). O espectro de massas confirmou a estrutura indicando um íon molecular de 238 Da que corresponde à fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_5$.

Tabela 5.6. Dados do espectro de RMN de 1H da substância **F4** em 200 MHz, $CDCl_3$.

C	δ 1H , (J em Hz)	
2	6,79 (1H, s)	
6	6,79 (1H, s)	
7	6,39 (1H, d, 15,8)	
8	7,71 (1H, d, 15,8)	
3,6 OCH ₃	3,88 (3H, s)	
4 OCH ₃	3,90 (6H, s)

Figura 5.36. Espectro de massas da substância **F4** ($C_{12}H_{14}O_5$, $M = 238$ Da, IE).

Figura 5.37. Espectro de RMN de ¹H da substância **F4** (200 MHz, CDCl₃, TMS).

Fenilpropanóide F5:

O ácido 3,4,5-trimetoxidiidrocinâmico (**F5**) foi identificado com base na interpretação dos dados de seu espectro de massas obtido através da análise em CG/EM do extrato fecal do besouro *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. tuberculatum*.

Figura 5.38. Espectro de massas da substância **F5** ($C_{12}H_{14}O_5$, $M = 240$ Da, IE).

Foi observado que o íon correspondente ao pico base, $m/z = 181$ Da, está associado a uma fragmentação clássica na posição benzílica.

$m/z = 181$ Da

Fenilpropanóide F7:

A substância **F7**, o dilapiol, foi identificada com base na interpretação de seu espectro de massas e por análise em CLAE, comparando com seu padrão (Figuras 5.39 – 5.40) (Orjala *et al.*, 1993).

Figura 5.39. Espectro de massas da substância **F7** ($C_{12}H_{14}O_4$, $M = 222$ Da, IE).

Figura 5.40. Cromatograma do dilapiol (CLAE).

Lignanas

Lignana L1: (-)-Grandisina

A (-)-grandisina constituinte majoritário das folhas de *P. solmsianum* foi primeiramente isolada de *Litsea grandis* (Holloway e Feodor, 1974). A sua identificação foi baseada na comparação de seus espectros obtidos a partir de análises de extratos brutos por CLAE/EM e GC/EM com o espectro de massas do padrão isolado das folhas de *P. solmsianum* (Martins *et al.*, 2000).

Figura 5.41. Espectro de massas da substância **L1** isolada das folhas de *P. solmsianum* ($C_{24}H_{32}O_7$, $M = 432$ Da, IE).

Figura 5.42. Principais fragmentações da (-)-grandisina (Holloway e Feodor, 1974).

Lignana L2:

A substância **L2** foi determinada como sendo *O*-desmetilgrandisina, previamente isolada dos frutos de *Licaria aurea* (Barbosa-Filho *et al.*, 1989). Os espectros de massas e de RMN de ^1H de **L2** (Figuras 5.44 - 5.45) foram similares a da substância **L1** (Sarkanen e Wallis, 1973; Martins *et al.*, 2000). Seu espectro de RMN de ^1H mostrou sinais assinaláveis para cinco metoxilas, hidrogênios aromáticos em δ 6,63 (2H, s) e 6,61 (2H, s) e indicou a presença de dois anéis aromáticos 3',4',5'-trimetoxifenílico e 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenílico (Tabela 5.9).

Tabela 5.7. Dados do espectro de RMN ^1H da substância **L2** em 200 MHz, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (<i>J</i> em Hz)
2/6	6,63 (2H, s)	
2'/6'	6,61 (2H, s)	
7	4,64 (1H, d, 8,8)	
7'	4,64 (1H, d, 8,8)	
8/8'	2,49 (2H, m)	
9	0,70 (3H, d, 7,0)	
9'	0,68 (3H, d, 7,0)	
OCH_3 3/5	3,79 (3H, s)	
OCH_3 3'/5'	3,88 (3H, s)	
OCH_3 4'	3,72 (3H, s)

Figura 5.43. Espectro de RMN de ^1H da substância **L2** (200 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.44. Espectro de massas da substância **L2** ($C_{23}H_{30}O_7$, $M = 418$ Da, IE).

Figura 5.45. Principais fragmentações da O-desmetilgrandisina.

Lignana L3:

A substância **L3** foi caracterizada com sendo a lignana di-O-desmetilgrandisina baseado nas interpretações dos dados de seus espectros de RMN de ^1H e de massas (Figuras 5.46 - 5.47), sendo os espectros bastantes similares aos espectros das substâncias **L1** e **L2**. Assim, como a substância **L2**, a substância **L3** foi também previamente isolada dos frutos *Licaria aurea* (Barbosa-Filho *et al.*, 1989).

Tabela 5.8. Dados do espectro de RMN ^1H da substância **L3** em 200 MHz, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (J em Hz)
2/6 e 2'/6'	6,63 (4H, s)	
7/7'	4,64 (2H, d, 9,2)	
8/8'	1,88 (2H, m)	
9/9'	1,1 (6H, d, 7,0)	
OCH_3 3/5	3,91 (6H, s)	
OCH_3 3'/5'	3,91 (6H, s)	
OH	5,48 (2H, s)

Figura 5.46. Espectro de RMN de ^1H da substância **L3** (200 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.47: Espectro de massas da substância **L3** ($C_{22}H_{28}O_7$, $M = 404$ Da, IE).

Figura 5.48. Principais fragmentações da substância **L3**.

Lignana L4:

A lignana **L4** foi isolada como um pó pálido branco, com $[\alpha]_D^{21} - 62,2^\circ$ e $[M]^+$ em m/z 432 Da no EM-IE (Figura 5.49) que corresponde a uma fórmula molecular, $C_{24}H_{32}O_7$, a mesma da lignana **L8**. A lignana **L8** é um novo produto natural isolado das folhas de uma espécie alopátrica de *P. solmsianum*.

Figura 5.49. Espectro de massas da substância **L4** ($C_{24}H_{32}O_7$, $M = 432$ Da, IE).

Assim, a lignana **L4** foi definida como um epímero da lignana **L8**. Portanto, a sua estrutura foi comparada com os dados espectrométricos com a lignana **L8**. Os dados do espectro de RMN de 1H mostraram os sinais semelhantes observados no espectro da lignana **L8**. Entretanto, foram observados três sinais adicionais devido à assimetria do anel tetraidrofurânico (Figura 5.50).

Tabela 5.9. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **L4** em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3 .

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
1		137,75	
1'		136,84	
2,6,2',6'	6,66 (4H, s)	103,47	
3/5		153,24	
3'/5'		153,01	
4		137,85	
4'		136,17	
7	5,13 (1H, d, 6,7)	87,39	
7'	4,53 (1H, d, 6,7)	82,88	
8	2,71 (1H, m)	44,24	
8'	2,34 (1H, m)	41,51	
9	0,85 (3H, d, 6,7)	13,05	
9'	0,64 (3H, d, 6,7)	11,64	
OCH_3 3/5	3,87 (3H, s)	56,02	
OCH_3 3'/5'	3,87 (3H, s)	56,02	
OCH_3 4/4'	3,95 (3H, s)	60,86

Figura 5.50. Espectro de RMN de ^1H da lignana **L4**, 200 MHz, CDCl_3 .

Figura 5.51. Espectro de RMN de ^{13}C da lignana **L4**, 50 MHz, CDCl₃.

Lignana L5:

A substância **L5** foi isolada como um pó amarelo pálido do extrato metanólico das folhas, que foi submetido às etapas cromatográficas incluindo TLC preparativa.

A estrutura da lignana **L5**, uma nova lignana, foi determinada baseada nas semelhanças dos dados espectrométricos com os da lignana **L8**. A fórmula molecular foi indicada como $C_{23}H_{28}O_7$ de acordo com o íon molecular observado em m/z 416 Da em seu espectro de massas (IE), associado com os dados dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C . $[\alpha]_D^{21} + 80,7^\circ$.

Figura 5.52. Espectro de massas da lignana **L5** ($C_{23}H_{28}O_7$, $M = 416$ Da, IE).

O pico base observado no espectro de massas da lignana **L8** corresponde ao íon m/z 236 μ . Enquanto, para a substância **L5** foi observado o íon m/z 220 Da e apenas uma intensidade relativa de 43 % para o íon m/z 236 Da (Figura 5.53).

Figura 5.53. Principais fragmentações das lignanas **L8** e **L5** baseado no padrão de fragmentação da (-)-grandisina (**L1**) (Holloway e Sheinmann, 1973).

Esta diferença de 16 μ entre os picos bases da lignana **L8** e da lignana **L5**, associado com um intenso singleto em δ 5,91 no espectro de RMN de 1H , indica a presença de um grupo metilenodioxifenila para a lignana **L5**. A análise dos dados dos

espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicou a estrutura de uma lignana tetraidrofurânica toda *cis* similar a **L8**. Os hidrogênios aromáticos do anel 3,4,5-trimetoxifenila em δ 6,64, s, 2H foi similar ao da lignana **L8**. Os hidrogênios do segundo anel aparecem como dois singletos largos em δ 6,62 e 6,61 que correspondem aos dois hidrogênios aromáticos do anel 3,4-metilenodioxi-3-metoxifenila. A estrutura da substância **L5** foi determinada como sendo a lignana (7*R*,8*S*,7'*S*,8*R'*)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxifenil-7,7'-epoxilignana.

Tabela 5.10. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da lignana **L5** em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3 .

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
1		135,3	
2	6,64 (1H, s)	103,5	
3		153,0	
4		138,5	
5		153,0	
6	6,64 (1H, s)	103,5	
7	5,09 (1H, d, 6.6)	82,8	
8	2,69 (1H, m)	41,5	
9	0,63 (3H, d, 6.6)	11,6	
1`		136,1	
2`	6,61 (1H, s)	105,8	
3`		143,4	
4`		139,8	
5`		148,8	
6`	6,62 (1H, s)	100,7	
7`	5,09 (1H, d, 6.6)	82,9	
8`	2,69 (1H, m)	41,6	
9`	0,61 (3H, d, 6.6)	11,7	
O_2CH_2	5,97	101,3	
$\text{OCH}_3/3$	3,88 (H, s)	56,1	
$\text{OCH}_3/4$	3,91 (H, s)	60,9	
$\text{OCH}_3/5$	3,88 (H, s)	56,1	
$\text{OCH}_3/3`$	-	-	
$\text{OCH}_3/4`$	-	-	
$\text{OCH}_3/5`$	3,85 (H, s)	56,6

Figura 5.54. Espectro de RMN de ¹H da lignana **L5** 200 MHz, CDCl₃.

Figura 5.55. Espectro de RMN de ^{13}C da lignana **L5**, 50 MHz, CDCl_3 .

Lignana L6:

A estrutura da substância **L6** foi caracterizada com base na interpretação dos dados de seu espectro de massas, sendo que o mesmo é produto da biotransformação de **L4**.

Figura 5.56. Espectro de massas da substância **L6** ($C_{23}H_{30}O_7$, $M = 418$ Da, IE).

Lignana L7:

A estrutura da substância **L5** foi caracterizada com base na interpretação dos dados de seu espectro de massas, sendo que o mesmo é produto da biotransformação de **L7**.

Figura 5.57. Espectro de massas da substância **L7** ($C_{22}H_{26}O_7$, $M = 402$ Da, IE).

Lignana L8:

A substância **L8**, um pó pálido branco, com $[\alpha]_D^{21} 0^\circ$ e $[M]^+$ em m/z 432 Da no EM-IE (Figura 5.58) que corresponde a uma fórmula molecular, $C_{24}H_{32}O_7$.

Figura 5.58. Espectro de massas da substância **L8** ($C_{24}H_{32}O_7$, $M = 432$ Da, IE).

O espectro de IV mostrou uma intensa banda de absorção em 1126 cm^{-1} sugerindo a presença do grupo funcional éter (Figura 5.59).

Figura 5.59. Espectro no IV da lignana **L8**.

As análises dos dados RMN de ^1H e de ^{13}C indicou que a lignana **L8** deve ter uma estrutura molecular simétrica (Figura 5.60 e 5.61).

Os sinais correspondentes a um anel tetraidrofurano foram observados no espectro de RMN ^1H como um dubleto em δ 0,63 (6H, $J = 6,7$ Hz, H-9/H-9'), um multipletto em δ 2,69 (2H, H-8/H-8'), um dubleto em δ 5,13 (2H, $J = 6,7$ Hz, H-7/H-7'). Os hidrogênios

aromáticos aparecem como um singlete em δ 6,74 (4H, H-2/H-2', H-6/H-6'). Os dois intensos sinais são observados em δ 3,87 (4 x OMe/3,3', 5, 5') e δ 3,89 (2 x OMe/4,4'), correspondentes a seis grupos metoxílicos.

