UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ADALBERTO MANOEL DA SILVA

**Metabolismo secundário e ligninas
de espécies de *Piper***

São Paulo

2008

ADALBERTO MANOEL DA SILVA

**Metabolismo secundário e ligninas
de espécies de *Piper***

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química Orgânica*

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
2008

Adalberto Manoel da Silva

Metabolismo secundário e ligninas de espécies de *Piper*

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química Orgânica.*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À minha família pelo amor, confiança e pelo incentivo.

À Vânia por ter estado ao meu lado grande parte desta vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais Clécio, Joca, Homero, Juliana, Lucas, Felipe, Anderson, Camila, Karina, Lydia, Giovana, Renata, Marisi, Edgard, Joyce, Mariko, João, Roberto, Hiléia, Ari, Cristina pelo agradável convívio e amizade durante esses anos.

Aos colegas do Instituto de Química, Marcus Túlius, Ingrid, Sabrina, Denise, Marcus Enoque.

Aos amigos, Claudinei, Alberto, Denise, Max, Francisco, Artermir, Graciela, Acácio, Marcelo, João, Clayton, Edson, Aline, Ednardo, Jorge e Júlio pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos de São Miguel que me incentivaram.

Aos meus colegas de trabalho e diretores da empresa Atina S/A, Cristina e Eduardo pelo incentivo.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo por toda informação e paciência.

Aos funcionários da Central Analítica do IQ pelas análises realizadas.

À CNPQ e CAPES pelas bolsas de estudos concedidas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FAMÍLIA PIPERACEAE E O GÊNERO <i>PIPER</i>	4
1.2. A ESPÉCIE <i>PIPER RICHARDIAEFOLIUM</i> KUNTH	10
1.3. LIGNINAS	12
2. OBJETIVOS	19
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1. Materiais e equipamentos	20
3.2. ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>PIPER RICHARDIAEFOLIUM</i>	22
3.2.1. Coleta do material vegetal.....	22
3.2.2. Obtenção dos extratos	22
3.2.3. Eliminação da clorofila	22
3.2.4. Fracionamento cromatográfico das folhas de <i>Piper richardiaefolium</i>	23
3.2.5. Fracionamento cromatográfico dos frutos de <i>Piper richardiaefolium</i>	27
3.2.6. Análise via CLAE.....	29
3.2.7. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos compostos identificados em <i>Piper richardiaefolium</i> (Piperaceae)	30
3.3. ANÁLISE DO ÓLEO VOLÁTIL DAS FOLHAS DE <i>PIPER RICHARDIAEFOLIUM</i>	36
3.3.1. Extração do óleo volátil	36
3.3.2. Análise do óleo volátil.....	36

3.4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PIPERACEAE.....	37
3.5. ESTUDO DE LIGNINA DE <i>PIPER</i>	42
3.5.1. Coleta do material vegetal.....	Erro! Indicador não definido.
3.5.2. Processamento do material vegetal	43
3.5.3. Extração e isolamento de ligninas dos caules de <i>Piper</i>	44
3.5.4. Extração de ligninas insolúveis de Klason	44
3.5.5. Extração de ligninas solúveis de Björkman	46
3.5.6. Acetilação de ligninas.....	48
3.5.7. Oxidação por nitrobenzeno	48
3.5.8. Análise elementar.....	49
3.5.9. Determinação do conteúdo de metoxilas	49
3.5.10. Determinação da fórmula mínima	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. ESTUDO QUÍMICO DE <i>PIPER RICHARDIAEFOLIUM</i>	52
4.1.1. Estudo químico das folhas e dos frutos de <i>Piper richardiaefolium</i>	52
4.1.1.1. Lignanas furofurânicas	54
4.1.1.2. Lignanas dibenzilbutirolactônicas	62
4.1.1.3. Lignanas dibenzilbutirolactólicas	73
4.1.1.4. Cinamatos de bornila	80
4.1.1.5. Amidas.....	90
4.2. Óleos voláteis das folhas de <i>Piper richardiaefolium</i>	97
4.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PIPERACEAE.....	100
4.4. ESTUDO DE LIGNINAS.....	103

4.4.1. Determinação quantitativa.....	103
4.4.1.1. Determinação quantitativa de lignina de Klason.....	103
4.4.1.2. Determinação quantitativa de lignina de Björkman.....	104
4.2.1.3. Determinação quantitativa de lignina por oxidação por nitrobenzeno	106
4.2.1.4. Análise elementar, determinação do conteúdo de metoxilas e determinação da fórmula mínima.	108
4.4.2. Determinação qualitativa.....	109
4.2.2.1. Análise de lignina isolada pelo método de Bjorkman por espectroscopia na região do infravermelho	110
4.2.2.2. Análise de lignina isolada pelo método de Bjorkman e acetilada, por espectroscopia na região do infravermelho	112
4.2.2.3. Análise das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA e PCEA por RMN de ¹ H.	120
4.2.2.4. Análise de madeira moída e de lignina por RMN de ¹³ C no estado sólido (CP-MAS) e de lignina acetilada por RMN de ¹³ C em solução, de <i>P.</i> <i>regnellii</i>	126
4.5. ANÁLISE BIOSSINTÉTICA	131
4.5.1. Biossíntese de lignanas	131
4.5.2. Biossíntese de ligninas.....	134
4.5.3. Biossíntese de lignanas x ligninas.....	137
5. CONCLUSÃO.....	139
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
7. CURRÍCULUM VITAE.....	151

RESUMO

Silva, A.M. **Metabolismo secundário e ligninas de espécies de *Piper***. 2008. 152p.
Tese - Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O estudo químico das folhas e dos frutos de *P. richardiaefolium* resultou no isolamento de oito lignanas, sendo duas lignanas furofurânicas (sesamina e kobusina), quatro lignanas dibenzilbutirolactônicas (hinokinina, kusunokinina, arctigenina e haplomirfolina), duas lignanas dibenzilbutirolactólicas (cubebina e 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina), dois cinamatos de bornila (ferulato de bornila e cumarato de bornila) e na identificação de duas amidas (piplartina e diidropiplartina). Das folhas de *P. richardiaefolium* foi extraído e analisado o óleo volátil. As estruturas das substâncias isoladas foram identificadas através de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas). O estudo de análise de componentes principais (PCA) das espécies *Piper* (*P. truncatum* - k 616, *P. richardiaefolium* - k 290, *P. richardiaefolium* - k 350, *P. richardiaefolium* - k 593, *P. truncatum* - k 597, *P. pseudopotifolium* - k 598, *P. richardiaefolium* - k 854, *P. richardiaefolium* - k 610, *P. truncatum* - k 112, *P. pseudopotifolium* - k 211 e *P. cernuum* - k 137) permitiu agrupar as espécies em dois grandes grupos e quatro subgrupos em relação à similaridade entre elas.

Ligninas do caule de seis espécies de *Piper* foram extraídas utilizando o método de degradação de Klason e método de Bjorkman, e analisadas por métodos espectroscópicos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C). O método de degradação por oxidação por nitrobenzeno foi o escolhido para determinar a relação entre os monolignóis siringila e guaiacila.

Os principais metabólitos das espécies estudadas foram comparados com os tipos de ligninas das mesmas espécies e os resultados sugeriram uma independência entre as vias biossintéticas de ligninas e lignanas.

Palavras-chave: Piperaceae, lignanas, *Piper*, ligninas, *Piper richardiaefolium*, metabólitos secundários, siringila, guaiacila.

ABSTRACT

Silva, A. M. **Secondary metabolites and lignins from *Piper* species**. 2008. 152p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The chemical study of leaves and the fruits of *P. richardiaefolium* resulted in the isolation of eight lignans, being two furofurânicos lignans (sesamin and kobusin), four dibenzylbutirolactonics lignans (hinokinin, kusunokinin, arctigenin and haplomirfolin), two dibenzylbutirolactolics lignans (cubebin and 3',4'-dimethoxy-3,4-desmethylenedioxycubebin), two cinnamates (bornyl ferulate and bornyl cumarate) and in the identification of two amides (piplartine and dihydropiplartine). Of leaves of *P. richardiaefolium* was extracted and analyzed the volatile oil. The structures of isolated substances had been identified using the spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR) and mass spectrometry. The study of principal components analysis (PCA) of the species *Piper* (*P. truncatum* - k 616, *P. richardiaefolium* - k 290, *P. richardiaefolium* - k 350, *P. richardiaefolium* - k 593, *P. truncatum* - k 597, *P. pseudopotifolium* - k 598, *P. richardiaefolium* - k 854, *P. richardiaefolium* - k 610, *P. truncatum* - k 112, *P. pseudopotifolium* - k 211 and *P. cernuum* - k 137) allowed the separation in two groups and four sub-groups.

Lignins of stem of six species of *Piper* had been extracted using the method of degradation of Klason and method of Bjorkman, and analyzed for spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR). The degradation method by nitrobenzene oxidation was chosen to determine the relationship between monolignols syringil and guaiacyl moieties.

The major metabolites of the *Piper* species were compared to the lignins types of the same species and the results suggested independence between the biosynthetic pathways of lignins and lignans.

Keywords: Piperaceae, lignans, *Piper*, lignins, *Piper richardiaefolium*, secondary metabolites, syringil, guaiacyl.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Diagrama de Dahlgren.	3
Figura 1.2	<i>Piper richadiaefolium</i> Kunth.	10
Figura 1.3	Origem das unidades monoméricas formadoras de ligninas.	13
Figura 1.4	Formação da lignina a partir de precursores monoméricos.	14
Figura 1.5	Principais tipos de ligações entre as unidades monoméricas guaiacílicas formadoras de lignina.	15
Figura 1.6	Representação parcial de uma lignina de madeira macia (“softwood”).	16
Figura 3.1	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato das folhas de <i>P. richadiaefolium</i> .	23
Figura 3.2	Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração B obtida após tratamento com celite do extrato das folhas de <i>P. richadiaefolium</i> .	24
Figura 3.3	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo 2.	25
Figura 3.4	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo 4.	26
Figura 3.5	Fluxograma do fracionamento cromatográfico dos grupos 5 e 6.	26
Figura 3.6	Fluxograma do fracionamento cromatográfico dos frutos de <i>P. richadiaefolium</i> .	27
Figura 3.7	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo A.	28
Figura 3.8	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo B.	28
Figura 3.9	Cromatograma, obtido por CG, da série homóloga de alcanos hidrocarbonetos.	36
Figura 3.10	Espectro de RMN de ^1H de <i>Piper richardiaefolium</i> (k-290).	40
Figura 3.11	Exemplo de redução dos dados de um espectro de RMN de ^1H em regiões espectrais de mesmo tamanho (ppm) e os valores respectivos das integrais de cada região.	40

Figura 3.12	Espectro de RMN de ^1H de <i>P. truncatum</i> (k 616) (A), <i>P. pseudopothifolium</i> (k 598) (B), <i>P. pseudopothifolium</i> (k 211) (C), <i>P. truncatum</i> (k 112) (D), <i>P. truncatum</i> (k 597) (E), <i>P. cernuum</i> (k 137) (F).	41
Figura 3.13	Espécies escolhidas para o estudo.	42
Figura 3.14	Fluxograma do estudo das ligninas de espécies de Piperaceae.	43
Figura 3.15	Procedimento de extração das ligninas de Klason	45
Figura 3.16	Procedimento de extração das ligninas de Bjorkman.	47
Figura 4.1	Cromatograma obtido por CLAE das folhas de <i>Piper richardiaefolium</i> .	52
Figura 4.2	Cromatograma obtido por CLAE das frutos de <i>Piper richardiaefolium</i> .	53
Figura 4.3	Cromatograma obtidos por CLAE das lignanas furofurânicas sesamina (1) e kobusina (2).	57
Figura 4.4	Espectro de RMN de ^1H da sesamina (1) 200 MHz, CDCl_3 .	60
Figura 4.5	Espectro de RMN de ^{13}C da sesamina (1) 50 MHz, CDCl_3 .	60
Figura 4.6	Espectro de RMN de ^1H da kobusina (2) 200 MHz, CDCl_3 .	61
Figura 4.7	Espectro de RMN de ^{13}C da kobusina (2) 50 MHz, CDCl_3 .	61
Figura 4.8	Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos hinokinina (3), kusunokinina (4), arctigenina (5) e haplomirfolina (8).	65
Figura 4.9	Espectro de RMN de ^1H da hinokinina (3) 200 MHz, CDCl_3 .	68
Figura 4.10	Espectro de RMN de ^{13}C da hinokinina (3) 50 MHz, CDCl_3 .	68
Figura 4.11	Espectro de RMN de ^1H da kusunokinina (4) 200 MHz, CDCl_3 .	69
Figura 4.12	Espectro de RMN de ^{13}C da kusunokinina (4) 50 MHz, CDCl_3 .	69
Figura 4.13	Espectro de RMN de ^1H da arctigenina (5) 200 MHz, CDCl_3 .	70
Figura 4.14	Espectro de RMN de ^{13}C da arctigenina (5) 50 MHz, CDCl_3 .	70
Figura 4.15	Espectro de RMN de ^{13}C da haplomirfolina (8) 200 MHz, CDCl_3 .	71
Figura 4.16	Espectro de RMN de ^{13}C da haplomirfolina (8) 50 MHz, CDCl_3 .	71

Figura 4.17	Espectro de massas (EI) da haplomirfolina (8).	72
Figura 4.18	Interpretação do espectro de massas da haplomirfolina (8).	72
Figura 4.19	Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos cubebina (6) e 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina.	75
Figura 4.20	Espectro de RMN de ^1H da cubebina (6) 200 MHz, CDCl_3 .	78
Figura 4.21	Espectro de RMN de ^{13}C da cubebina (6) 50 MHz, CDCl_3 .	78
Figura 4.22	Espectro de RMN de ^1H da 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina (7) 200 MHz, CDCl_3 .	79
Figura 4.23	Espectro de RMN de ^{13}C da 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina (7) 50 MHz, CDCl_3 .	79
Figura 4.24	Cromatogramas, obtidos por CLAE, do ferulato de bornila (9) e cumarato de bornila (10).	83
Figura 4.25	Espectro de RMN de ^1H do ferulato de bornila (9) 200 MHz, CDCl_3 .	86
Figura 4.26	Espectro de RMN de ^{13}C do ferulato de bornila (9) 50 MHz, CDCl_3 .	86
Figura 4.27	Espectro de RMN de ^1H do cumarato de bornila (10) 200 MHz, CDCl_3 .	87
Figura 4.28	Espectro de RMN de ^{13}C do cumarato de bornila (10) 50 MHz, CDCl_3 .	87
Figura 4.29	Espectro de massas do ferulato de bornila (9).	88
Figura 4.30	Espectro de massas (EI) do cumarato de bornila (10).	88
Figura 4.31	Interpretação dos espectros de massas do ferulato de bornila (9) e do cumarato de bornila (10).	89
Figura 4.32	Cromatogramas obtidos por CLAE da piplartina (11) e diidropiplartina (12).	92
Figura 4.33	Espectro de RMN de ^1H da piplartina (11) e diidropiplartina (12) 200 MHz, CDCl_3 .	94
Figura 4.34	Espectro de RMN de ^{13}C da piplartina (11) e diidropiplartina (12) 50 MHz, CDCl_3 .	94
Figura 4.35	Espectro de massas (EI) da piplartina (11).	95

Figura 4.36	Espectro de massas (EI) da diidropiplartina (12).	95
Figura 4.37	Interpretação do espectro de massas da piplartina (11).	96
Figura 4.38	Cromatograma do óleo das folhas de <i>Piper richadiaefolium</i> A e ampliação B .	98
Figura 4.39	Diagrama de similaridade (dendrograma) da análise de “cluster” para as 20 amostras de extratos de espécies de <i>Piper</i> .	101
Figura 4.40	Distribuição dos deslocamentos químicos das amostras.	101
Figura 4.41	Diagrama de similaridade (dendrograma) da análise de “cluster” para as onze amostras.	102
Figura 4.42	Gráfico de “scores” da amostras de <i>Piper</i> .	102
Figura 4.43	Foto do pó do caule de uma das espécies de <i>piper</i> livre de extrativos e da lignina isolada pelo método de Bjorkman.	105
Figura 4.44	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. regnellii</i> .	114
Figura 4.45	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. solmsianum</i> .	115
Figura 4.46	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. aduncum</i> .	116
Figura 4.47	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. richardiaefoluim</i> .	117
Figura 4.48	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. cernuum</i> .	118
Figura 4.49	Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da <i>P. mallacophylum</i> .	119
Figura 4.50	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PRE, em DMSO.	122
Figura 4.51	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PREA, em CDCl_3 .	123

Figura 4.52	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PSOA, em CDCl_3 .	123
Figura 4.53	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PRIA, em CDCl_3 .	124
Figura 4.54	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PCEA, em CDCl_3 .	124
Figura 4.55	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PADA, em CDCl_3 .	125
Figura 4.56	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PMAA, em CDCl_3 .	125
Figura 4.57	Espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido da madeira moída de <i>P. regnellii</i> (75MHz).	130
Figura 4.58	Espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido da lignina de <i>P. regnellii</i> (75MHz).	130
Figura 4.59	Espectro de RMN de ^{13}C em solução da lignina acetilada de <i>P. regnellii</i> (PREA), CDCl_3 (50 MHz).	130
Figura 4.60	Rota biossintética das lignanas isoladas das folhas e frutos de <i>P. richadiaefolium</i> .	133
Figura 4.61	Ressonância dos monolignóis iniciada por peroxidases e lacases	134
Figura 4.62	Rota biossintética dos monolignóis precursores da lignina.	136
Figura 4.63	Relação biossintética dos monolignóis precursores de metabólitos secundários e de lignina.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Substâncias isoladas em algumas espécies de Piperaceae.	5
Tabela 3.1	Espécies de <i>Piper</i> analisadas.	39
Tabela 4.1	Identificação das substâncias obtidas por CLAE das folhas e dos frutos de <i>P. richadiaefolium</i> .	53
Tabela 4.2	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas sesamina (1) e kobusina (2) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).	58
Tabela 4.3	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas sesamina (1) e kobusina (2) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 50 MHz).	59
Tabela 4.4	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas hinokinina (3), kusunokinina (4), arctigenina (5) e haplomirfolina (8) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).	66
Tabela 4.5	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas hinokinina (3), kusunokinina (4), arctigenina (5) e haplomirfolina (8) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 50 MHz).	67
Tabela 4.6	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas cubebina (6), 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina (7) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).	76
Tabela 4.7	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas cubebina (6), 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina (7) isoladas de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 50 MHz).	77
Tabela 4.8	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H do ferulato de bornila (9) e do cumarato de bornila (10) isolados de <i>P. richadiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz)	84