Baseado no padrão de substituição comum para lignanas e os dados de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 5.11), a substância **L8** foi determinada como sendo uma lignana tetraidrofurânica com dois grupos 3,4,5-trimetoxifenilas ligado ao anel tetraidrofurano (Fonseca *et al.*, 1979; Agrawal e Thakur, 1985; Martins *et al.*, 2000).

Tabela 5.11. Dados do espectro de RMN ^1H e de ^{13}C da substância **L8** em 200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (J em Hz)	δ ^{13}C	
1	6,74 (1H, s)	137,00
2		103,56	
3		153,06	
4		136,02	
5		153,06	
6	6,74 (1H, s)	103,56	
7	5,13 (1H, d, 6,7)	82,93	
8	2,69 (1H, m)	41,58	
9		11,68	
1`	0,63 (3H, d, 6,7)	137,00	
2`		103,56	
3`		153,06	
4`		136,02	
5`	6,74 (1H, s)	153,06	
6`	6,74 (1H, s)	103,56	
7`	5,13 (1H, d, 6,7)	82,93	
8`	2,69 (1H, m)	41,58	
9`	0,63 (3H, d, 6,7)	11,68	
O_2CH_2	-	-	
$\text{OCH}_3/3$	3,87 (H, s)	56,1	
$\text{OCH}_3/4$	3,86 (H, s)	60,9	
$\text{OCH}_3/5$	3,87 (H, s)	56,1	
$\text{OCH}_3/3`$	3,87 (H, s)	56,1	
$\text{OCH}_3/4`$	3,86 (H, s)	60,9	
$\text{OCH}_3/5`$	3,87 (H, s)	56,1

Figura 5.60. Espectro de RMN de ^1H da lignana **L8**, 200 MHz, CDCl_3 .

Figura 5.61: Espectro de RMN de ^{13}C da lignana **L8**, 50 MHz, CDCl_3 .

Figura 5.62. Padrões de substituição de lignanas tetraidrofurânicas relatadas na literatura.

Tabela 5.12. Comparação de dados da literatura RMN de ^1H e ^{13}C (δ e J , relativo ao TMS) para lignanas tetraidrofurânicas (**A**, **B**, **C**, **23**, **E**, **F**).

Posição/ Lignan	7 e 7'		8 e 8'		9 e 9'		$[\alpha]_D^{21}$
	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C (δ)	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C (δ)	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C (δ)	
A	5,06 (6,6)	84,3	2,60	42,7	0,56 (7,0)	12,6	0
B	4,38 (6,5)	88,3	2,20	45,7	0,99, m	13,1	0
C	4,59 (9,1)	88,7	1,74	51,9	1,01 (5,8)	13,9	-
23	4,67 (8,8)	88,4	1,75	50,9	1,08 (8,8)	13,9	+51,1 ^o
E	4,52 (7,2)	88,3	1,67	50,8	0,96 (7,2)	13,8	-4,5 ^o
		88,4		51,1		13,9	
F	4,50 (9,0)	88,4	1,68	51,0	0,96 (6,3)	13,9	+10,1 ^o
G	4,38 (6,6)	87,4	1,78	46,0	1,06 (6,6)	15,1	+12,1 ^o
	5,08 (6,6)	83,2	2,23	47,9	0,69 (6,9)	14,8	
H	-	-	-	-	-	-	-

A estrutura para a lignana tetraidrofurânica **L8**, pode assumir oito possíveis formas diastereoisoméricas. No entanto, apenas quatro devem ser permitidas de acordo com a simetria molecular observada através dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (**A**, **B**, **C** e

L1). Entretanto, devido à inatividade óptica observada para lignana **L8** esta foi definida como um isômero *meso*. Portanto, a lignana **L8** pode ter uma configuração idêntica à lignana **A** ou **B**.

As possíveis configurações **A** e **B** para lignana **L8** podem ser distinguidas com base na orientação dos substituintes metílicos e arílicos do anel tetraidrofurano. Os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios oxibenzílicos (H-7/H-7') e metílicos (H-9/H-9'), e dos carbonos oxibenzílicos (C-7/C-7') são importantes para determinar a relação *cis/trans* entre os substituintes metílicos e arílicos (Tabela 5.17) (Shimomura *et al.*, 1987; Konno *et al.*, 1990; Herath e Priyadarshani, 1996; Holloway e Scheinmann, 1973; Prasad *et al.*, 1994; Úrzua *et al.*, 1987).

Os hidrogênios metílicos (H-9/H-9') e os oxibenzílicos (H-7/H-7') de **L8** foram observados em δ 0,63 e 5,13, respectivamente. A constante de acoplamento de 6,7 Hz, indica uma relação toda *cis* entre os substituintes metílicos e arílicos, em função de um ângulo diédrico para os hidrogênios H-7/H-8 (H-7'/H-8') de aproximadamente de 30° (Fonseca *et al.*, 1979).

No espectro de RMN de ^{13}C o deslocamento químico observado para os grupos metílicos em δ 11,6 de **L8** foi diferenciado do isômero todo *trans*, como no caso da (-)-grandisina (**L1**), que absorve em δ 13,9. Essa diferença dos valores para esses grupos entre os isômeros todo *cis* e *trans* é devida a anisotropia do anel 3,4,5-trimetoxifenila nos grupos metílicos quando em *pseudo-axial* (Figura 5.59).

Figura 5.63. “Efeito de corrente do anel” (anisotropia diamagnética) nos grupos metílicos de lignanas tetraidrofurânicas. O anel à esquerda da figura, *cis* em relação a um grupo metílico que exerce efeito de blindagem. Enquanto o anel à direita da figura, *trans* em relação a um grupo metílico causa efeito de desblindagem sobre o metílico.

Os sinais referentes aos carbonos C-7/C-7' da lignana **L8** em δ 82,9 e C-8/C-8' em δ 41,6 constituíram-se numa evidência adicional para uma configuração toda *cis* entre os grupos metílicos e arílicos. Todos os dados de RMN ^1H e de ^{13}C estão compatíveis com o fato da lignana **L8** ser um isômero todo *cis* da (-)-grandisina isolada de *P. solmsianum* (Martins *et al.*, 2000). Assim, sua estrutura foi definida como (7*R*,8*S*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametoxi-7,7'-epoxilignana.

Determinação da configuração absoluta das lignanas L8, L5 e L4.

As configurações absolutas das lignanas **L5**, **L4** e **L8** foram determinadas comparando-se as curvas de dicroísmo circular (DC)* com o da (-)-grandisina (Figura 5.60), pois a configuração absoluta da (-)-lignana foi previamente determinada por análises de R-X (Holloway e Sheinmann, 1974).

A lignana **L8** por possuir eixo e plano de simetria é opticamente inativa e não apresenta nenhum sinal no espectro de DC. De acordo com os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , foi proposta a configuração toda *cis*.

A configuração da lignana **L5** foi proposta para ser a mesma da lignana **L8** baseada nos dados dos espectros RMN ^1H e ^{13}C . Entretanto, a lignana **L5** é assimétrica, assim possui uma curva no espectro DC oposta a da (-)-grandisina, confirmando a configuração toda *cis*. Porém, com o efeito Cotton foi deslocado para 220 nm.

A lignana **L4**, por ser um epímero da (-)-grandisina e da lignana **L8**, pode existir em duas possíveis configurações **I** e **II** (Figura 5.65).

(-)-Grandisina (**L1**) Lignana **L8** Lignana **L5** Lignana **L4**

Figura 5.64. Espectros de DC da (-)-grandisina e das lignanas **L8**, **L4** e **L5**.

Figura 5.65. Possíveis configurações para lignana **L4**.

Considerando que os carbonos estereogênicos 7 e 7' são os que determinaram os sinais dos efeitos Cotton, por estarem mais próximos dos cromóforos fenílicos, as configurações nesses carbonos devem estar associados as sinais observados. A curva de DC da lignana **L4** é muito semelhante ao espectro da lignana **L5**, portanto, a configuração **I** foi determinada para lignana **L4**.

Neolignanas

As substâncias **N1-N4** foram caracterizadas comparando seus espectros de massas com padrões isolados das raízes de *P. regnellii* (Benevides *et al.*, 1999) e com seus respectivos tempos de retenção, obtidos por análises em CLAE. As configurações foram definidas com sendo as mesmas para os padrões, pois os espécimes em estudo foram os mesmos utilizados no estudo previamente realizado por Benevides (1999).

Neolignana N1: Conocarpano

Figura 5.66. Espectro de massas de **N1** isolada das folhas de *P. regnellii* ($C_{18}H_{18}O_2$, $M = 266$ Da, IE).

Neolignana N2: 4-hidróxi-3-metoxi-4',7-epóxi-8,3'-neolignana-7[Z],7'[E]-dieno.

Figura 5.67. Espectro de massas de **N2** isolada das folhas de *P. regnellii* ($C_{18}H_{16}O_2$, $M = 264$ Da, IE).

Neolignana N3: (7*R*,8*R*)-4-hidróxi-3-metoxi-4',7-epóxi-8,3'-neolignana-7'[*E]-eno.

Figura 5.68. Espectro de massas de **N3** isolada das folhas de *P. regnellii* (C₁₉H₂₀O₃, M = 296 Da, IE).

Neolignana N4: (7*R*,8*R*)-4-hidróxi-3,4-metilenodioxido-4',7-epóxi-8,3'-neolignana-7'[*E]-eno.

Figura 5.69. Espectro de massas de **14** isolada das folhas de *P. regnellii* (C₁₉H₁₈O₃, M = 294 Da, IE).

Neolignana N5:

A análise do espectro de massas (Figura 5.56) da substância **N5** indicou o íon molecular m/z de 254 Da que corresponde à fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$. O espectro de RMN de 1H (Figura 5.27) é similar ao espectro da neolignana **N1**, mas ao invés da unidade propenila, constatou-se substituição desse conjunto de sinais por um de hidrogênio aldeídico em δ 9,85 (s, 1H). Assim, baseado nos dados espectroscópicos de EM e RMN de 1H , a estrutura da substância **N5** foi identificada como decurrenal, previamente isolada das folhas de *Piper decurrens* (Chauret *et al.*, 1996)

Figura 5.70. Espectro de massas de **15** isolada das fezes de *N. bipes* ($C_{16}H_{14}O_3$, $M = 254$ Da, IE).

Tabela 5.13. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância **N5** a 200 MHz respectivamente, CDCl_3

Posição	δ ^1H , J em Hz
2	7,71 (1H, m)	
3	6,86 (1H, d, J = 8,3)	
5	6,86 (1H, d, J = 8,3)	
6	7,71 (1H, m)	
7	5,22 (1H, d, J = 8,3)	
8	3,54 (1H, m)	
9	1,45 (3H, d, J = 7,4)	
2'	7,72 (1H, m)	
5'	6,95 (1H, d J = 8,7)	
6'	7,72 (1H, m)	
O=C-H	9,87 (1H, s)	
OH	4,7 (1H, s)

Figura 5.71. Espectro de RMN de ¹H da substância **N5** (200 MHz, CDCl₃, TMS).

Neolignana N6: Ácido 4-hidróxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana

A substância **N6** foi caracterizada com base nas interpretações dos dados no espectro infravermelho e de massas.

Figura 5.72. Espectro de massas de **N6** isolada das fezes do besouro *N. bipes* (C₁₆H₁₂O₄, M = 268 Da, ESI-EM).

O espectro de massas por ESI indicou um íon pseudomolecular [M⁺ + 1] em 269 Da, que corresponde a uma fórmula molecular C₁₆H₁₂O₄. A análise de EM² (Figura 5.72 e 5.73) do íon 269 Da mostrou dois íons secundários em 261 Da e 256 Da, indicando a perda de 17 Da (grupo hidroxílico) e 32 Da (grupo metila + hidroxila).

Figura 5.73. Subespectro (EM^2) do íon molecular obtido do espectro de massas de **N6** ($C_{16}H_{12}O_4$, $M = 268$ Da, ESI).

Figura 5.74. Principais fragmentações atribuídas no espectro de massas de **N6**.