Tabela 4.9	Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C do ferulato de bornila (9) e do cumarato de bornila (10) isolados de <i>P. richardiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 50 MHz).	85
Tabela 4.10	Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H da mistura das amidas piplartina (11) e diidropiplartina (12) de <i>P. richardiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).	92
Tabela 4.11	Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da mistura das amidas piplartina (11) e diidropiplartina (12) de <i>P. richardiaefolium</i> (CDCl_3 , δ , 50 MHz).	93
Tabela 4.12	Substâncias identificadas no óleo volátil de <i>P. richardiaefolium</i> .	99
Tabela 4.13	Massa e rendimento do resíduo obtido do caule das espécies estudadas utilizando o método de Klason.	104
Tabela 4.14	Massa e rendimento do resíduo obtido do caule das espécies estudadas utilizando o método de Bjorkman.	105
Tabela 4.15	Relação entre os monômeros siringil (S) e guaiacil (G) por oxidação por nitrobenzeno.	107
Tabela 4.16	Dados analíticos e fórmula mínima por unidade C_9 para as ligninas em espécies de <i>Piper</i> .	109
Tabela 4.17	Atribuições dos sinais nos espectros no IV das ligninas originais PRE, PSO, PAD, PRI, PCE e PMA.	111
Tabela 4.18	Atribuições dos sinais dos espectros no IV das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA.	113
Tabela 4.19	Atribuições dos sinais de RMN de ^1H das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA.	122
Tabela 4.20	Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C das ligninas originais (PRE) no estado sólido (CP-MAS) e das ligninas acetiladas em solução (PREA).	129

LISTA DE ABREVIATURAS

IV	Infravermelho
CG	Cromatografia gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
CEAE	Cromatografia por exclusão de alta eficiência
PCA	Análise de componentes principais
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
DMSO	Dimetilsulfoxido
PREA	<i>Piper regnellii</i> acetilada
PRE	<i>Piper regnellii</i>
PSO	<i>Piper solmsianum</i>
PSOA	<i>Piper solmsianum</i> acetilada
PAD	<i>Piper aducum</i>
PADA	<i>Piper aducum</i> acetilada
PRI	<i>Piper richardiaefolium</i>
PRIA	<i>Piper richardiaefolium</i> acetilada
PCE	<i>Piper cernuum</i>
PCEA	<i>Piper cernuum</i> acetilada
PMA	<i>Piper malacophyllum</i>
PMAA	<i>Piper malacophyllum</i> acetilada
CP-MAS	Cross-polarization/magic angle spinning
PAL	Phenylalanine-ammonia-lyase

1. Introdução

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo tem sido dividido em primário e secundário.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e transporte de solutos e possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos lipídeos, carboidratos e da clorofila. Os metabólitos primários são aqueles formadores de matéria prima e de energia para metabólitos secundários (Luckner, 1990, Mann, 1994, Gottlieb, 1972). Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não seriam necessários para todas as plantas. No entanto, este metabolismo desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente.

Os metabólitos secundários são produzidos a partir de poucos intermediários-chave provenientes do metabolismo primário, destacando-se o acetato, piruvato, alguns açúcares (p. ex. eritrose e fosfato de metileritriol), aminoácidos, entre outros. Os metabólitos secundários assim originados têm sido prioritariamente classificados de acordo com as vias biossintéticas, mas podem ser agrupados em policetídeos, alcalóides, compostos fenólicos e isoprenóides.

Entre os mais importantes metabólitos secundários vegetal citam-se tradicionalmente os alcalóides, os terpenóides e talvez ainda os flavonóides. Ficou claro apenas em época recente que os lignóides também ocupam um lugar de destaque, pois são de utilidade não só para as plantas que os produzem como para

o homem que os extrai ou sintetiza. Com respeito às plantas terrestres, fitoquímica comparada evidencia que lignóides podem servir como marcadores do processo evolutivo, tornando-se razoável supor que desempenham um papel em adaptação ecológica. Não surpreende assim a descoberta hoje bem documentada, que lignanas são acumuladas em madeira como resposta a ferimento mecânico ou a invasão fúngica ou bacteriana. Há, outrossim, evidência concreta que inoculação por microorganismos produz um aumento da atividade de peroxidase e de polifenoloxidase de folhas. Este fato foi evidenciado para o caso da ferrugem do café. Pode se esperar em consequência, um incremento da biossíntese de lignanas e de ligninas, o que, se comprovado, consubstanciaria a hipótese de que também estas últimas integram o sistema de defesa vegetal contra seus predadores (Gottlieb, 1988).

As lignanas, como as ligninas, têm sua biossíntese estribada em álcoois cinamílicos. Como visto, lignanas acompanham ligninas em todas as plantas vasculares, Pteridophyta, Gymnospermae e Angiospermae. Este fato fica patente mesmo examinando apenas a distribuição daquela minúscula fração de moléculas lignânicas que possui atividade biológica comprovada e encontra-se amplamente documentado. Já neolignanas são de ocorrência muito mais restrita. A maior parte das neolignanas de atividade biológica comprovada se encontra nos táxons aparentados Magnoliiflorae e Piperales da divisão Angiospermae, *sensu* Dahlgren (Figura 1.1) (Gottlieb, 1988, Dahlgren, 1985).

Figura 1.1. Diagrama de Dahlgren (Dahlgren, 1985).

1.1. A família Piperaceae e o gênero *Piper*

A família botânica Piperaceae é tida como uma das mais primitivas dentre as Angiospermae, segundo Taylor e Hickey (1992) que a consideram como um “fóssil vegetal”. É composta por aproximadamente 14 gêneros e cerca de 2000 espécies (Mabberley, 1997), sendo registradas em regiões subtropicais e tropicais incluindo a região Amazônica, encontrando-se plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo com mais de três metros de altura (Figueiredo e Sazima, 2000; Albiero *et al.*, 2005).

Desta família, os gêneros *Piper* e *Peperomia* são os mais diversos com aproximadamente 1500 e 2000 espécies para *Piper* (Quijano-Abril *et al.*, 2006) e *Peperomia* (Wanke *et al.*, 2007). Espécies desses gêneros são as mais estudadas quimicamente.

Algumas espécies de *Piper* são usadas na medicina tradicional no tratamento de doenças, enquanto as espécies do gênero *Peperomia* são usadas principalmente como ornamentais (Santos *et al.*, 2001).

A família Piperaceae apresenta metabólitos secundários que se caracterizam por serem oriundos de biossíntese mista (chiquimato/acetato), resultando na produção de amidas ou de compostos aromáticos essencialmente fenilpropanoídicos do tipo lignanas, neolignanas, terpenos e flavonóides (Gottlieb *et al.*, 1995a, Parmar *et al.*, 1997, Moreira *et al.*, 1998).

Muitos desses metabólitos secundários apresentam atividades biológicas, a citar a guineensina, um alcalóide/amida isolado de plantas do gênero *Piper*, exibiu atividade larvícida em *Culex pipiens pallens*, *A. aegypti* e *A. togoi*. Estudos da relação estrutura-atividade indicam que o grupo *N*-isobutilamina é fundamental para a atividade larvícida, enquanto que o grupo metilenedioxifenila parece não ser essencial para a toxicidade (Park *et al.*, 2002).

A tabela 1.1 mostra algumas substâncias isoladas de espécies de Piperaceae.

Tabela 1.1. Substâncias isoladas em algumas espécies de Piperaceae.

Substância	Espécie	Atividade biológica	Referência Bibliográfica
<p>piperina</p>	<p><i>P. tuberculatum</i></p> <p><i>P. nigrum</i></p>	antifúngica; usada no tratamento do vitiligo	(Lin <i>et al.</i> , 1999); (Navickiene <i>et al.</i> , 2000)
<p>grandisina</p>	<i>P. solmsianum</i>	Tóxica para <i>Trypanosoma cruzi</i>	(Martins <i>et al.</i> , 2003)
<p>puberelina A</p>	<i>P. puberulum</i>	inibição plaquetária	(Zhang <i>et al.</i> , 1995)
<p>4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil) benzoato de metila</p>	<i>P. guanacastensis</i>	inseticida contra <i>Aedes atropalpus</i>	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1997
<p>sakuranetina</p>	<p><i>P. crassinervium</i></p> <p><i>P. lhotzkyanum</i></p>	antifúngica	(Danelutte <i>et al.</i> , 2003); (Moreira <i>et al.</i> , 2000)

<i>P. betle</i>	inibe a agregação plaquetária	(Saeed <i>et al.</i> , 1993)
ácido ursólico
<i>P. methysticum</i>	efeito antagônico sobre a estircina	(Kretzschmar <i>et al.</i> , 1970)
metisticina
<i>P. elongatum</i>	contra <i>Leishmania braziliensis</i>	(Hermoso <i>et al.</i> , 2003)
2',6'-diidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona,
<i>P. auritum</i>	_____	(Ampofo <i>et al.</i> , 1987);
a. R ₁ = OH R ₂ = OCH ₃			(Parmar <i>et al.</i> , 1993)
b. R ₁ = H R ₂ = H	<i>P. falconeri</i>		
a. 7,4'-dimetoxi-5,3'-diidroxiflavona			
b. tectocrisina			

O gênero *Piper* começou a ser estudado em 1819 quando foi isolado a piperina, um princípio pungente de *Piper nigrum* (Lee *et al.*, 1984), uma trepadeira originária da Ásia tropical. As espécies do gênero *Piper*, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, são usadas medicinalmente para fins diversos. As espécies do gênero *Piper* apresentam uma alta importância comercial e econômica por serem pimentas usadas, mundialmente, como temperos picantes. (Parmar *et al.*, 1997).