O espectro no infravermelho apresentou uma banda larga em 3355 cm^{-1} (vibrações de deformação axial O-H), duas bandas em 1620 cm^{-1} (vibrações de deformação axial C-O) e 1455 cm^{-1} (vibrações de deformação angular O-H), ratificando a presença de grupo hidroxílico mencionado na análise do espectro de massas. Além dessas bandas uma outra intensa foi observada em 1683 cm^{-1} característica de carbonila de ácidos aril-conjugados indicando a presença de um grupo carboxílico.

Considerando que a massa molecular da substância **N6** tem 4 Da a mais que a substância **N2**, constituinte das folhas de *P. regnellii*; que a substância **N6** foi isolada das fezes do besouro *N. bipes* com dieta constituída de folhas de *P. regnellii*; a estrutura para substância **N6** foi sugerida como o ácido 4-hidroxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana, produto da biotransformação da substância **N2** durante o processo de digestivo do besouro *N. bipes*.

Figura 5.75. Espectro no infravermelho da substância **N6**.

Neolignana N7:

Os espectros de massas da substância **N7** por IE e ISE apresentaram o íon em m/z 280, em concordância com a fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_3$, compatível com o indicado pela análise elementar. O espectro de RMN de 1H indicou a presença de um hidrogênio de aldeído, como no caso da substância **N5**. Entretanto, o sinal foi observado como um dubleto em δ 9,59 (1H, d , $J = 7,7$ Hz) devido ao acoplamento com o sinal em δ 6,55 (1H, dd , $J = 7,7$ e 15,8 Hz, H-8') e este, por conseguinte, acopla com o sinal em δ 7,37 (1H, d , $J = 15,8$ Hz, H-7'), sugerindo a presença de um grupo propenila. Os demais sinais em δ 5,12 (1H, d , $J = 8,6$ Hz, H-7), δ 3,57 (1H, m , H-8), δ 0,84 (3H, d , $J = 7,2$ Hz, H-9), δ 7,23 (d , $J = 8,5$ Hz, H-2/H-6) e em 6,81 (d , $J = 8,5$ Hz, H-3/H-5) foram associados aos anéis aromáticos e diidrobenzofurânicos, semelhantemente aos sinais observados para

conocarpano (**N1**). Assim, esta substância foi estabelecida como sendo o aldeído 4-hidroxi-8',9'-dinor-4',7-epóxi-8,3'-neolignana-7'-[*E*]-eno, um pó amarelo amorfo.

Tabela 5.14. Dados do espectro de RMN de ^1H de **N7** a 500 MHz, CDCl_3 .

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$, (<i>J</i> em Hz)
2	7,29 (2H, <i>d</i> , 8,5)	
3	6,84 (2H, <i>d</i> , 8,5)	
5	6,84 (2H, <i>d</i> , 8,5)	
6	7,29 (2H, <i>d</i> , 8,5)	
7	5,18 (1H, <i>d</i> , 8,7)	
8	3,64 (1H, <i>m</i>)	
9	1,44 (3H, <i>d</i> , 7,4)	
2'	7,38 (1H, <i>s</i>)	
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , 7,4)	
6'	7,42 (1H, <i>dd</i> , 7,4 e 1,7)	
7'	7,37 (1H, <i>d</i> , 15,8)	
8'	6,62 (1H, <i>dd</i> , 7,7 e 15,8)	
O=C-H	9,64 (1H, <i>d</i> , 7,7)

Figura 5.76. Espectro de RMN de ^1H da substância **N7** (500 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.77. Espectro de massas de **N7** isolada do extrato fecal do besouro *N. bipes* ($C_{18}H_{16}O_3$, $M = 280$ Da, IE).

Neolignana N8:

A estrutura da substância **N8** foi determinada com base na interpretação dos dados de seus espectros de massas e no infravermelho (Figuras 5.78 - 5.80). O espectro de massas obtido por IE indicou um íon molecular em 284 Da que corresponde à fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$.

Figura 5.78. Espectro de massas de **N8** isolada do extrato fecal do besouro *N. bipes* ($C_{17}H_{16}O_4$, $M = 284$ Da, IE).

Figura 5.79. Principais fragmentações observadas no espectro de massas de **N8**.

Figura 5.80. Espectro de infravermelho da substância **N8**.

O espectro no infravermelho da substância **N8** apresentou uma banda média e larga em 3414 cm^{-1} de vibrações de deformação axial de O-H devido à presença de um grupo fenol. Duas bandas intensas em 2954 e 2919 cm^{-1} referentes às vibrações de deformação

axial dos grupos metileno e metila, respectivamente. A banda em 1799 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de deformação axila C=O do grupo aldeídico.

Neolignana N9:

Esta substância foi caracterizada com sendo o ácido carboxílico (7*R*,8*R*)-3-metóxi-4-hidróxi-4',7-epóxi-neolignana produto da biotransformação da neolignana **N3** durante o processo digestivo das lagartas *H. brasiliensis* e *Q. u-lucida*.

Figura 5.81. Espectro de massas da neolignana **N9** ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$, $M = 300\text{ Da}$, IES).

Ácidos benzóicos prenilados

Ácido benzóico prenilado P1

O espectro de massas da substância **P1** mostrou um íon molecular em 234 Da sugerindo uma fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_4$ (Figura 5.82). A presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído nesta substância ficou clara com base na constatação de sinais na região de hidrogênios ou carbonos aromáticos nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C (Figuras 5.84 e 5.85). No espectro de RMN de 1H , observou-se um sinal em δ 13,32 que foi atribuído à um hidrogênio fenólico, enquanto os singletos em δ 2,24 e 2,09 foram assinalados para o grupo metil vinílico. Um intenso singlete em δ 3,92 (3H), junto com o sinal de ^{13}C para uma carbonila em δ 167,06, associado ao de uma metoxila em δ 52,12, indicou a presença de um éster metilílico. O sinal em δ 195,71 no espectro de RMN de ^{13}C , carbonila cetônica protegida, indicou um sistema conjugado. Essas interpretações permitiram a identificação da substância **P1** como sendo o tabogonato de metila, previamente isolada de *P. taboganum* (Roussis, 1989).

Figura 5.82. Espectro de massas da substância **P1** ($C_{13}H_{14}O_4$, 234 Da, IE, 70 eV).

Figura 5.83: Proposta de formação dos principais íons fragmentários observados no espectro de massas da substância **P1** (IE, 70 eV).

Tabela 5.15. Dados dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C da substância **P1** em 300 MHz e 75 MHz respectivamente, CDCl₃

Posição	δ ¹³ C	δ ¹ H (J em Hz)	
1	166,06		<p>Diagrama da estrutura química da substância P1 com numeração dos átomos de carbono e hidrogênio. A estrutura é um derivado de ácido salicílico com um grupo metoxycarbonyl (CO₂CH₃) e um grupo isopropenil. Os átomos de carbono são numerados de 1 a 5, e os átomos de hidrogênio são numerados de 1' a 5'.</p>
2	136,50	8,52 (1H, d, 2,1 Hz)	
3	160,25		
4	120,06		
5	120,67	6,98 (1H, d, 8,7 Hz)	
6	132,25	8,10 (1H, dd, 8,7 e 2,1 Hz)	
1'	195,71		
2'	119,39	6,87 (1H, s largo)	
3'	118,56		
4'	28,45	2,24 (3H, s)	
5'	21,67	2,09 (3H, s)	
OCH ₃	52,12	3,92 (3H s)	
OH		13,32 (1H, s)	
CO ₂	167,06

Figura 5.84. Espectro de RMN de ^1H da substância **P1** (300 MHz, CDCl_3 , TMS).

Figura 5.85. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P1** (75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Ácido benzóico prenilado P2:

A substância **P2** teve sua fórmula molecular $C_{18}H_{24}O_3$ deduzida por análise do espectro de massas (IE) bem como pela análise elementar. Em seu espectro no infravermelho foram observadas absorções de um grupo carbonílico de éster aromático em 1688 cm^{-1} e para um anel aromático em 1603 e 1434 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais correspondentes a três hidrogênios aromáticos em δ 6,83 (d, 1H, $J=8,4\text{ Hz}$), 7,80 (d, 1H, $J=2,2\text{ Hz}$) e 7,83 (dd, 1H $J= 8,4, 2,2\text{ Hz}$) para um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Além desses sinais, foram observados outros dois em δ 3,87 (3H, s) e 5,80 (1H, s) referentes aos grupos metoxílico e fenólico, respectivamente. A presença do grupo metoxílico foi ratificada pelos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C em δ 167,1 e 51,8 correspondentes a carbonila e a metila, respectivamente. Assim, a substância **P2** foi determinada com sendo o ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadieno)-4-metoxi-benzóico.

Tabela 5.16. Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **P2** em 300 e 75 MHz respectivamente, CDCl_3 .

Posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1		122,6
2	7,80 (1H, d, 2,2)	131,9
3		126,7
4		158,8
5	6,83 (1H, d, 8,9)	115,7
6	7,83 (1H, dd, 8,9, e 2,2)	129,7
1'	3,39 (2H, d, 7,15)	39,7
2'	5,31 (1H, t d, 7,15 e 1,18)	123,7
3'		139,3
4'	2,12 (2H, m)	26,4
5'	2,12 (2H, m)	29,7
6'	5,07 (1H, m)	121,0
7'		132,1
8'	1,67 (3H, s)	25,7
9'	1,77 (3H, s)	17,7
10'	1,59 (3H, s)	16,3
CO_2CH_3	3,87 (3H, s)	51,8
CO_2CH_3		167,1
OH	5,80 (1H, s)

Figura 5.86. Espectro de RMN de ¹H da substância **P2** (300 MHz, CDCl₃, TMS).

Figura 5.87. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P2** (300 MHz, CDCl_3 , TMS).

CENTRAL ANALÍTICA - IQS/P

BOMEM MB-100

05/02/02 16:10 Arquivo = 30
 Scans = 96 Res = 4 cm⁻¹
 Mode = 2 (MID IR) Apod = COSINE

Descrição: Clécio

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Wavenumber (cm ⁻¹)
3400.18
2954.67
2920.95
2854.67
2729.84
1899.94
1713.8
1688.74
1603.57
1507.3
1434.09
1376.22
1320.28
1282.41
1262.54
1221.36
1202.92
1190.61
1172.424
1150.61
1034.101
1022.92
1006.578
990.061
906.578
834.101
772.424
723.677
637.762
565.142
450.18

Ácido benzóico prenilado P3:

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de massas da substância **P3** foram similares aos dados dos observados para a substância **P2**. Seu espectro de massas indicou um íon molecular em 274 Da, 14 Da a menos que o íon molecular da substância **P2** sugerindo a ausência de um grupo metílico. Assim, baseado na interpretação dos dados de ambos os espectros de RMN de ^1H e de massas, quando comparados com os espectros de **P2**, a substância **P3** foi determinada como sendo o ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadieno)-4-hidroxi-ácido benzóico.

Tabela 5.17. Dados observados no espectro de RMN de ^1H da substância **P3** a 300 MHz, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (J em Hz)
2	7,8 (1H, d, 2,2)	
5	6,85 (1H, d, 8,9)	
6	7,90 (1H, dd, 8,9, e 2,2)	
1'	3,40 (2H, d, 7,9)	
2'	5,32 (1H, m)	
4'	2,13 (2H, m)	
5'	2,13 (2H, m)	
6'	5,07 (1H, m)	
8'	1,68 (3H, s)	
9'	1,78 (3H, s)	
10'	1,60 (3H, s)

Figura 5.90. Espectro de massas da substância **P3** ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3$, $M = 274$ Da, IE).

Figura 5.91. Espectro de RMN de ¹H da substância **P3** (300 MHz, CDCl₃, TMS).

Ácido benzóico prenilado P4:

O perfil do espectro de RMN de ^1H da substância **P4** foi similar ao do espectro da substância **P3**. Entretanto, um singlete adicional em δ 6,85 e dois CH_2 em δ 2,34 e 2,30 sugeriram a estrutura da substância **P4** como sendo o ácido 4-hidróxibenzóico triprenilado, que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ sugerida a partir dos dados de seu espectro de massas.

Figura 5.92. Espectro de massas da substância **P4** isolada das folhas de *P. hispidum* ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$, $M = 356$ Da, IE).

Tabela 5.18. Dados do espectro de RMN de ^1H da substância **P4** em 300 MHz, CDCl_3 .

Posição	δ ^1H , (J em Hz)
2	8,58 (1H, d, 2,1)	
5	7,04 (1H, d, 8,8)	
6	8,16 (1H, dd, 8,8, e 2,1)	
2'	6,85 (1H, s)	
4'	2,34 (2H, m)	
5'	2,30 (2H, m)	
6'	5,14 (1H, m)	
8'	2,05 (2H, m)	
9'	2,05 (2H, m)	
10'	5,07 (1H, m)	
12'	1,56 (3H, s)	
13'	1,64 (3H, s)	
14'	1,64 (3H, s)	
15'	2,24 (3H, s)	
<u>OH</u>	13,44 (1H, s)

Figura 5.93. Espectro de RMN de ^1H da substância **P4** (300 MHz, CDCl_3 , TMS)

Capítulo 6

Estabilidade de lignanas tetraidrofurânicas versus ocorrência natural

6.1 - Introdução

Lignanas são constituídas por duas unidades de fenilpropanóides e são amplamente distribuídas em plantas terrestres, exibindo grande variedade de atividades biológicas (Apers *et al.*, 2003; Miyazawa, 2001). Lignanas são classificadas em quatro subgrupos (Tabela E1), de acordo o modo no qual oxigênio é incorporado no esqueleto e o padrão de ciclização (Agrawal e Thakur, 1985).

Tabela 6.1. Classificação de lignanas.

1. Lignanas	<ul style="list-style-type: none"> • Derivadas de ciclobutano • Derivadas de butanolídeos • Derivadas de tetraidrofuranos • Derivadas de 3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano
2. Ciclolignanas	<ul style="list-style-type: none"> • Derivadas de tetraidronaftaleno • Derivadas de lactona de tetraidronaftaleno • Derivadas de lactona de naftaleno
3. Lignanas dibenzociclooctadieno	<ul style="list-style-type: none"> • Configuração <i>R</i>-bifenil • Configuração <i>S</i>-bifenil
4. Lignanas miscelâneas	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonolignana • Xantonolignana • Coumarinolignana

Figura 6.1. Diversos esqueletos de lignanas.

As lignanas tetraidrofurânicas podem agrupar-se em três tipos; 7,7'-monoepóxilignanas, 7,9'-monoepóxilignana e 9,9'-monoepóxilignana.

Figura 6.2. Lignanas tetraidrofurânicas.

Considerando-se a ocorrência rara das lignanas tetraidrofurânicas 7,7'-monoepóxi com configuração toda *cis*, foram realizados cálculos comparativos através do método da densidade de teoria funcional (B3LYP) entre a lignana com configuração toda *cis* (**L8**) e aqueles com configuração toda *trans* (**L1**), variando-se o grau de oxigenação do grupo arílico, através do disponível programa Gaussian 03 (Frisch *et al.*, 2003).

6.2 – Resultados

6.2.1 – Energia relativa das lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**

A otimização das estruturas foi realizada usando um programa em níveis B3LYP/6-31G(d,p) da teoria da densidade funcional, no qual os cálculos por Becker3LYP são bem estabelecidos para prover parâmetros estruturais de moléculas grandes, incluindo ligações de hidrogênios intra- e intermoleculares.

As frequências harmônicas foram calculadas para confirmar as geometrias de equilíbrio que correspondem à energia mínima e o ponto zero da energia, ZPE. O termo de correção foi adicionado nas energias eletrônicas das estruturas calculadas para estimar a diferença da energia relativa dos isômeros.

As estabilidades das lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9** foram primeiramente analisadas devido ao fato destas serem isoladas das folhas de espécies alopátricas de *P. solmsianum*, sendo que as lignanas **L5** e **L8** são novos produtos naturais.

Notáveis características nas análises dos parâmetros geométricos das lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9** são de ligações de hidrogênio intramolecular C-H...O, que fornecem uma importante contribuição para as estabilizações das estruturas.

As diferenças de energias calculadas para as lignanas toda *cis* e toda *trans* são compatíveis com a ocorrência natural desses isômeros, indicando que o isômero todo *trans* (**L1**) é um pouco mais estável, 0,42 Kcal mol⁻¹, do que a *epi*-grandisina (**L4**), e significativamente mais estável do que o isômero todo *cis* (**L8**) por 6,5 Kcal mol⁻¹ (Figura E3).

Figura 6.3. As energias relativas dos isômeros **L1** (toda-*trans*), **L8** (toda-*cis*) e **L4** (*epi*).

Foi também observado que o grupo metílico (C9') ligado ao anel tetraidrofurânico para a estrutura toda *cis* mostrou uma possível ligação adicional de produzindo uma desfavorável conformação *gauche* em torno da ligação C8. De acordo com os resultados calculados o ângulo do anel do C8-C8'-C7 é 3º menor que o ângulo do C7-C8-C8, correspondente.

Os cálculos para as lignanas **L5** e **L9** mostraram uma considerável diferença de energias em relação às lignanas **L1**, **L4** e **L8**, sendo as lignanas **L5** e **L9** menos estáveis.

Figura 6.4. As energias relativas das lignanas **L4**, **L5**, **L8** e **L9** em relação a **L1**.

Os altos valores de energias obtidos para as lignanas **L5** e **L9** são devidos às substituições dos grupos *meta* e *para*-metoxílicos pelo grupo metilenodioxílico no anel fenílico que reduz o número de ligações de hidrogênios.

A substituição de grupos metoxílicos por grupos metilenodioxílicos aumenta o valor da energia para aproximadamente 25 kcal mol⁻¹ para lignana **L5** e aproximadamente 50 kcal/mol⁻¹ para lignana **L9**, em relação à lignana mais estável **L1** (Figura E5).

Figura 6.5. Aumento de energia devido à substituição de grupos metoxílicos por grupos metilenodioxílicos em lignanas tetraidrofurânicas.

Estes resultados nas modificações estruturais das lignanas **L5** e **L9**, mais especificamente ao anel fenílico, sugerem que as estruturas geométricas de equilíbrio dessas lignanas são, em grande extensão, dependentes das ligações intramoleculares de hidrogênio.

Figura 6.6. Possíveis ligações de hidrogênio para as lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**.

Os cálculos de equilíbrio para as lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9** e os parâmetros geométricos principais obtidos após as otimizações de energia com método de B3LYP são apresentados nas tabelas 6.2-6.

Tabela 6.2. Energias calculadas com geometrias otimizadas em B3LYP/6-31G(d,p), adicionado com a energia do ponto zero (ZPE), para as lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**

Lignanas	Energia+ ZPE (Hartree/ partícula)	Energia Relativa (Hartree/partícula)	Energia Relativa (kcalmol ⁻¹)
L8	- 1459,800437	0,010359	6,5
L5	- 1419,337431	40,473365	25397,44
L9	-1378,883505	80,927291	50782,68
L4	-1459,810119	0,000677	0,42
L1	- 1459,810796	0,0	0,0

Tabela 6.3. Comprimentos selecionados de ligações (em Å) calculados pelo método B3LYP/6-31G(d,p) para as lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**.

	L8	L5	L9	L4	L1
O-C7	1,436	1,426	1,437	1,432	1,430
O-C7'	1,435	1,430	1,437	1,442	1,425
C7-C8	1,545	1,549	1,546	1,554	1,580
C8-C9	1,526	1,532	1,526	1,527	1,528
C7'-C8	1,547	1,580	1,546	1,541	1,550
C8'-C9'	1,526	1,528	1,526	1,532	1,532
C7-C1	1,516	1,512	1,515	1,522	1,516
C7'-C1'	1,514	1,518	1,515	1,525	1,511
C _{ring} -O _(MeO)	~1,37 ^a	1,374	1,361	1,372	~1,37 ^a
C _(MeO) -O _(MeO)	~1,43 ^a	1,434	1,420	~1,42 ^a	~1,43 ^a
C _{ring} -O _{MeO}		1,378	1,377		
(C-O) _{epoxi}		1,433	1,428		

^a Valores médios

Tabela 6.4. Comparação dos ângulos diedrais ($^{\circ}$) selecionados das lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**.

	L8	L5	L9	L4	L1
O-C7'-C1'-C6'	38,8	26,7	31,3	-34,9	11,1
C8-C7-C1-C2	90,7	-69,5	89,5	-89,0	-87,0
O-C7-C1-C6	32,0	-9,1	31,0	-29,0	-28,0
O-C7'-C8'-C9'	156,5	-138,3	157,0	147,0	-81,6
O-C7-C8-C9	157,5	81,5	156,5	158,7	137,8
O-C7-C8-C8'	32,6	-41,8	31,4	31,9	8,92
O-C7'-C8'-C8	30,4	-9,46	32,1	24,6	41,7

Figura 6.7. Esquema de numeração incluindo todos os hidrogênios em lignanas tetraidrofurânicas.

Tabela 6.5. Ligações de hidrogênios selecionadas ($\text{\AA}$) calculadas pelo nível de teoria B3LYP/6-31G(d,p)* para lignanas tetraidrofurânicas.

	L8	L5	L9	L4	L1
O11 – H38					2,87481
O11 – H33	2,53065	2,47395	2,44379	2,41733	2,40684
O29 – H63	2,40625				2,41130
O30 – H47	2,32478			3,00064	2,32082
O11 – H41	2,47677	2,39822	2,44094	2,50649	2,51029
O18 – H52					2,31947
O20 – H59					2,40968
O11 – H14		2,87041			

* Numeração de acordo com a Fig. 6.7

Tabela 6.6. Ângulos de ligações selecionados ($^{\circ}$) calculados pelo nível de teoria B3LYP/6-31G(d,p)* para lignanas tetraidrofurânicas.

	L8	L5	L9	L4	L1
O11-C7-C2	110,8	110,0	110,8	109,1	110,6
O11-C10-C12	110,6	110,4	110,4	111,7	110,6
C12-C10-C9	114,8	117,2	115,1	115,8	116,4
C7-C8-C25	114,3	116,4	114,4	114,2	113,8
C14-O22-C23	118,0	115,0	117,6	117,9	120,9
C15-O20-C21	116,4	113,6		114,4	116,4
C16-O18-C19	120,7	115,7		118,0	118,2
C4-O26-C27	121,3	118,8	117,6	118,0	121,0
C5-O28-C29	116,3			114,4	116,4
C6-O30-C31	118,2			118,2	118,1
C7-C2-C3	120,8	121,3	119,9	118,0	121,7
C10-C12-C13	120,3	121,6	119,9	120,9	121,8
C10-C9-C24	114,3	113,8	114,4	116,7	116,4

* Numeração de acordo com a Fig 6.7.

Figura 6.8. Representações das estruturas tridimensionais para as lignanas **L1**, **L4**, **L5**, **L8** e **L9**.

6.2.2 – Efeito do grau de metoxilas na estabilidade das lignanas tetraidrofurânicas

A maior estabilidade da lignana hexametoxilada **L1**, toda *trans*, em relação a seu isômero todo *cis* (**L8**), é devido o número e o tipo de conformação das ligações de hidrogênios formadas que contribuem para uma configuração mais ou menos estável. Assim, no intuito de investigar se o grau de metoxilas influenciaria diretamente na estabilidade das lignanas tetraidrofurânicas foram realizados cálculos comparativos da energia eletrônica para as configurações *cis* e *trans* variando-se o grau de metoxilas (Figuras 6.9 e 6.10).

Figura 6.9. Energia eletrônica de lignanas tetraidrofurânicas, configuração toda *cis* e toda *trans*, variando o grau de metoxilas no substituinte aril (1 Hartree = 627,51 Kcal mol⁻¹).

Figura 6.10. Aumento de energia com a diminuição do grau de metoxilação para as lignanas tetraidrofurânicas com configurações *cis* e *trans*.

Foi claramente observado que a diminuição do número de metoxilas diminui a estabilidade estrutural das lignanas com configurações *cis* e *trans*, com exceção da **4** que é ligeiramente mais estável que aquela com a configuração **3**, ratificando a contribuição das metoxilas na estabilidade das lignanas tetraidrofurânicas. Foi ainda observado que o nível de metoxilação máximo (hexametoxilado) e não metoxilado são mais estáveis para configuração *trans* do que a configuração *cis*. Enquanto a configuração *cis* é mais estável do que a *trans* para a lignana tetrametoxilada (Figura 6.11).

Figura 6.11. A diferença entre as energias das configurações *cis* e *trans* à esquerda e seus respectivos valores relativos em relação à configuração toda *trans*-1 à direita.