O interesse pela química desse gênero evoluiu bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies deste gênero têm sido bem investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Tais espécies são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas (Silva e Machado, 1999).

A *P. chaba* apresentam em suas raízes e frutos numerosas aplicações na medicina. Em particular elas são úteis no tratamento da asma, bronquite, febre, dor abdominal, como estimulante e nas afecções hemorroidais. *P. brachystachyum* apresenta propriedades inseticidas, já *P. futokadsura* é uma planta medicinal que cresce em províncias de Taiwan. O caule de *P. futokadsura*, conhecido como *haifengteng*, é amplamente usado na medicina natural da China indicado para o tratamento da asma e artrites. O extrato benzênico de suas folhas apresentou atividade tóxica contra a larva de *Spodoptera litura* F. (Parmar *et al.*, 1997).

Em estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Piper*, verificou-se a presença de várias classes de metabólitos secundários. Os compostos isolados de diferentes espécies pertencem às diversas classes de compostos: alcalóides/amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, cavapironas, piperolidas, chalconas e dihidrochalconas, flavonas, flavanonas,

cromenos, derivados de ácidos benzóicos (Jensen *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1997; Lago *et al.*, 2004; Kato e Furlan, 2007). Representantes dessas classes apresentaram atividades farmacológicas comprovadas como: antimicrobiana, moluscicida, fungicida, inseticida, antiinflamatória, larvicida, antioxidante (Isao, 1984; Baldoqui *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2003; Lago *et al.*, 2004).

Dentre estes, os alcalóides/amidas apresentam vários compostos farmacologicamente ativos.

Pipericida, isolada de *P. nigrum*, apresentou atividade inseticida contra *Callosobruchus chinensis*. (2*E*,8*E*)-*N*-9-(3,4-metilenedioxifenil)nonadienoilpiperidina, também isolada de *P. nigrum*, causou dilatação do coração de coelhos (Parmar *et al.*, 1997).

A amida *N*-[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(*Z*),4(*Z*)-heptadienoil]pirrolidina, isolada da *P. hispidum* apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* (Alécio *et al.*, 1998).

A piplartina, também alcalóide/amida isolada de espécies do gênero *Piper*, apresentou potente atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais carcinoma nasofaringe, leucemia linfocítica, carcinoma de pulmão e carcinoma de colo (Duh *et al.*, 1990; Duh e Wu, 1990). Recentemente, a piplartina tem sido estudada quanto a sua atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002) e quanto ao efeito antidepressivo e ansiolítico em ratos (Felipe *et al.*, 2007).

Da *P. aduncum*, utilizada popularmente como repelente de insetos, analgésicos para dores estomacais e também em banhos aromáticos (Asprey e Thorton, 1954) foi isolado a aduncamida, outro alcalóide/amida, que apresentou atividade bacteriana para *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*. Este também

apresentou atividade citotóxica para células de carcinoma nasofaríngeo (Orjala *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1997).

Entre as lignanas, a (-)-hinokinina, uma lignana dibenzilbutirolactônica, exibiu uma significativa atividade tripanomicida *in vitro* e *in vivo*. Esta lignana apresentou também atividade antioxidante (Medola *et al.*, 2007). Uma atividade bacteriostática e fungicida pôde ser observada também pela (-)-hinokinina, (-)-cubebina e derivados semi-sintéticos (Silva *et al.*, 2007).

pipericida

(2E,8E)-N-9-(3,4-metilenedioxifenil)nonadienoilpiperidina

N-[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(Z),4(Z)-heptadienoil]pirrolidina

piplartina

aduncamida

(-)-hinokinina

(-)-cubebina

1.2. A espécie *Piper richardiaefolium* Kunth

A espécie *Piper richardiaefolium* Kunth pertence ao gênero *Piper* da família Piperaceae e trata-se de um arbusto entre 1 a 3 m de altura (Figura 1.2). Ocorre em matas de luz difusa, semi-paludosas, podendo também ocorrer em capoeiras ou matas de encostas e restingas. Suas folhas são alongadas e assimétricas, contendo de 5 a 10 cm de largura por 15 a 25 cm de comprimento.

Esta espécie foi identificada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

Não existe na literatura o relato de um estudo fitoquímico dos extratos desta espécie.

Figura 1.2. *Piper richardiaefolium* Kunth.

O quadro abaixo mostra a classificação botânica da espécie *Piper richardiaefolium* Kunth, de acordo com o Sistema de Angiospermas de Cronquist (1981).

Quadro 1: Classificação botânica de espécie *Piper richardiaefolium* Kunth.

Reino	Plantae
Divisão	Angiospermae A. (Magnoliophyta)
Classe	Dicotyledoneae DC (Magnoliopsida)
Subclasse	Magnoliidae
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae Agardth.
Gênero	<i>Piper</i>
Espécie	<i>Piper richardiaefolium</i> Kunth

1.3. Ligninas

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Foi introduzida por Shultz, em 1857, para designar o material que constitui-se no segundo mais abundante do reino vegetal. As ligninas só não estão presentes em vegetais primitivos como fungos, algas e líquens (Piló-Veloso *et al.*, 1993).

Em estudos realizados há aproximadamente 150 anos, foi possível verificar o interesse científico e econômico sobre a lignina, concluindo-se que a lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais (Saliba *et al.*, 2001; Grisebach, 1981).

Este complexo polimérico de fenilpropanóide localiza-se na parede celular de tecidos de suporte e condutores tais como elementos vasculares e fibras de floemas, conferindo a hidrofobicidade e resistência mecânica além de barreira contra infecções de patógenos (Vance *et al.*, 1980; Lewis e Yamamoto, 1990). Os tratamentos químicos necessários para remover a lignina durante o processo de polpação do papel são severos e dispendiosos consumindo grande quantidade de energia, sendo também ambientalmente hostil (Boudet e Grima-Pettenati, 1996; Whetten e Sederoff, 1991).

A lignina é biosintetizada pela polimerização enzimática dos álcoois 4-hidroxicinâmico, 4-hidroxi-3-metoxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinâmico sendo estes precursores das unidades fenilpropanóides *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente, ligadas por ligações C–C e ligações éteres (Figura 1.3) (Ralph *et al.*, 1998; Baucher *et al.*, 2003).

Figura 1.3. Origem das unidades monoméricas formadoras de ligninas.

O processo de lignificação inicia-se no citoplasma da célula vegetal, onde a unidade monomérica liga-se a uma enzima glicosil-transferase e atravessa a membrana plasmática sendo liberada pela enzima β -glicosidase. Desta forma, esta unidade monomérica se liga a outra unidade num acoplamento oxidativo sob a ação de uma enzima peroxidase (Figura 1.4) (Abreu *et al.*, 1999, Yamauchi *et al.*, 2003).

Figura 1.4. Formação da lignina a partir de precursores monoméricos.

Os acoplamentos oxidativos ocorrentes entre os monômeros vão dar origem às mais variadas formas de esqueletos básicos, como: 8-O-4', 5-5', 5-O-4', 8-8', 8-1', 8-5', 3-O-4', 7-1', 1-5' e 2-O-3' (Figura 1.5) (Higuchi, 1990; Campbell e Sederoff, 1996; Ralph *et al.*, 1998; Boerjan *et al.*, 2003).

As variações na estrutura da lignina e na composição monomérica, dependente da espécie da planta, origem citológica, condições do crescimento, e estágio do desenvolvimento, foram reconhecidas e descritas como a heterogeneidade da lignina (Fengel e Wegener, 1984; Aloni *et al.*, 1990; Campbell e Sederoff, 1996).

Figura 1.5. Principais tipos de ligações entre as unidades monoméricas guaiacílicas formadoras de lignina (Boerjan *et al.*, 2003).

A mais complexa lignina é do tipo HGS e são tipicamente de gramíneas, enquanto ligninas do tipo GS são encontradas em angiospermas ou madeira dura (“hardwood”) e ligninas do tipo G são características de gimnospermas ou madeira mole (“softwood”) (Figura 1.6) (Baucher *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2001).

Figura 1.6. Representação parcial de uma lignina de madeira macia (“softwood”) (Brunow, 1993).

A redução da quantidade ou a mudança da qualidade da lignina em árvores poderá trazer benefícios econômicos e ambientais. Também, o decréscimo da lignina em forrageiras facilitará a digestibilidade para ruminantes (Akin e Chesson, 1989).

A baixa digestibilidade da lignina está associada à elevada concentração da mesma à medida que a planta amadurece; isto tem levado a presumir que a lignina é o principal fator causador do baixo valor nutritivo das plantas forrageiras maduras

(Jung e Fahey Jr., 1983; Albrecht *et al.*, 1987; Jung *et al.*, 1999). Algumas das razões para explicar a natureza da lignina são: sua estrutura compacta e insolubilidade na água; o arcabouço rígido devido às várias ligações covalentes entre os átomos de carbono e as ligações do tipo éter; diferentemente de outros polímeros naturais, a lignina possui diversas formas de conexões intermonoméricas (Boerjan *et al.*, 2003; Higuchi, 1990; Monties, 1989).