6.2.3 – Estudo da estabilidade das 10 possíveis configurações do anel tetraidrofurano para lignana tetraidrofurânicas

Existem dez possíveis estereoisômeros para as lignanas tetraidrofurânicas, sendo quatro pares diastereoméricos e duas formas *meso*.

Figura 6.12. As 10 possíveis configurações para as lignanas tetraidrofurânicas.

Em concordância com a ocorrência natural, a configuração mais estável para as lignanas tetraidrofurânicas naturais é observada para o isômero todo *trans*, devido a contribuição das possíveis ligações de hidrogênios formadas entre as metoxilas. Assim, no intuito de investigar a estabilidade das lignanas tetraidrofurânicas baseada apenas nas possíveis configurações do anel tetraidrofurano, foi realizado o cálculo das energias para os 10 possíveis estereoisômeros sem a presença das metoxilas (Figura E13).

Figura 6.13. Energias relativas dos dez isômeros para as lignanas tetraidrofurânicas.

A configuração toda *trans* continua sendo a mais estável, enquanto que a toda *cis* é a menos estável entre os 10 estereoisômeros, mesmo com a ausência das metoxilas. Esse resultado indica que tanto a configuração quanto o grau de metoxilação contribuem para a estabilidade das lignanas tetraidrofurânicas.

6.3 - Experimental

Tabelas das coordenadas cartesianas e as energias absolutas

Lignana L8	S 1
Lignana L5	S 3
Lignana L9	S 5
Lignana L4	S 6
Lignana L1	S 8
Referencias	S 9

Lignana L8

Simetria: C1

C,0,0,3053491214,-0,68043638,-3,7894535654
 C,0,0,3013507153,-0,6993637474,-2,3850345463
 C,0,1,5044871107,-0,7126630611,-1,6956333651
 C,0,2,7294654901,-0,7068852856,-2,3841842866
 C,0,2,7477931691,-0,6725835919,-3,7873423756
 C,0,1,513871043,-0,6500582268,-4,481332835
 C,0,-1,028281001,-0,7044264721,-1,6657411855
 C,0,-1,8472771892,0,6114575215,-1,6857948879
 C,0,-2,8568282398,0,3125950191,-0,5440875062
 C,0,-2,050992762,-0,6470360433,0,4198204944
 O,0,-0,8486694668,-0,9825818378,-0,278880542
 C,0,-1,7173919624,-0,1214172752,1,8031693683
 C,0,-0,5163312603,0,5199682204,2,0735228817
 C,0,-0,2311678829,1,0100551803,3,35786966
 C,0,-1,1708797691,0,8637110377,4,3917352327
 C,0,-2,3933635327,0,2108126482,4,1081901613
 C,0,-2,6548349116,-0,2904998862,2,8339651469
 O,0,-3,2693194514,0,1341462958,5,1577900548
 C,0,-4,5413169255,-0,4492420395,4,9284346398
 O,0,-0,9454298642,1,4351997543,5,6249996087
 C,0,-0,8214187635,0,5360752886,6,7312025224
 O,0,0,9613058798,1,6662574161,3,468005775
 C,0,1,7097183948,1,6283158691,4,6812269345
 C,0,-3,5232038648,1,5255790588,0,1044311155

 C,0,-0,9979870241,1,8723802137,-1,4964522821
 O,0,3,8331167284,-0,6737792577,-1,5803747835
 C,0,5,0564882209,-1,282335309,-1,9862454456
 O,0,3,9392427356,-0,5528375474,-4,4701163819
 C,0,4,3014987713,-1,6492294301,-5,314728585
 O,0,1,6159007228,-0,579166511,-5,8450008873
 C,0,0,4204435315,-0,4853910428,-6,6019295312
 H,0,-0,635366398,-0,6793916814,-4,3276312819
 H,0,1,5235023791,-0,7522173302,-0,6144341636

Lignana L5

Simetria: C1

O	0	2,50507	0,35486	-5,57218
C	0	2,26598	0,32737	-4,20454
C	0	3,47994	0,40509	-3,52432
O	0	4,50797	0,50331	-4,4371
C	0	3,87124	0,75671	-5,6895
C	0	1,06927	0,2045	-3,50549
C	0	1,16249	0,14817	-2,09895
C	0	2,38077	0,20875	-1,42638
C	0	3,58319	0,35489	-2,15038
C	0	2,45368	0,12947	0,08807
C	0	2,70522	-1,29409	0,72779
C	0	1,38153	-1,59097	1,48388
C	0	0,95491	-0,14523	1,84383
O	0	1,23365	0,60572	0,66378
C	0	-0,47762	0,06619	2,28042
C	0	-1,39727	0,74307	1,47653
C	0	-2,71278	0,92731	1,90928
C	0	-3,12952	0,42603	3,15179
C	0	-2,20556	-0,26464	3,95502
C	0	-0,89243	-0,43769	3,51955
O	0	-2,55158	-0,70896	5,21107
C	0	-3,49464	-1,78449	5,24218
O	0	-4,42846	0,60985	3,58028
C	0	-4,61381	1,80901	4,34263
O	0	-3,56805	1,67399	1,13142
C	0	-4,64468	0,94557	0,535
C	0	0,33052	-2,36741	0,68289
C	0	3,20496	-2,38754	-0,21673
O	0	-0,18359	0,11183	-4,03147
C	0	-0,388	0,47461	-5,3957
H	0	-0,20115	-0,9572	4,17771
H	0	-1,09505	1,16173	0,52437

H,0,-2,800612323,2,1727514676,0,6065559774
 H,0,-4,0504403527,2,1201842249,-0,6496323182
 H,0,-4,2579010804,1,2155927066,0,8539915692
 H,0,-1,6288219931,2,7659229749,-1,4768752298
 H,0,-0,4263872645,1,8465625772,-0,5655169234
 H,0,-0,2881311808,1,9827192373,-2,3206191878
 H,0,-3,583753078,-0,8098666708,2,6291466851
 H,0,0,2409926576,0,628623322,1,3080114564
 H,0,0,7309607996,-0,4026863301,-7,6446066923
 H,0,-0,2086024579,-1,3770144119,-6,4827270003
 H,0,-0,1622512029,0,4025775305,-6,3265317684
 H,0,5,275815281,-1,3954021504,-5,7381100243
 H,0,4,3904475283,-2,579667181,-4,7385192392
 H,0,3,5773802925,-1,7886177727,-6,1207019515
 H,0,-5,0809139046,-0,3735645236,5,8736983841
 H,0,-5,0971582736,0,0893263386,4,1507082617
 H,0,-4,4601258521,-1,5060758888,4,6433804096
 H,0,-0,5995745168,1,157383905,7,6016271086
 H,0,-1,747882858,-0,0167747664,6,9020416149
 H,0,0,0028252826,-0,1719727925,6,5743202818
 H,0,-1,6570017835,-1,495588341,-2,1146445339
 H,0,-2,6465017167,-1,5640998173,0,5532679681
 H,0,-2,3863189154,0,6946736391,-2,6377094228
 H,0,-3,6525044217,-0,30168053,-0,9850501179
 H,0,2,7181929962,1,9496811454,4,4104124397
 H,0,1,2964105835,2,2985677328,5,4370947479
 H,0,1,760071569,0,6103650638,5,0870028271
 H,0,5,6511207357,-1,3746184587,-1,0742270749
 H,0,4,8860251683,-2,2839892089,-2,3999262563
 H,0,5,5921831501,-0,675904106,-2,7188258552

Correção do ponto zero = 0,529318 (Hartree/Partículas)
 Correção térmica para energia = 0,562254
 Correção térmica para entalpia = 0,563198
 Correção térmica para energia livre de Gibbs = 0,462791
 Soma das energias eletrônicas e do ponto zero = -1459,800437
 Soma das energias eletrônicas e térmicas = -1459,767501
 Soma das energias eletrônicas e entalpia = -1459,766557
 Soma das energias eletrônicas e térmicas livres = -1459,866964

H 0 4,17178 -2,11711 -0,65491
 H 0 3,34091 -3,32915 0,32863
 H 0 2,51158 -2,56797 -1,04266
 H 0 0,70148 -3,36352 0,41984
 H 0 -0,5823 -2,49669 1,27275
 H 0 0,06022 -1,85571 -0,24544
 H 0 4,54581 0,43449 -1,65644
 H 0 0,23666 0,08786 -1,54037
 H 0 -5,21065 1,67114 -0,05421
 H 0 -4,26121 0,16038 -0,1302
 H 0 -5,29375 0,49987 1,29521
 H 0 -5,67111 1,83726 4,6174
 H 0 -3,9988 1,79101 5,24987
 H 0 -4,36636 2,69234 3,74262
 H 0 -3,64865 -2,02055 6,29787
 H 0 -4,44532 -1,49462 4,78484
 H 0 -3,09262 -2,66838 4,72884
 H 0 3,92216 1,8334 -5,91581
 H 0 4,35513 0,16673 -6,47121
 H 0 1,61583 0,20559 2,65744
 H 0 3,27217 0,79165 0,41054
 H 0 3,47613 -1,14749 1,49595
 H 0 1,60128 -2,14976 2,40249
 H 0 -1,46603 0,40803 -5,55577
 H 0 -0,05211 1,50017 -5,58897
 H 0 0,12944 -0,20639 -6,07818

Correção do ponto zero = 0,479389

(Hartree/Partículas)

Correção térmica para energia = 0,508541
 Correção térmica para entalpia = 0,509485
 Correção térmica para energia livre de Gibbs = 0,417364
 Soma das energias eletrônicas e do ponto zero = -1419,337505
 Soma das energias eletrônicas e térmicas = -1419,308353
 Soma das energias eletrônicas e entalpia = -1419,307409
 Soma das energias eletrônicas e térmicas livres = -1419,399530

Lignana L4

Simetria: C1

C,0,-1,0815279123,-0,1128562765,2,4089794844
 C,0,-1,6337601397,0,6641665634,1,3836787073
 C,0,-2,7790889739,0,2205862011,0,7146909844
 C,0,-3,3747565762,-0,9982508653,1,0723690401
 C,0,-2,8161298233,-1,7892266668,2,0886103709
 C,0,-1,6684691364,-1,3325769321,2,7612958692
 C,0,-0,9779136872,2,0042627669,1,0654490915
 C,0,-1,1899878899,2,5851186858,-0,347103986
 C,0,0,1392273871,3,3274433532,-0,5961900849
 C,0,1,1746751792,2,4366568778,0,1452122433
 O,0,0,4480949816,1,8888394655,1,2512569002
 C,0,1,8354858333,1,3492482671,-0,6915991209
 C,0,3,0103450418,1,6506573544,-1,3895866851
 C,0,3,6168609753,0,6798330242,-2,1960543424
 C,0,3,0466106499,-0,5996834676,-2,3108904465
 C,0,1,8838117251,-0,9023870942,-1,5820455685
 C,0,1,2798644456,0,0712097532,-0,7762927357
 O,0,1,4226168367,-2,1783392757,-1,721354221
 C,0,0,2357894421,-2,538483409,-1,0259803547
 O,0,3,6077318929,-1,525927554,-3,1545824092
 C,0,4,483096155,-2,4550061927,-2,5151584234
 O,0,4,7682215059,0,8702909484,-2,9053183809
 C,0,5,3823107069,2,1458969049,-2,8493664825
 C,0,0,4319777972,3,6502419879,-2,0598053649
 C,0,-2,418253903,3,4916779145,-0,4757217623
 O,0,-4,4977575317,-1,509390457,0,4885802081
 C,0,-5,1006660394,-0,7749616885,-0,5630707741
 O,0,-3,3565535835,-3,0169709883,2,3781367729
 C,0,-4,2586592147,-3,0202640591,3,4851319991
 O,0,-1,2052396522,-2,1581379329,3,7441685518
 C,0,-0,029872135,-1,7719331204,4,4409462673
 H,0,-3,2081160154,0,8135966671,-0,0808571545
 H,0,-0,1838121707,0,2373253313,2,8994978706
 H,0,0,4709728957,2,7432377236,-2,6693417586
 H,0,-0,3409864034,4,3074695643,-2,471397828
 H,0,1,3912677921,4,1657513944,-2,1715963575
 H,0,3,4508358886,2,6362159441,-1,2916714444
 H,0,0,4051199971,-0,1638481823,-0,1864926654
 H,0,0,0391334846,-3,5783081302,-1,290213622
 H,0,0,3581021269,-2,4570536161,0,0606347967
 H,0,-0,6157944948,-1,918931854,-1,3316650338
 H,0,-5,9640005739,-1,3613675238,-0,8810208105
 H,0,-5,441041606,0,2138525698,-0,2284610252
 H,0,-4,4191880862,-0,648609358,-1,4142567672
 H,0,-4,6107454762,-4,0485667018,3,592412

Lignana L9

Simetria: C1

O,0,0,3039786375,-0,5249844224,-6,3233059031
 C,0,0,2932355619,-0,5702020689,-4,9458099163
 C,0,1,5888949516,-0,5564788424,-4,4556653948
 O,0,2,4735402952,-0,5116681525,-5,5106271761
 C,0,1,6740367322,-0,7254386678,-6,6808996439
 C,0,-0,8044588301,-0,5617677545,-4,0900482679
 C,0,-0,5310934873,-0,5626873839,-2,710203173
 C,0,0,7821356832,-0,556050203,-2,2225039535
 C,0,1,8788668174,-0,5404368076,-3,1021547542
 C,0,1,0345634556,-0,620356343,-0,7300299867
 C,0,1,1293690199,-2,0464803979,-0,1405573037
 C,0,0,7189523036,-1,8001953045,1,3220245163
 C,0,-0,3941697849,-0,7394421581,1,1565389891
 O,0,-0,0276807473,0,0220110403,-0,0060635843
 C,0,-0,596486046,0,1682720506,2,3528282732
 C,0,-1,5015514646,-0,2145578141,3,3585701828
 C,0,-1,5996343685,0,6229791346,4,4564936232
 C,0,-0,8641681338,1,790469274,4,5783958675
 C,0,0,0254595095,2,1924255086,3,5864279167
 C,0,0,1456913825,1,3510028689,2,4655084227
 O,0,-2,3843446961,0,4607371853,5,5769459597
 C,0,-2,2685773095,1,6932864209,6,2995612952
 O,0,-1,1462628284,2,4094797805,5,776986891
 O,0,0,6969176706,3,3606600617,3,783797911
 C,0,1,5992689376,3,7825277286,2,7714771473
 C,0,0,2955650744,-3,0423736292,2,1021225567
 C,0,2,4851148052,-2,7208158064,-0,335322077
 O,0,-2,0416240864,-0,5472540481,-4,6592710251
 C,0,-3,1662236894,-0,5044559221,-3,7930362353
 H,0,2,9018811517,-0,5052989813,-2,7450892064
 H,0,-1,3390610871,-0,5360227425,-1,9912596576
 H,0,-0,011812848,-2,783596322,3,1200878992
 H,0,-0,544981094,-3,5485504574,1,6124292219
 H,0,1,11834555,-3,7600062479,2,1795174852
 H,0,3,2866999744,-2,1366534742,0,1322859896
 H,0,2,4971624136,-3,7206304162,0,1098633123
 H,0,2,7222812816,-2,8304399593,-1,3980567801
 H,0,-2,1039360557,-1,1122669902,3,2787143028
 H,0,0,7936418933,1,623286613,1,6430403183
 H,0,2,0220430475,4,7246850814,3,1227127765
 H,0,2,4079162168,3,0559394001,2,6223991126
 H,0,1,0864509582,3,9484825001,1,8160382889
 H,0,1,9585984189,-0,0048232945,-7,452318108
 H,0,1,8161949466,-1,7577160188,-7,0362958055
 H,0,-2,1034879967,1,4793590264,7,3590834228

H,0,-3,7542145806,-2,7124923253,4,4082526229
 H,0,-5,1166490986,-2,3630122879,3,2974650508
 H,0,6,2637826092,2,0828553181,-3,489398415
 H,0,4,7184650654,2,9339029961,-3,2282066701
 H,0,5,6962351397,2,4045773003,-1,8294373732
 H,0,4,8549339406,-3,1180861957,-3,2995474295
 H,0,5,3312021528,-1,9406751033,-2,0463235605
 H,0,3,9508100228,-3,048074225,-1,7626917359
 H,0,0,1663297632,-2,5689439789,5,1596085584
 H,0,0,8280001554,-1,6750976874,3,7641644904
 H,0,-0,1682836696,-0,8254307468,4,9786310208
 H,0,-1,3402696087,2,7408006001,1,8028029142
 H,0,1,9701992694,3,0698957886,0,5598019876
 H,0,0,0934426399,4,2717445446,-0,0341769432
 H,0,-3,3492766844,2,9662586242,-0,2437118243
 H,0,-2,3433038718,4,3428636183,0,2110612438
 H,0,-2,5102412031,3,8892966451,-1,4913040575
 H,0,-1,2656444436,1,7577203459,-1,0646470123

Correção do ponto zero = 0,529246 (Hartree/
Partículas)

Correção térmica para energia = 0,562348
 Correção térmica para entalpia = 0,563293
 Correção térmica para energia livre de Gibbs = 0,461472
 Soma das energias eletrônicas e do ponto zero = -1459,810119
 Soma das energias eletrônicas e térmicas = -1459,777016
 Soma das energias eletrônicas e entalpia = -1459,776072
 Soma das energias eletrônicas e térmicas livres = -1459,877892

H,0,-3,1846248899,2,2869852593,6,1573537691
 H,0,-4,0423425858,-0,486029075,-4,4425478076
 H,0,-3,2132805709,-1,3903908091,-3,1472073876
 H,0,-3,1594180518,0,3956408841,-3,1661156701
 H,0,-1,3443031539,-1,2592774018,0,9498351
 H,0,0,351899532,-2,6580423639,-0,6208338166
 H,0,1,9776787931,-0,0908104567,-0,5149181188
 H,0,1,561513472,-1,3210186081,1,8412682683

Correção do ponto zero = 0,430711 (Hartree/
Partículas)

Correção térmica para energia = 0,457447
 Correção térmica para entalpia = 0,458391
 Correção térmica para energia livre de Gibbs = 0,371323
 Soma das energias eletrônicas e do ponto zero = -1378,883505
 Soma das energias eletrônicas e térmicas = -1378,856769
 Soma das energias eletrônicas e entalpia = -1378,855825
 Soma das energias eletrônicas e térmicas livres = -1378,942893

Lignana L1

Simetria: C1

C,0,1,2184141579,0,6080382535,-3,4549344501	H,0,-1,1210257454,0,9937227795,3,6551573445
C,0,1,2280477631,0,6274723779,-2,0653313998	H,0,-1,8774921622,-1,5916411804,0,3111748841
C,0,2,4508680029,0,6434040025,-1,3818446761	H,0,-2,1602341957,2,2500034324,-2,4425229103
C,0,3,646130739,0,6615268433,-2,0976615641	H,0,-1,6130787632,3,8148930083,-1,8203407337
C,0,3,6475350116,0,6482409898,-3,5133413329	H,0,-0,6122278781,2,928712789,-2,9746079765
C,0,2,41593811,0,6202089656,-4,1873310805	H,0,-2,3237539921,3,8058644095,0,5817073324
C,0,-0,0759885855,0,6818009736,-1,2992663973	H,0,-2,3282770433,2,7892958021,2,0252535599
C,0,-0,5721010275,2,1063163316,-0,9623447245	H,0,-0,8211414596,3,5487657753,1,4816844072
C,0,-1,4374856415,1,8405062554,0,2821163414	H,0,0,2894005685,0,5680538508,-0,4144707871
C,0,-0,6169847028,0,7455796857,1,0048123132	H,0,2,4426467298,0,6225025229,-0,3005458859
O,0,0,0532701173,0,0150081959,-0,0329792688	H,0,6,0150619535,0,8346676119,0,145626274
C,0,-1,4322819835,-0,184310573,1,8791220511	H,0,4,4424219851,1,6654614807,0,290170801
C,0,-1,6208487023,0,1300256383,3,2330350772	H,0,4,5214349155,-0,1173339206,0,3674116329
C,0,-2,4180186824,-0,6881579005,4,0332768842	H,0,6,5834879885,-0,0808567866,-4,7658229346
C,0,-3,0536960141,-1,8308518529,3,4942138743	H,0,6,0877885683,-0,4704815645,-3,0957639231
C,0,-2,8486942904,-2,1405077729,2,1382811008	H,0,5,2790509721,-1,2646602328,-4,4784904988
C,0,-2,0365056785,-1,3149945243,1,3462713459	H,0,-2,2279461178,0,5504041984,7,0516390085
O,0,-3,3317692009,-3,2466981411,1,4994218609	H,0,-0,86088887,0,4975057015,5,9067185156
C,0,-4,5770860536,-3,8311058453,1,8738316553	H,0,-2,2591918613,1,5620442366,5,5827158018
O,0,-3,7563013688,-2,6922320238,4,3090006526	H,0,-5,4023124111,-3,0080731948,5,4466880072
C,0,-4,9694829441,-2,1857261817,4,8729009245	H,0,-4,7786516712,-1,3380538232,5,5350547861
O,0,-2,6228205526,-0,4864692847,5,3718362927	H,0,-5,6749827044,-1,8840460146,4,0873432199
C,0,-1,9499475807,0,5939429797,5,9975174629	H,0,0,143870535,1,2371400831,1,6343864894
C,0,-1,7444153837,3,0647489384,1,1411943538	H,0,-0,8524098839,0,1712959856,-1,8921108728
C,0,-1,2793928352,2,8148241464,-2,1147573143	H,0,0,3020314615,2,699840769,-0,6573602001
O,0,4,8839598867,0,7154631723,-1,5158218531	H,0,-2,3837239524,1,386958282,-0,0458201108
C,0,4,9535093662,0,7764118232,-0,0995438854	H,0,2,6912755871,-0,0689915051,-7,3718370376
O,0,4,8243182944,0,7631257582,-4,220685626	H,0,4,1141780086,0,5944523718,-6,5163305516
C,0,5,7386228818,-0,3335993031,-4,1214704672	H,0,3,4408299109,-0,9899292904,-6,0448204247
O,0,2,2593589625,0,6616578229,-5,5445032165	H,0,-4,850748283,-4,4855022759,1,0427376218
C,0,3,1950710464,0,0162780879,-6,4059907712	H,0,-4,4965731163,-4,4128479036,2,7937237925
	H,0,-5,3561900218,-3,0684454318,1,994968707

Correção do ponto zero = 0,528866

(Hartree/Partículas)

Correção térmica para energia = 0,561981

Correção térmica para entalpia = 0,562925

Correção térmica para energia livre de Gibbs = 0,461431

Soma das energias eletrônicas e do ponto zero = -1459,810843

Soma das energias eletrônicas e térmicas = -1459,777728

Soma das energias eletrônicas e entalpia = -1459,776784

Soma das energias eletrônicas e térmicas livres = -1459,878278

6.4 - Conclusões

Os cálculos realizados sobre a estabilidade relativa das lignanas tetraidrofurânicas forneceram um novo conjunto de dados de referência para tais tipos de lignanas (fase gasosa). Estes mostram que as ligações intramoleculares de hidrogênio estão relacionadas ao perfil geométrico da energia de equilíbrio que está compatível com a ocorrência natural das estruturas estudadas.

As energias das estruturas geométricas calculadas mostram que a lignana **L1**, a (-)-grandisina, é mais estável do que as lignanas **L4**, **L5**, **L8** e **L9**, como esperado para a ocorrência natural. A lignana **L1** é mais estável devido à presença de seis metoxilas e por ter uma configuração toda-*trans* que favorece a formação de ligações de hidrogênios com conformações que contribuem para uma maior estabilidade.

Considerações finais

O estudo da ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae mostrou que os metabólitos secundários dessas espécies têm forte influência na adaptação e alimentação da espécies de coleópteros, lepidópteros e homópteros. As espécies de coleópteros e homópteros mostraram especificidade por espécies de Piperaceae que contém ácidos benzóicos prenilados. As espécies de lepidópteros mostraram uma forte especificidade por espécies de Piperaceae que contém lignanas ou neolignanas. Tais especificidades foram observadas em algumas regiões do Brasil (BA, SP e MG) e em espécies de Piperaceae alopátricas, parapátricas e simpátricas. Essa surpreendente especificidade baseada na química da planta vem corroborar com a hipótese de que metabólitos secundários podem afetar diretamente o hábito alimentar e o comportamento de insetos.