Gordon (1975) citou que a lignina de leguminosas aparentemente possui a estrutura mais condensada, sendo portanto, potencialmente menos reativa que a ligninas de gramíneas. Fukushima *et al.* (1991) sugeriram que a inibição da digestão da celulose de alfafa poderia ser resultante da ligação química entre a lignina e os polissacarídeos estruturais ou da encrustação física.

Há um grande interesse na modificação genética da biossíntese de lignina através da biologia molecular para muitas finalidades, incluindo a melhoria da degradabilidade da parede celular (Inoue *et al.*, 1998; Pinçon *et al.*, 2001)

A degradação da lignina é frequentemente parcial para a lignina condensada pelas inter-unidades C-C que são especialmente recalcitrantes, e a alteração química dos produtos derivados de lignina ocorrem em considerável extensão, produzindo, por exemplo, produtos de condensação, oxidação, adição e substituição. No entanto, a combinação de métodos tem sido usada para obter informações reais na estrutura da lignina. Diferentes métodos histoquímicos, químicos e espectroscópicos têm sido desenvolvidos para investigar o conteúdo e a composição da lignina (Monties, 1989) .

O estudo das ligninas em espécies vegetais compreende, principalmente, métodos de degradação dos polímeros em suas unidades monoméricas e diméricas, seguidos por análise qualitativa e quantitativa do produto degradado.

Os métodos de degradação consistem no rompimento de ligações lábeis C-C

e C-O que unem as unidades mono e/ou diméricas e podem ser tanto químicos quanto biológicos. Os métodos de degradação química compreendem a degradação de Björkman (Björkman, 1956) seguida de acetilação e redução dos produtos formados, a acidólise (Sarkanen e Ludwig, 1971), que sendo substituído cada vez mais freqüentemente tioacidólise (Lapierre *et al.*, 1986) e oxidações com nitrobenzeno alcalino (Billa *et al.*, 1996), com óxido cúprico alcalino ou permanganato (Chen, 1988), além de técnicas mais recentes como a degradação por radiação ou pirólise seguida de análise por CG/EM (Zunic *et al.*, 1992). Os métodos biológicos utilizam fungos e microrganismos para a degradação das ligninas, como pode ser constatado nos trabalhos de Gillardi *et al* (1995) e Kawai *et al* (1995).

A análise de ligninas é feita por métodos como espectroscopia na região do IV, CG/EM, CLAE, RMN em solução ou em estado sólido além de novas técnicas que estão sendo aperfeiçoadas para esta modalidade como cromatografia por exclusão de alta eficiência (CEAE) (Thring *et al.*, 1990) e eletroforese capilar (EC) (Masselter *et al.*, 1995).

2. Objetivos

Estudos químicos realizados em muitas espécies de *Piper*, incluindo *P. richardiaefolium* que foi um dos focos deste trabalho, mostraram que elas acumulam lignanas com diferentes padrões de substituições em seus anéis aromáticos (Benevides *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2000). Estes compostos, assim como as ligninas, são derivados de fenilpropanóides e são sintetizados pela planta pela via do ácido chiquímico (Sarkanen e Ludwig, 1971).

O estudo das ligninas das espécies *P. regnellii*, *P. solmsianum*, *P. aducum*, *P. malacophyllum*, *P. cernuum* e *P. richardiaefolium* teve como objetivos a comparação entre os resíduos obtidos das ligninas com as estruturas das lignanas acumuladas e estabelecer uma conexão entre ambos produtos originados da via fenilpropanoídica. Espera-se assim obter dados que contribuam para o posicionamento taxonômico e evolutivo das espécies de *Piper*.

Dentre muitas variedades de espécies de plantas existentes no reino vegetal várias espécies possuem morfologias semelhantes e diferindo apenas em poucos aspectos. Pôde-se observar, ao longo do trabalho, que a espécie *P. richardiaefolium*, juntamente com *P. truncatum*, *P. cernuum* e *P. pseudopothifolium* cultivadas na casa de vegetação Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ-USP, se enquadram no caso supracitado, onde se observou entre elas uma variação no tamanho das folhas, porte da planta e até mesmo a presença de pêlos em algumas enquanto em outras essa característica era ausente.

Desta forma, objetivou-se verificar, como essas espécies se posicionavam entre si, no que diz respeito aos constituintes químicos de cada espécie. Para este estudo, realizou-se a análise de componentes principais (PCA) através dos espectros de RMN de ^1H .

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e equipamentos

Os solventes utilizados nas extrações e nas eluições das colunas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados segundo os procedimentos usuais (Perrim e Armarego, 1998). Para as análises cromatográficas em CLAE foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Tedia S/A).

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizadas sílica gel do tipo 60, partículas 63-200 μm .

As placas de CCDP foram confeccionadas utilizando-se sílica 60G e/ou 60GF₂₅₄ (5-40 μm). Estas placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador “Quickfit”, regulado para produzir camadas de 1,00 mm de espessura. Para CCDC, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F₂₅₄ para cromatografia de camada fina, sobre suporte de alumínio.

As placas de CCDC foram reveladas com aspersão de solução a 2% de sulfato cérico em ácido sulfúrico (2 mol.L⁻¹) sobre as mesmas, após terem sido observadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e, em placas preparativas, através de visualização no ultravioleta (254 e 365 nm).

As análises em CLAE foram obtidas em sistemas da Shimadzu que consistiu de duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector de ultravioleta modelo SPD-10A, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e tratados pelo programa de computador LC-10, utilizando coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex[®], 250 x 4,6 mm, 5 μm) para análise das substâncias isoladas de *P. richardiaefolium* e uma coluna Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)

Supelco, para a determinação dos produtos de oxidação por nitrobenzeno das ligninas de *Piper*.

Os espectros de RMN de ^1H (200 MHz) e RMN de ^{13}C (50 MHz e 75 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker AC 200 e Varian 300. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 deuterado e DMSO deuterado.

Os espectros de IV foram registrados em aparelho FT-IR 1750, Nicolte Perkin-Elmer.

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

Para análise do óleo volátil de folhas de *P. richardiaefolium* foi utilizado um cromatógrafo Focus GC da marca THERMO, uma coluna (OV-5, 300 x 0.20 mm), um detector por ionização em chama, tendo o Hélio como gás carreador e a programação da temperatura de 60 a 240 °C, com um aquecimento de 3 °C/minuto. Temperatura do detector de 280 °C e do injetor de 260 °C.

3.2. Estudo químico das folhas e frutos de *Piper richardiaefolium*

3.2.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal (caule, folhas e frutos) da espécie *P. richardiaefolium* (K-350) foi coletado na reserva do Núcleo de Picinguaba, no município de Ubatuba-SP.

A classificação taxonômica da espécie *P. richardiaefolium* foi feita pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

3.2.2. Obtenção dos extratos

As folhas e frutos foram secos ao ar livre e depois em estufa a temperatura de 50 °C. As folhas secas foram moídas em moinho de facas sendo obtidos 68,0 g e 46,0 g de material seco das folhas e frutos, respectivamente. Este material foi extraído três vezes, por 24 horas, com diclorometano:metanol (2:1). Após a extração, os solventes foram concentrados à pressão reduzida, em evaporador rotatório, sendo obtidos 8,0 g de extrato bruto das folhas e 6,0 g de extrato bruto dos frutos.

3.2.3. Eliminação da clorofila

Cerca de 8,0 g de extrato em diclorometano:metanol (2:1) das folhas de *P. richardiaefolium* foi dissolvido em metanol e em seguida foi adicionado 20% de água destilada, provocando a precipitação da clorofila. Este material foi submetido a uma coluna filtrante de celite compactada a vácuo (Barata,1978). Foram acrescidas três

soluções contendo 85%, 100% de MeOH e Acetona sucessivamente, obtendo assim quatro frações de 400 mL. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório para eliminar o máximo dos solventes orgânicos e, em seguida, submetidas a partições sucessivas com diclorometano. As frações orgânicas obtidas neste processo foram secas com sulfato de sódio anidro e em seguida os solventes foram evaporados à pressão reduzida em evaporador rotatório (Figura 3.1).

Figura 3.1. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato das folhas de *P. richardiaefolium*.

3.2.4. Fracionamento cromatográfico das folhas de *Piper richardiaefolium*

De modo geral, o método utilizado para a separação de substâncias de baixa e média polaridade foi a cromatográfica de adsorção em sílica gel e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As separações foram monitoradas por CCDC. O fracionamento cromatográfico foi realizado por uma coluna cromatográfica utilizando-se hexano/EtOAc da fração B, obtida após tratamento do extrato com celite.

As frações A, C e D foram desprezadas por apresentarem um perfil em CCDC e espectro de RMN de ^1H compatível com a presença de substâncias alifáticas.

A fração B inicialmente foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna empacotada com sílica gel 60 (63-200 μm) a vácuo eluída com mistura de solventes em gradiente de polaridade (hexano/EtOAc)(Figura 3.2).

Figura 3.2. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração B obtida após tratamento com celite do extrato das folhas de *P. richardiaefolium*.

As subfrações resultantes da coluna foram agrupadas (figura 3.2) e o grupo 2 foi submetido a uma nova separação cromatográfica utilizando-se o mesmo método usado na fração B, resultando em 19 frações. Algumas frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) resultando no isolamento de **1** (sesamina), **2** (kobusina), **3** (hinokinina), **4** (kusunokinina) e **5** (cubebina) (Figura 3.3).

Figura 3.3. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo 2.

Do grupo 3 foi feita uma recristalização obtendo 180 mg do composto **5** (cubebina).

O grupo 4 foi submetido a uma nova separação cromatográfica utilizando o mesmo método usado na fração B, que resultou em 32 frações. Algumas frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) ou recristalização resultando no isolamento dos compostos **4** (kusunokinina), **5** (cubebina) e **6** (3',4',dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina) (Figura 3.4).

Figura 3.4. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo 4.

Dos grupos 5 e 6 foram feitas placas preparativas utilizando um sistema hexano/acetato (4:1) que originaram as lignanas **6** (3',4',dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina) e **7** (arctigenina) (Figura 3.5).

Figura 3.5. Fluxograma do fracionamento cromatográfico dos grupos 5 e 6.

3.2.5. Fracionamento cromatográfico dos frutos de *Piper richardiaefolium*

O extrato bruto dos frutos inicialmente foi submetido a uma separação cromatográfica em coluna empacotada com sílica gel 60 (63-200 μm) a vácuo eluída com mistura de solventes em gradiente de polaridade (hexano/EtOAc) (Figura 3.6).

Figura 3.6. Fluxograma do fracionamento cromatográfico dos frutos de *P. richardiaefolium*.

As subfrações resultantes da coluna foram agrupadas (figura 9) e o grupo A foi submetido a uma nova separação cromatográfica utilizando-se uma eluição isocrática com clorofórmio/acetona (95/5) como fase móvel sendo obtidas 11 frações. Através da cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) isolou-se os compostos **3** (hinokinina), **5** (cubebina), **8** (ferulato de bornila) e **9** (cumarato de bornila) (Figura 3.7).

Figura 3.7. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo A.

O grupo B foi submetido a uma separação cromatográfica utilizando-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) que levou ao isolamento dos compostos **5** (cubebina) e **10** (haplomirfolina) e uma mistura de **3** (hinokinina) e **4** (kusunokinina) (Figura 3.8).

Figura 3.8. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do grupo B.

Os grupos E e F foram também submetidos a uma separação cromatográfica utilizando a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando um sistema hexano/acetato (4:1), eluída por seis vezes, levando à mistura dos compostos **11** (piplartina) e **12** (diidropiplartina) com uma massa de 73 mg.

3.2.6. Análise via CLAE

A análise por CLAE foi obtida utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex[®], 250 x 4,6 mm, 5 μ m). A fase móvel utilizada foi ACN e água Milli-Q com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Foi utilizado um gradiente, no qual, de 0 a 8 min, a concentração de ACN foi mantida a 40%, de 8 a 40 min, a porcentagem de ACN passa de 40 a 100% e mantida nesta concentração até 45 min, em 45 min volta à condição inicial, sendo mantida até 55 min. A detecção foi por ultravioleta no comprimento de onda de 270 nm.

As amostras foram dissolvidas em MeOH e filtradas com filtros para seringa de teflon (3 mm, 20 μ m).

3.2.7. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos compostos identificados em *Piper richardiaefolium* (Piperaceae)

(+)-sesamina

(7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodioxo-8.8',7.O.9',9.O.7'-lignana

Característica: Óleo viscoso, t_R (CLAE): 21,35 min.

$[\alpha]_D^{25} = + 38,6^\circ$ (c. 0,2 g/100ml – CHCl₃)

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 4.2, pág. 58; Figura 4.4, pág. 60

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 4.3, pág. 59; Figura 4.5, pág. 60

(+)-kobusina

(7*S*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4 -metilenodioxo-3',4'-dimetóxi-8.8',7.O.9',9.O.7'-lignana

Característica: Óleo viscoso, t_R (CLAE): 16,72 min.

$[\alpha]_D^{25} = + 112,6^\circ$ (c. 0,4 g/100ml – CHCl₃)

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 4.2, pág. 58; Figura 4.6, pág. 61

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 4.3, pág. 59; Figura 4.7, pág. 61

(-)-hinokinina

(8R,8'R)-3,4, 3',4' -dimetilenodióxi-9-oxo-8.8',9.O.9'-lignana

Característica: Óleo viscoso t_R (CLAE): 27,83 min.

$[\alpha]^{25}_D = -42,5^\circ$ (c. 0,8 g/100ml – CHCl_3)

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.4, pág. 66; Figura 4.9, pág. 68

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.5, pág. 67; Figura 4.10, pág. 68

(-)-kusunokinina

(8R,8'R)- 3,4 -metilenodióxi-3',4'-dimetóxi-9-oxo-8.8',9.O.9'-lignana

Característica: Óleo viscoso, t_R (CLAE): 24,99 min.

$[\alpha]^{25}_D = -38,6^\circ$ (c. 0,6 g/100ml – CHCl_3)

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.4, pág. 66; Figura 4.11, pág. 69

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.5, pág. 67; Figura 4.12, pág. 69

(+) -arctigenina

(8*R*,8'*R*)- 3-metóxi-4-hidróxi-3',4'-dimetóxi-9-oxo-8.8',9.O.9'-lignana

Característica: Óleo viscoso, t_R (CLAE): 17,89 min.

$[\alpha]_D^{25} = +108^\circ$ (c. 1,2 g/100ml – CHCl₃)

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 4.4, pág. 66; Figura 4.13, pág. 70

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 4.5, pág. 67; Figura 4.14, pág. 70

(+) -haplomirfolina

(8*R*,8'*R*)- 3,4-metilenodioxo-3'-metoxi-4'-hidroxi-9-oxo-8.8',9.O.9'-lignana

Característica: Óleo viscoso, t_R (CLAE): 21,54 min.

$[\alpha]_D^{25} = +80^\circ$ (c. 0,6 g/100ml – CHCl₃)

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 4.4, pág. 66; Figura 4.15, pág. 71

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 4.5, pág. 67; Figura 4.16, pág. 71

EM, m/z (int. rel.): 356 (M⁺ C₂₀H₂₀O₆, 16), 164 (6), 137 (39), 135 (100), 94 (8), 77 (28), 51 (13). Figuras 4.17 e 4.18, pág. 72

cubebina

(8*R*,8'*R*)- 9-hidroxi-3,4,3',4'-dimetilenodioxo-8,8',9,9'-lignana

Característica: sólido branco, t_R (CLAE): 24,00 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.6, pág. 76; Figura 4.20, pág. 78

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.7, pág. 77 ; Figura 4.21, pág. 78

3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina

(8*R*,8'*R*)- 9-hidróxi-3,4 -metilenodioxo-3',4'-dimetóxi-8,8',9,9'-lignana

Característica: sólido branco, t_R (CLAE): 20,15 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.6, pág. 76; Figura 4.22, pág. 79

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.7, pág. 77; Figura 4.23, pág. 79

ferulato de bornila

(*E*)-(1*R*,2*R*,4*S*)-1,7,7-trimetilbíciclo[2.2.1]heptan-2-il)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato

Característica: óleo incolor, t_R (CLAE): 35,82 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.8, pág. 84; Figura 4.25, pág. 86

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.9, pág. 85; Figura 4.26, pág. 86

EM, m/z (int. rel.): 330 (M^+ $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$, 3), 177 (100), 145 (16), 134 (5), 117 (6), 89 (7), 69(9), 55 (9), 41 (17). Figuras 4.29, pág. 88; 4.31, pág. 89.

cumarato de bornila

(*E*)-(1*R*,2*R*,4*S*)-1,7,7-trimetilbíciclo[2.2.1]heptan-2-il)-3-(4-hidroxifenil)acrilato

Característica: óleo incolor, t_R (CLAE): 35,18 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.8, pág. 84; Figura 4.27, pág. 87

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.9, pág. 85; Figura 4.28, pág. 87

EM, m/z (int. rel.): 300 (M^+ $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_3$, 3), 147 (100), 119 (8), 91 (12), 65 (6), 41 (13) Figuras 4.30, pág. 88; 4.31, pág. 89.

piplartina

N-(3',4',5'-trimetoxicinamoil)- Δ^3 -piperidin-2-ona

Característica: sólido branco, t_R (CLAE): 20,43 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.10, pág. 92; Figura 4.33, pág. 94

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.11, pág. 93; Figura 4.34, pág. 94

EM, m/z (int. rel.): 317 (M^+ $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5$), 274(22), 190 (26), 205 (17) e 221 (100)

Figuras 4.35, pág. 95; 4.37, pág. 96.

diidropiplartina

N-(3',4',5'-trimetoxidiidrocinamoil)- Δ^3 -piperidin-2-ona

Característica: sólido branco, t_R (CLAE): 19,32 min.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 4.10, pág. 92; Figura 4.33, pág. 94

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 4.11, pág. 93; Figura 4.34, pág. 94

EM, m/z (int. rel.): 319 (M^+ $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_5$), 222 (97), 194 (53), 207 (23), 151 (21), 98 (31),

136 (21) e 170 (100). Figuras 4.36, pág. 95; 4.37, pág. 96.

3.3. Análise do óleo volátil das folhas de *Piper richardiaefolium*

3.3.1. Extração do óleo volátil

Cerca de 100g das folhas da planta foram submetidas à hidrodestilação por 2 horas em um aparelho de Clevenger. O óleo obtido foi recolhido, pesado e uma alíquota foi dissolvida em hexano para análise em CG e CG-EM.

3.3.2. Análise do óleo volátil

Para a identificação dos constituintes químicos utilizou-se o cálculo do índice de retenção de Kovats (IK), que utiliza uma série homóloga de alcanos de concentração conhecida, cujos tempos de retenção na análise cromatográfica a gás são comparados aos dos componentes do óleo. A série de hidrocarbonetos (C_8 - C_{23}) foi analisada nas mesmas condições que o óleo volátil (Figura 3.9).