O metabolismo de metabólitos secundários de espécies de Piperaceae em insetos é variável. Foi observado que as neolignanas de *P. regnellii* e lignanas e fenilpropanóides de *P. solmsianum* são biotransformadas para suas formas mais polares, indicando um possível mecanismo de desintoxicação (Harmathan, 2002). As reações de biotransformações observadas no metabolismo das lignanas, neolignanas e fenilpropanóides incluem esterificação, hidrólise e reação do tipo ozonólise. O estudo do metabolismo das amidas de espécies de Piperaceae mostrou que algumas amidas sofrem hidrólises. Entretanto, as amidas **A5** e **A6** não são metabolizadas, mantendo sua estrutura original. O extrato das folhas de *P. tuberculatum* que contém as amidas **A5** e **A6** foi submetido a um tratamento em condição básica e foi observado que as duas também não sofrem hidrólise.

As larvas da borboleta *H. brasiliensis* seqüestram parte das neolignanas **N1-N4** das folhas de *P. regnellii* não biotransformadas e estas são armazenadas até a fase adulta. O besouro *N. bipes* seqüestra dois ácidos benzóicos prenilados das raízes de *P. gaudichaudianum* armazenando-os até a fase adulta. Esses dois casos de seqüestros são os primeiros relatos desse gênero no estudo das interações químicas entre insetos e espécies de Piperaceae.

O estudo com os insetos sugadores de seivas indicou que esses utilizam diversos mecanismos para selecionar a planta hospedeira. Os fatores químicos que influenciam positivamente para adaptação desses insetos incluem: classe de metabólitos, ligninas com predominância de resíduo siringila, um alto teor de micronutrientes em relação aos macronutrientes analisados.

Em função da rara ocorrência de lignanas tetraidrofurânicas com configuração toda *cis* observada durante a investigação fitoquímica das espécies de Piperaceae foram realizados estudos dos cálculos de estabilidade para os dez isômeros possíveis para as lignanas tetraidrofurânicas. Foi observado que o estereoisômero todo *cis* é menos estável e o todo *trans* mais estável, com uma diferença em energia de 6,5 kcal/mol.

Referências Bibliográficas

- Abe, F., Yamauchi, T. Honda, K., Omura, H. e Hajashi, H. 2001. Sequestration of phenanthroidolizidine alkaloids by an Asclepiadaceae-feeding danaid butterfly *Ideopsis similes*. *Phytochemistry*. 56:697-701.
- Adams, P. R. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Agrawal, P. K. e Thakur, R. S. 1985. ¹³C RMN spectroscopy of lignans and neolignans derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 6:389-418.
- Ahmed, A. A., 1991. Daucanes and other constituents from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*. 30:1207-1210.
- Alécio, A. C., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Kato, M. J. e Furlan, M., 1998. Antifungal amides from *Piper hispidum*. *Journal Natural Product*. 61:637-639.
- Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. das G., Santos, A. S. e Maia, J. G. S. 1998. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C.DC. *Journal of Essential Oil Research*. 10:465-467.
- Apers, S., Vlietinck, A. e Pieters, L. 2003. Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochemistry*. 2:201-217.
- Aplin, R.T. e Rothschild, M. 1968. Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature*. 219:747-748.
- Asprey, G. F. e Thornton, P. 1954. in Medicinal Plants of Jamaica. West Indies Medicinal Journal, Kingston, Jamaica.
- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. da S., Young, M. C. M. e Furlan, M., 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. 51:889-902.
- Barbosa-Filho, J. M., Silva, M. S., Yoshida, M. e Gottlieb, O. R., 1989. Neolignans from *Licaria aurea*. *Phytochemistry*. 28:2209-2211.
- Barfield, C. S., e J. L. Stimac. 1980. Pest management: An entomological perspective. *BioScience*. 30:683-689.
- Becerra, J. X., 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*. 11:253-256.

- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P. e Kato, M. J., 1999. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*. 52:339-343.
- Berenbaum, M. R. The chemistry of defense: Theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2-8.
- Bevan, M. 2000. Plant pathology: The bugs from Brazil. *Nature*. 406:140-141.
- Brower, L. P. Seiber, J. M., Nelson, C. J., Lynch, S. P. e Tuskes, P. M. 1982. Plant-determined variation in the cardenolide content, thin-layer chromatography profiles, and emetic potency of monarch butterflies, *Danaus plexippus* reared on the milkweed, *Asclepias eriocarpa* in California. *Journal of Chemical Ecology*. 8:579-633.
- Brower, L. P. e Brower, J. V. Z. 1964. Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological chemistry. *Zoologica*. 49:137-159.
- Brown Jr., K.S. 1992. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal, p. 142-187. In Morellato, L.P.C. (org.) História Natural da Serra do Japi. Ecologia e preservação de uma área florestal do sudeste do Brasil. Editora da Unicamp e Fapesp, 321p.
- Brown, K. S. 1984a. Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult ithomiine (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 44:435-460.
- Brown, K. S. 1984b. Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. *Nature*. 309:707-709.
- Budziak, C. R., Maia, C. M. B. F. e Mangrich, A. S. (2004). Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Química Nova*. 27:399-403.
- Burke B e Nair M. 1986. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* species. *Phytochemistry*. 25:1427-1430.
- Chambers, D. L. 1977. Attractants for fruit fly survey and control, pp. 327-344 in H. H. Shorey e J. J. McKelvey [eds.], Chemical control of insect behavior. Wiley, New York.
- Chauret, D. C., Bernard, C. B., Arnason, J. T., e Durst, T. 1996. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *Journal Product Natural*. 59:152-158.
- Concon, JM, DS Newburg, e TW Swerczek. 1979. Black pepper [*Piper nigrum*]: evidence of carcinogenicity. *Nutrition and Cancer*. 1:22-25.
- Cragg, G. M. e Newman, D. J. 2005. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. *Pure and Applied Chemistry*. 77:1923-1942.
- Cronin, J. T. e Abrahamson, W. 2001. Do parasitoids diversity in response to host-plant shifts by herbivorous insects? *Environ. Entomol.* 26: 347-355.

- De Figueiredo, R. A. e Sazima, M. 2000. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany*. 85:455-460.
- Dicke, M. e Sabelis, M. W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct. Ecol.* 2:131-139.
- Dyer, L. A., Dodson, C. D., Stireman III, J. O. M., Tobler, M. A., Smilanich, A. M., Fincher, R. M. e Letourneau, D. K. 2003. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. *Journal Chemical Ecology*. 29:2499-2514.
- Dyer, L. A., Dodson, C. D., Beihofferl, J. e Letourneau, D. K. 2001. Trade-offs in antiherbivores defenses in *Piper cenocladum*: ant mutualists versus plant secondary metabolites. *Journal Chemical Ecology*. 27:581- 592.
- Dyer, L.A., Williams, W., Dodson, C. e D.K. Letourneau. 2000. A commensalism between *Piper marginatum*. Jacq. (Piperaceae) and a coccinellid beetle. *Journal of Tropical Ecology*. 15:841-846
- Dyer, L.A., Dodson, C.D. e J. Richards. 2004. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. Pages 117-139 in: Dyer, L.A. and A.N. Palmer (eds.). *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Edwards, P. J. e Wratten, S. D. 1980 Ecology of insect-plant interactions, E.P.U. São Paulo.
- Ehmke, A., Borstel, K. e Hatmann. 1988. Alkaloid n-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta*. 176:83-90.
- Ehrlich, P. R. e Raven, P. H. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*.18:586-608.
- Erbilgin, N. 2000. Opposing effects of host monoterpenes on responses by two sympatric species of bark beetles to their aggregation pheromones. *Journal of Chemical Ecology*. 26:2527-2548.
- Espírito-Santo, M. M. e Fernandes, W. 2002. Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). *Austral Ecology*. 27:249-257.
- Ferreira, J. T. B., Corrêa, A. G. e Vieira, P. C. 2001. Naturais no Controle de Insetos. 1. ed. São Carlos: Edufscar, 176 p.
- Fonseca, S. F., Barata, L. E. S. e Rúveda, E. 1979. ¹³C nuclear magnetic resonance spectral and conformational analysis of naturally occurring tetrahydrofuran lignans. *Canadian Journal Chemical*. 57:441-443.

- Frenzel, M. e Brandl, R. 2001. Hosts as habits: faunal similarity of phytofagous insects between host plants. *Ecological Entomology*. 26:594-601.
- Frisch, M. J., et al., 2003. *Gaussian 03, Revision B.05, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA*.
- Futuyma, D.J. 1997. *Biologia evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 646p.
- Gao, R., Gao, C., Tian, X., Yu, X., Di, X., Xiao, H. e Zhang, X. 2004. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest manag. Science*. 60:1131:1136.
- Gotltied, O., Borin, M. R. M. B. e Kaplan, M. A. C. 1994. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in angiosperms. *Phytochemistry*. 40:99-113.
- Harmatha, J. e Nawrot, J., 2002. Insect feeding deterrent activity of lignans related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entom. Experimentalis et Applicata*. 104:51-60.
- Herath, H. M. T. B. e Priyadarshani, A. M. N. 1996. Two lignans and an aryl alkanone from *Myristica dactyloides*. *Phytochemistry*. 42:1439-1442.
- Herrera, M. C. e Pellmyr, O. 2002. *Plant-animal Interactions: an Evolutionary Approach*. Blackwell Publishing, Australia.
- Holloway, D. e Scheinmann, F. (1974). Two lignans from *Litsea grandis* and *L. gracilipes*. *Phytochemistry*. 13:1233-1236.
- Hopkins, W. G. *Introduction to plant physiology*. New York, John Wiley & Sons, 1995. 464 p.
- Irvine, F. R. 1961: in *Woody Plants of Ghana*, Oxford University Press, London. Jensen, S., Hansen, J. e Boll, P.M. 1993. *Phytochemistry*. 33:523-530.
- Kerkute, G. a. e Gilbert, L. I. 1984. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Regulation: digestion, nutrition, excretion. *Pergamon Press*, New York.
- Khush G.S. 1990. Genetics of and breeding for resistance to disease and insects of rice. In: *International Symposium on Molecular and Genetic Approaches to Plant Stress*. UNIDO, New Delhi, India.
- Klitzke, C. e Brown Jr., S. K. 2000. The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). *Chemoecology*. 10:99-102.
- Konno, C., Lu, Z-Z., Xue, Z-X., Erdelmeier, C. A. J., Meksuriyen, D., Che, C-T., Cordell, G. A., Soejoarto, D. D., Waller, D. P. e Fong, H. S. 1990. Furanoid lignans from *Larrea tridentate*. *Journal of Natural Products*. 53:396-406.

- Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D., Morandim, A. A., Bergamo, D. C., Cavaleiro, A., Bolzani, V., Furlan, M., Guimarães, E., Young, M. e Kato, M. J. 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal Product Natural*. 67:1783-1788.
- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, G. B e Catherine, C. 2004. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:279-281.
- Lanteri, A. A., Guedes, J. C. e Parra, J. R. P. 2002. Systematic, morphology and physiology weevils injurious for roots of citrus in São Paulo state, Brazil. *Neotropical Entomol*. 31:561-569.
- Li, N., Wu, Jian-Lin, Hasegawa, T., Sakai, Jun-Ichi., Wang, Li-Yan., Kakuta, S., Furuya, Y., Tomida, A., Tsuruo, T. e Ando, M. 2006. Bioactive Dibenzylbutyrolactone and Dibenzylbutanediol Lignans from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products*. 69:234-239.
- Lloyd, R. A., Miller, C. W., Roberts, D. L., Giles, J. A.; Dickerson, J. P., Nelson, N., H., Rix, C. E. e Ayers, P. H. 1976. Flue-cured tobacco flavor, In: Essence and essential oil components. *Tobacco Science*. 20:125-33.
- Lopes, X., Mujika, J. I., Blackburn, G. M. e Karplus, M. 2003. Alkaline hydrolysis of amide bonds: effects of bond twist and nitrogen pyramidalization. *Journal Physical. Chemistry*. 107:2304-2315.
- MacRae, W. D. e Towers, N. H. 1984. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 23:1207-1220.
- Malquichagua, S. K J. Delgado, P. G. E. Lluncor, L. R. Young, M. M. e Kato, M. J. 2005. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry*. 66:573-579.
- Marques, F. DE A., Mcelfresh. J. S. e Millar, J. G. 2000. Kovats retention indexes of monounsaturated C₁₂, C₁₄, and C₁₆ alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. *Journal Brazilian. Chemical Society*. 11:592-599.
- Martinez, A. T., Almendros, G., González-Vila, F. J. e Fründ, R. 1999. Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. *Solid State RMN*. 15:41-48.