Figura 3.9. Cromatograma, obtido por CG, da série homóloga de alcanos.

3.4. Análise de componentes principais (PCA) de algumas espécies de piperaceae

Para este trabalho foram escolhidos 11 espécies de Piperaceae, incluindo *P. richardiaefolium*, *P. truncatum*, *P. cernuum*, *P. pseudopothifolium* (Tabela 3.1). De cada espécie foi colhida uma amostra e feita uma extração a frio, por 24 horas, utilizando-se metanol como solvente. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório para eliminação do solvente. Retirou-se cerca de 20 mg de cada extrato que foi dissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Foram obtidos os espectros de RMN de ^1H de cada amostra (figura 3.12), como mostra o exemplo da figura 3.10 e através de seus respectivos FIDs foi feito a análise de componentes principais.

Cada espectro de RMN de ^1H foi reduzido a 221 regiões de mesma faixa, de 0,04 ppm cada, usando-se o programa Mestre-C (versão 4.9.9.6 Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espanha). As integrais foram obtidas para cada uma das 221 regiões como representado na figura 3.11. As regiões contendo o (0 a 0,4 ppm), o material alifático (1,16 a 1,52 ppm), e os resíduos de clorofórmio (7,0 a 7,4 ppm) foram excluídas de cada espectro. Os espectros foram exportados em arquivo no formato ASCII. A série de dados foi submetida a análises de “cluster” utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft., Inc) e, posteriormente, a análise de componentes principais, utilizando o software The Unscrambler versão 9.5 (CAMO Process AS, Noruega).

A base da análise de “clusters” é o cálculo das distâncias entre objetos em um espaço multidimensional usando uma equação como a expressa na equação 1 (distância Euclidiana) (LIVINGSTONE, 1995).

$$d_{ij} = \sqrt{\left(\sum_{k=1, N} (d_{i,k} - d_{j,k})^2 \right)}$$

Equação 1

Estas distâncias são usadas para produzir um diagrama conhecido como dendrograma, o qual permite identificar os grupos de objetos similares. Existem diferentes abordagens para medir as distâncias entre os grupos, neste estudo utilizamos distância Euclidiana e acoplamento médio (“average linkage”).

A análise de componentes principais (PCA) (Wold *et al.*, 1987) é uma ferramenta satisfatória para uma análise de dados com muitas variáveis. É utilizado em diversos campos da ciência. O PCA tem duas características principais (Livingstone, 1999).

O primeiro componente principal explica o máximo de variância na série de dados, e os componentes subseqüentes descrevem o máximo da parte restante da variância não explicada. Todos os componentes são ortogonais entre si.

O PCA é muito empregado nas análises de “fingerprints” de metabólitos (Bailey *et al.*, 2003; Defenez e Colquhoun, 2003; Lindon *et al.*, 2001). Podendo sumarizar a informação contida em grandes quantidades de dados espectrais, transformando como mencionado anteriormente às variáveis originais em uma série muito menor de variáveis (componentes). Estas novas variáveis são as combinações das variáveis originais, explicando a maior variância possível e removendo as redundâncias existentes.

Tabela 3.1. Espécies de *Piper* analisadas.

Número de coleta	Data de Coleta	Espécies de <i>Piper</i>	Procedência
Kato 112	16/12/2000	<i>P. truncatum</i>	Pousada do Riacho Grande, Iporanga (SP)
Kato 137	21/02/2001	<i>P. cernuum</i>	Núcleo Picinguaba, Ubatuba (SP)
Kato 211	10/02/2002	<i>P. pseudopothifolium</i>	Parque Nacional do Itatiaia, Itatiaia (RJ)
Kato 290	01/09/2002	<i>P. richardiaefolium</i>	Trilha do Corcovado, Ubatuba (SP)
Kato 350	08/02/2003	<i>P. richardiaefolium</i>	Camburí, Ubatuba, (SP)
Kato 593	10/06/2005	<i>P. richardiaefolium</i>	São Lourenço, Santa Teresa (ES)
Kato 597	10/06/2005	<i>P. truncatum</i>	Projeto Muriqui, Sta. M. do Jequitibá (ES)
Kato 598	10/06/2005	<i>P. pseudopothifolium</i>	Projeto Muriqui, Sta. M. do Jequitibá (ES)
Kato 610	11/06/2005	<i>P. richardiaefolium</i>	Reserva A. Ruschi, divisa com Goipaba-açu (ES)
Kato 616	11/06/2005	<i>P. truncatum</i>	Reserva A. Ruschi, Santa Tereza (ES)
Kato 854	08/02/2007	<i>P. richardiaefolium</i>	Parque Previdência, São Paulo (SP)

Figura 3.10. Espectro de RMN de ^1H de *Piper richardiaefolium* (k-290).

Figura 3.11. Exemplo de redução dos dados de um espectro de RMN de ^1H em regiões espectrais de mesmo tamanho (ppm) e os valores respectivos das integrais de cada região.

Figura 3.12. Espectro de RMN de ^1H de *P. truncatum* (k 616) (**A**), *P. pseudopothifolium* (k 598) (**B**), *P. pseudopothifolium* (k 211) (**C**), *P. truncatum* (k 112) (**D**), *P. truncatum* (k 597) (**E**), *P. cernuum* (k 137) (**F**), *P. richardiaefolium* (k 350) (**G**), *P. richardiaefolium* (k 290) (**H**), *P. richardiaefolium* (k 854) (**I**), *P. richardiaefolium* (k 610) (**J**), *P. richardiaefolium* (k 593) (**K**).

3.5. Estudo de lignina de *Piper*

3.5.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal (caule das espécies vegetais *Piper solmsianum* e *Piper regnellii*, *Piper aduncum*, *Piper malacophyllum* e *Piper cernuum*) foi coletado na área de cultivo situada entre os blocos 11 e 12 do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, no mês de setembro de 2002 (figura 3.13) e o material vegetal (caule, folhas e frutos) da espécie *P. richardiaefolium* (K 350) foi coletado na reserva do Núcleo de Picinguaba no município de Ubatuba-SP.

Figura 3.13. Espécies escolhidas para o estudo de lignina.

3.5.2. Processamento do material vegetal

O caule foi seco ao ar livre por 60 dias, em estufa a temperatura de 60°C por 3 dias e triturado em moinho de facas (Esquema 1).

Figura 3.14. Fluxograma do estudo das ligninas de espécies de Piperaceae.

3.5.3. Extração e isolamento de ligninas dos caules de *Piper*

Os materiais secos e triturados foram submetidos à extração com acetona em extrator de soxlet por 6 horas e posterior extração com água também em extrator de soxlet. O resíduo sólido resultante foi extraído com solução aquosa de NaOH 1% e, em seguida, seco em estufa a 40° C por 2 dias até peso constante.

3.5.4. Extração de ligninas insolúveis de Klason

Os caules triturados das duas espécies foram submetidos ao procedimento de extração de ligninas insolúveis de Klason (Klason, 1923).

A metodologia de obtenção deste tipo de ligninas (Figura 3.15) consistiu na adição de 100 mL de etanol 95% a 2,1 g de cada amostra e agitação da mistura por um período de 4 horas. Em seguida, o material foi filtrado e ao retido adicionou-se 100 mL de etanol/tolueno 2:1. A mistura foi agitada por 3 horas. A solução foi filtrada e o retido foi submetido à extração com água quente por 3 horas e posterior refluxo com H₂SO₄ 72% por 4 horas.

A mistura reacional foi filtrada e o resíduo sólido amorfo de coloração marrom foi submetido à secagem em estufa a 105° C por 24 horas. Este resíduo corresponde às ligninas insolúveis de Klason.

Figura 3.15. Procedimento de extração das ligninas de Klason.

3.5.5. Extração de ligninas solúveis de Björkman

Cerca de 250 g do material desprovido de materiais solúveis em acetona e em NaOH a 1%, foi triturado em um moinho de bolas por um período de 150 horas, como recomenda o processo original (Björkman, 1956). Após a moagem 100 g de madeira moída foi transferida para um recipiente contendo aproximadamente 800 mL de dioxano/H₂O (95:5) e mantida sob agitação ininterrupta durante 96 horas. Em seguida, a solução foi filtrada e concentrada sob vácuo até eliminação do solvente. O resíduo foi dissolvido em 100 mL de ácido acético 90% à temperatura ambiente e depois precipitado em éter etílico. O precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico e, em seguida, com éter de petróleo e seco sob vácuo. (Figura 3.16).

Figura 3.16. Procedimento de extração das ligninas de Bjorkman.

3.5.6. Acetilação de ligninas

Cerca de 50 mg das ligninas foram submetidas à acetilação com anidrido acético em piridina (1:1), durante 48 horas sob refluxo. O material acetilado foi obtido por precipitação em éter etílico e filtrado. O material precipitado foi lavado com éter etílico e finalmente com éter de petróleo e seco sob vácuo. O produto acetilado foi seco em um dessecador sob vácuo.