- Martins, R. C. C., Lago, J. H.G., Albuquerque, S. e Kato, M. J., 2003. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. 64:667-670.
- Martins, R. C. C., Latorre, P. e Kato, M. J., 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. 55:843-846.
- Martins, R. C. C. 2002. Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. Dc. (Piperaceae). Tesa de doutorado, IQ-USP, São Paulo-SP.
- McEvoy, P. B. 2002. Insect-plant interactions on a planet of weeds. *Entomology. Exper. Et Applicata*. 104:165-179.
- Mcferren, A. M. e Rodrigues, E. 1998. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *J. Ethnopharm.* 60:183-187.
- McNaughton, S. J. 1983. Physiological Plant Ecology III: Responses to the Chemical and Biological Environment.
- Miranda, J. E., Navickiene, H. M. D., Nogueira-Couto, R. H., Bortoli, S. A., Kato, M. J., Bolzani, V. S. e Furlan, M. 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). *Apidology*. 34:409-415.
- Miyakado M, Nakayama I, Yoshioka H, Nakatani N. 1979. The Piperaceae amides I: Structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agric Biology Chemica*, 43:1609–1611.
- Miyazawa, M., 2001. Biotransformation of lignans and neolignans. *Current Organic Chemistry*. 5:975-986.
- Molyneux, Russell J., Campbell, Bruce C. e Dreyer, David L. 1990. Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products. *Journal of Chemical Ecology*, 16:1899-1906.
- Moreira., D. de L., Guimarães, E. F. e Kaplan, M. A. C., 1998. A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. 48:1075-1077.
- Moreira, M. A. B., Zarbin, P. R. G. e Coracini, M. D. A. 2005. Feromônios associados aos Coleópteros-praga de produtos armazenados. *Química Nova*. 28:472-477.
- Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M.J., Bolzani, V. S., Young, M. C., Cavalheiro, A. J. e Furlan, M. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 6:621-626.
- Nawrot, J. e Harmatha, J. 1994. Natural products as antifeedants against stored products insects. *Postharvest News and Information*. 5/2:17N-21N.

- Nihei, K., Konno, K., Bernardes, L. S. C., Lopes, N. P., Albuquerque, S., Carvalho, I., Pupo, M. T., Martins, R. C. C. e Kato, M. J. 2004. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. *Arkivoc* (vi) 112-126.
- Nishida, R. 1995. Sequestration of plant secondary compounds by butterflies and moths. *Chemoecology*. 6:127-138.
- Nishida, R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47:57-92.
- Nishida, R e Fukami, H. 1990. Sequestration of distasteful compounds by some pharmacophagous insects. *Journal of Chemical Ecology*. 16:151-64.
- Nordlund, D, A. e Lewis, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific e interspecific interactions. *Journal of chemical Ecology*. 2:211-220.
- Novotny, V., Miller, S. E., Cizek, L., Leps, J., Janda, M., Basset, Y., Weiblen, G. D. eDarrow, K. 2003. Colonising aliens: caterpillars (Lepidoptera) feeding on *Piper adundum* and *P. umbellatum* in rainforests of Papua New Guinea. *Ecol. Entomol.* 28:704-716.
- O'brien, C. W. e Wibmer, G. J. 1982. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu latu) of North America, Central America, and the West Indies (Coleoptera: Curculionoidea). *Mem. Amer. Entomol. Inst.* 34:1-382.
- Oliveira, J. R., e Filho, W. S. S. 1998. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento Trabalho apresentado no Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para oNordeste do Brasil, realizado na *Embrapa Semi-Árido*, Petrolina, PE,.
- Olsen, A. R., Clsen, A. R. e Olsen, O. 1995. Fundamentals of Microanalytical Entomology: A Practical Guide to Detecting and Identifying Filt. *Technology*. 41:320p.
- Olsen, Carl Erik; Tyagi, Om Dutt; Boll, Per M., Hussaini, F. A., Parmar, V. S., Sharma, N., Taneja, P. e Jain, S. C. 1993. An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactam B and D. *Phytochemistry*. 33: 518-20.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T. e Sticher, O. 1993. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medica*. 59:546-551.
- Panizzi, A. R. e Parra, J.R.P. 1991. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Manole Ltda, São Paulo, 359 p.

- Park, I. K., Lee, G. S., Shin, S., Park, J. e Ahn, J. Y. 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J. Agric. Food Chem.* 50:1866-1870.
- Parmar, V. S., 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*. 47:597-673.
- Passreiter, M. C., Wilson, J., Andersen, R. e Isman, B. M. 2004. Metabolism of thymol and trans-anethole in larvae of *Spodoptera litura* and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 52:2549-2551.
- Patil, S., Zucker, M. e Dimond, A. E. 1966. Biosynthesis of chlorogenic acid in potato roots resistant and susceptible to *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*. 56:971-4.
- Paula, V. F., Barbosa, L. C. D., Demuner, A. J., Pilo-Veloso, D., and, Picanço M. C. 2000. Synthesis and activity of new amide derivative of piperine. *Pest Manag. Sci.* 56:168-174.
- Penz, C. M. 1990. Interaction between *Papilio hectorides* (Papilionidae) and four host plants (Piperaceae, Ruteceae) in a southern Brazilian population. *J. Research on the Lepidoptera*. 29:161-171.
- Prasad, K. A., Tyagi, D. O., Wengel, J. e Boll, P. M. Lignans and neolignans from stems and fruits of *Piper wightii*. 1994. *Tetrahedron*. 50: 2231-40.
- Roussis, V., Ampofo, S. A. e Wiemer, D. F. 1990. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry*. 29:1787-1788.
- Sadik, G., Islam, R., Rahaman, M. M., Khondkar, P., Rashid, M. A. e Sarker, S.D. 2003. Antimicrobial and cytotoxic constituents of *Loranthus globosus*, *Fitorerapia*. 74:308-311.
- Sarkanen, K. V. e Walis, A. F., 1973. Oxidative dimerizations of (*E*) and (*Z*)-2,6-dimethoxy-4-propenylphenol. *J. C. S. Perkin I*. 1869-1875.
- Sartorelli, P. 2000. Biossíntese de neolignan benzofurânicas em *Piper regnellii* (Piperaceae). Tese de doutorado, IQ-USP, São Paulo-SP.
- Schneider, D., Boppré, M., Schneider, H., Thompson, W. R., Boriak, C. J., Petty, R. L. e Meinwald, J. 1975. A pheromone precursor and its uptake in male *Danaus* butterflies. *J. Comparative Physiol.* 97:245-256.
- Scott, L. M., Jensen, H., Scott, J. G., Isman, M.B., Arnason., J. T. e Philogene, B.J.R. 2003. Botanical insecticides for controlling agricultural Pests: Piperamides and the

- Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54:212-225.
- Scott, W.P. e G.H. McKibben. 1978. G.H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *J. Econ. Entomol.* 71 343-344.
- Shimomura, H., Sashida, Y. e Adachi, T. 1986. Phenolic glucosides from *Prunus grayana*. *Phytochemistry.* 26:249-51.
- Shoji, N., Umeyama, A., Saito, N., Takemoto, T., Kajiura, A. e Ohizumi, Y. 1986. Dehydropiperonaline, an amide possessing coronary vasodilating activity, isolated from *Piper longum* L. *Journal of pharmaceutical sciences.* 75:1188-1196.
- Siddiqui, S. B., Gulzar, T., Begum, S., Rasheed, M., Sattar, F. A. and, Afshan. F. 2003. Two new insecticidal Amides and a New Alcoholic amide from *Piper nigrum* Linn. *Helvetic Chimica Acta.* 86:2760-2767.
- Silva, A. M., Oliveira, A. e Kato, M. J. 2005. Caracterização de ligninas de *Piper solmsianum* por tioacidólise e CG-EM. 28^o Reunião da SBQ, Poços de Calda (MG), PN-159.
- Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Méda, C. I., Young, M. C. M. e Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry.* 59:521-527.
- Simas, N.K., E.C. Lima, S.R. Conceição, R.M. Kuster e F.A.M. Oliveira. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvívica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova.* 27: 46-49.
- Simpson *et al.*, 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature.* 406:151-157.
- Singer, M. 2000. Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: "preference", "acceptability" and "electivity". *Ecology Letters.* 3:159-162.
- Singh, R. P., Tomar, S. S., Attri, B. S., Parmar, B. S., Maheshwary, M. L. e Mukerjee, S. K. 1976. Search for new *Pyrethrum* synergists in some botanicals. *Pyrethrum Post.* 13:91-93
- Srivastava, S., Gupta, M. M., Prajapati, V., Tripathi, A. K. e Kumar, S. 2001. Sesamin a potent antifeedant principle from *P. mullesua*. *Phytotherapy. Research.* 15:70-72.
- Struble, D. L. e Arn, H. 1984. Combined gas chromatography electroantennographic recording insect olfactory responses, pp. 161-178, *in* H.E Hummel and T.A. Miller (eds.). *Techniques in Pheromone Research.* Springer-Verlag, Tokyo.

- Tanaka, T., Asai, F., Linuma, M., 1998. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. *Phytochemistry*. 49:229–232.
- Taylor, D. W. e Hickey, L. J. 1992. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. *Plant Systematic Evolution*. 180:137-156.
- Terreaux, C., Gupta, M. P. e Hostettmann, K. 1998. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*. 49:461-464.
- Trigo, J. R. 2000. The chemical of antipredator defence by secondary compounds in neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. *J. Braz. Chem. Soc.* 6:551-561.
- Tumlinson, J.H., Hardee, D.D., Guelder, R.C., Thompson, A.C., Hedin, P. A. e Minyard, J.P. 1969. Sex pheromones produced by the male boll weevil: isolation, identification and synthesis. *Science*. 166: 1010-1012.
- Umezawa, T. 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry*. 2:371:390.
- Urzua, A., Freyer, A. J. e Shamma, M. 1987. 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuranoid lignans. *Phytochemistry* . 26:1509-11.
- Veloza, L. S. M., Ferreira, M. J. P. Santos, M. I. S., Moreira, D. L. Emerenciano, V. P. e Kaplan, M. A. C. 2006. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*. 67:492-496.
- Vieira PC, De Alvarenga MA, Gottlieb OR e Gottlieb H. E. 1980. 4-Hexadecenylphenol and flavonoids from *Piper hispidum*. *Planta Medica*. 39:153–156.
- Vilela, E. F. e Lucia, T. M. C. 2001. Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ed. Holos, 2ª edição, Ribeira Preto 206 p.
- Visser, J. H. 1979. Electroantennogram responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* to plant volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 25:85–97.
- Vorogushin, Andrei V. Wulff, William D. Hansen e Hans-Juergen .2001. Convergent Synthesis of Fully Functionalized Ring C Allocolchicinoids. Benzannulation Approach. *Organic Letters*. 3:17-20.
- Ward, K. L., Hachshaw, A. e Clarke, R. T. 2003. Do food-plant preferences of modern families of phytopagous insects and mites reflects past evolution with plants. *Bio. J. of the Linnean Soc.* 78:51-83.
- Whitten, M. J. e Oakenshott, J. G. 1991. Opportunities for modern biotechnology in control of insect pests and weeds with special reference to developing countries. *FAO Plant Prot. Bull.* 39 :55–181.

- Wibmer, G. S. e O'Brien, C. W., 1986. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu latu) of South America (Coleoptera: Curculionidae). *Mem. Amer. Entomol. Inst.* 39:563-564.
- Wink, M., Grimm, C., Koschmiedr, C., Sporer, F. e Bergeot, O. 2000. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Chemoecology*. 10:179:184.
- Wood, D. L., Silverstein, R. M. e Nakajima, M. 1970. Control of Insect Behaviour by Natural Products. Academic Press, New York.
- Wu, Jian-lin, Li, Na., Hasegawa, T., Sakai, Jun-ichi., Mitsui, T., Ogura, H., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Tomida, A., Turuo, T., Li, M., Tang, W. e Ando, M. 2006. Bioactive Secolignans from *Peperomia dindygulensis*. *Journal of Natural Products*. 69:790-794.
- Yan, Y., Atsumi, M. Yuar, D. e Fujita, K. 2000. Synergistic effects of cyclodextrin-based binuclear complexes in the hydrolysis amide. *Tetrad. Letters*. 41:1825-1828.
- Yang. Y., Lee, S. G., Lee, H. K., Kim, M., Lee, S. H. e Lee, H. S. 2002. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *J. Agri. Food Chem.* 50,:3765-3767.