3.5.7. Oxidação por nitrobenzeno

Pesou-se 200 mg da amostra moída e livre de extrativos. Colocou-se a amostra em reator de aço inoxidável e 7 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹ e 0,5 mL de nitrobenzeno. Levou-se ao banho de óleo (glicerina) por 2,5 horas a 170°C, com amostra em duplicata. Em seguida, a amostra oxidada foi transferida para um funil de separação e extraída com clorofórmio (6 x 30 mL). Após a primeira extração adicionou-se 2,5 mL de HCl (4mol.L⁻¹). As fases orgânicas foram combinadas e evaporadas. Em seguida, a amostra foi transferida a um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Filtrou-se em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm e a solução resultante foi analisada por CLAE utilizando-se fase móvel composta de acetonitrila/água (1:6 v/v), ajustando o pH para 2,6 com tampão de ácido trifluoracético (TFA), detecção: UV, 280 nm, T=40°C e fluxo: 1,0 mL/minuto. Padrões de vanilina e siringaldeído (Aldrich, WI, USA) foram usados para a quantificação dos derivados das unidades guaiacila e siringila, respectivamente. Curvas de calibração usando os padrões de vanilina e siringila foram obtidas nas concentrações de 0,375; 0,75; 1,125 e 1,5 mmolL⁻¹ para

vanilina, e 0,825; 1,65; 2,475 e 3,33 mmolL⁻¹ para siringaldeído. As soluções foram preparadas em mistura de acetonitrila/água (1:1), em pH 2,6.

3.5.8. Análise elementar

A análise elementar, com o objetivo de conhecer a composição de carbono, hidrogênio e oxigênio das ligninas, foi realizada na Central Analítica do IQ-USP. Para tal experimento foi utilizada a lignina original *P. aduncum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum*, *P. richardiaefolium*, *P. cernuum* e *P. malacophyllum* extraídas pelo método de Björkman.

3.5.9. Determinação do conteúdo de metoxilas

As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

As razões molares entre esses três compostos constituintes dependem do tipo de vegetal. O composto **1** não possui metoxila, o **2** e o **3** possuem, respectivamente, um e dois grupos metoxilas por mol. O grupo metoxílico é

considerado um grupo funcional característico de ligninas e seus derivados, sendo de grande importância a determinação do seu conteúdo na análise da macromolécula (Sarkanen e Fengel, 1984; Fengel e Wegener, 1984; Moraes, 1992).

A presença marcante dos grupos metoxílicos na maioria das unidades de fenilpropanoides da lignina leva a que sejam expressos como parte integrante da fórmula mínima de ligninas, a qual é baseada na unidade fenilpropanoide. A porcentagem de metoxilas em madeiras moles varia de 12 a 16% e nas madeiras duras de 18 a 22 %. Segundo Saliba *et al.*, (2000), a porcentagem de metoxila para a lignina da palha de milho é 6,67 e 1,79% para a da palha de soja.

Zeisel (1985) revisado por Pilo-Veloso *et al.*, (1993) desenvolveu um dos primeiros métodos para a determinação de grupos metoxílicos. Por outro lado, Viebock e colaboradores desenvolveram uma técnica para a determinação de metoxilas, a qual pode ser utilizada para amostras com enxofre.

Segundo Nascimento (1989), os sinais devidos a grupos metoxila são claramente observados na região do espectro RMN de ^1H compreendida entre $\delta = 3,5-4,0$. Através da curva de integração desses sinais as metoxilas podem ser avaliadas semiquantitativamente. A presença de grupos metoxila em ligninas pode também ser avaliada por RMN de ^{13}C . Esses grupos apresentam sinais de ressonância do ^{13}C situados na região compreendida entre $\delta = 55$ a 57.

3.5.10. Determinação da fórmula mínima

Freudenberg e Neish (1968) desenvolveram uma série de cálculos que permitem o estudo de fórmulas mínimas de ligninas. Os grupos metoxila são expressos como uma unidade separada dos demais átomos de C, H e O da

molécula. Por esta razão, subtraem-se o conteúdo de C, H e O correspondente a metoxila do total encontrado para esses átomos.

Denominam-se C_p , H_p , e O_p as porcentagens individuais dos elementos contidos na metoxila. O conteúdo total desses elementos na macromolécula é expresso por %C, %H e %O, as porcentagens resultantes são dadas pelas relações:

$$\%C' = \%C - C_p$$

$$\%H' = \%H - H_p$$

$$\%O = \%O - O_p$$

Se essas relações são expressas em números relativos, resultantes da divisão pelas respectivas massas (M), tem-se a fórmula mínima representada por:

$$\text{Onde : } X = \%C/MC, Y = \%H/MH, Z = \%O/MO \text{ e } d = \% OCH_3/MOCH_3$$

Se a fórmula mínima para a lignina for considerada como função de sua unidade básica $C_6 C_3$ ou C_9 , pode ser escrita:

$(C_x H_y O_z (OCH_3)_d)_n$ onde $X \cdot n = 9$ que, reescrita em termos de unidade C_9 , resulta em $C_9 H_y 9/x O 9/x (OCH_3)_d 9/x$

Substituindo x, y, z, e d na equação acima, têm-se:

$$\text{Hidrogênio: } H = \frac{276,60 (\%H) - 27,00 (\%OCH_3)}{2,584 (\%C) - \% OCH_3}$$

$$\text{Oxigênio: } O = \frac{17,46 (\%O) - 9 (\%OCH_3)}{2,584 (\%C) - \% OCH_3}$$

$$\text{Metoxila: } OCH_3 = \frac{9 (OCH_3)}{2,584 (\%C) - \% OCH_3}$$

A partir das porcentagens de C, H e O determinadas pela análise elementar, é possível determinar a fórmula mínima para a lignina, baseada em unidades C_9 .

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo químico de *Piper richardiaefolium*

O estudo químico da espécie *P. richardiaefolium* foi feito inicialmente analisando-se os espectros de RMN de ^1H e os cromatogramas obtidos por CLAE da raiz, caule, folha e fruto. Os dois últimos foram escolhidos para este estudo devido à predominância de substâncias de média polaridade.

4.1.1. Estudo químico das folhas e dos frutos de *Piper richardiaefolium*

O estudo químico das folhas de *P. richardiaefolium* resultou no isolamento de sete lignanas, sendo duas lignanas furofurânicas, três lignanas dibenzilbutirolactônicas e duas lignanas dibenzilbutirolactólicas (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

Figura 4.1. Cromatograma obtido por CLAE das folhas de *Piper richardiaefolium*.

O estudo químico dos frutos de *Piper richardiaefolium* resultou na identificação de oito compostos. Dentre eles a hinokinina, kusunokinina e a cubebina, isoladas das folhas da mesma planta. Foram isolados e identificados ainda outros cinco compostos, uma lignana dibenzilbutirolactônica, dois cinamatos de bornila e duas amidas. (Figura 4.2 e Tabela 4.1).

Figura 4.2. Cromatograma obtido por CLAE dos frutos de *Piper richardiaefolium*.

Tabela 4.1. Identificação das substâncias obtidas por CLAE das folhas e dos frutos de *P. richardiaefolium*.

Número	Nome da substância	Tempo de retenção (min)
1	sesamina	21,35
2	kobusina	16,72
3	hinokinina	27,83
4	kusunokinina	24,99
5	arctigenina	17,89
6	cubebina	24,00
7	3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenocubebina	20,15
8	haplomirfolina	21,54
9	ferulato de bornila	35,82
10	cumarato de bornila	35,18
11	piplartina	20,43
12	diidropiplartina	19,32

4.1.1.1. Lignanas furofurânicas

Foram isoladas duas lignanas furofurânicas: **1** (sesamina) e **2** (kobusina). Estas foram analisadas por CLAE (Figura 4.3) e suas estruturas determinadas por RMN de ^1H (Tabela 4.2, Figuras 4.4 e 4.6) e por RMN de ^{13}C (Tabela 4.3, Figuras 4.5 e 4.7).

No espectro de RMN de ^1H da lignana **1** foram observados sinais de hidrogênios que revelaram a presença de dois anéis aromáticos na faixa de δ 6,84–6,78 (m, 6H), apresentando também um sinal em δ 4,71 (d, 4,0 Hz, 2H) que se refere aos hidrogênios carbinólicos equivalentes H-7 e H-7', sugerindo uma posição dos anéis aromáticos na posição pseudo-equatorial da estrutura furofurânica. O sinal em δ 3,05 (m, 2H) refere-se aos hidrogênios H-8 e H-8' alifáticos, os sinais em δ 4,23 (dd, 7,0 e 9,2 Hz, 2H) são dos hidrogênios H-9_{eq} e H-9'_{eq} e os sinais em δ 3,87 (dd, 3,1 e 9,2 Hz, 2H) são dos hidrogênios H-9_{ax} e H-9'_{ax}. Enquanto o sinal em δ 5,95 (s, 4H) é referente aos hidrogênios do grupo metilenodioxifenílico ligado ao anel aromático.

No espectro de RMN de ^{13}C da lignana **1** foram observados 10 sinais, o que sugere uma molécula simétrica. O sinal em δ 135,12, referente aos carbonos C-1 e C-1' dos anéis aromáticos, sugere a presença do grupo arila na posição equatorial na estrutura furofurânica (Agrawal e Thakur, 1985) em conformidade com a análise do espectro de RMN de ^1H . Este grupo arila mostra ser um grupo piperonila, o que é comprovado pelo sinal em δ 101,06 referente aos carbonos metilenodioxifenílicos ligados aos sistemas aromáticos.

Os deslocamentos químicos para os carbonos C-7,7', C-8,8' e C-9,9' são também dependentes da estereoquímica da molécula. A análise dos sinais de carbonos alifáticos mostra a proteção estérica exercida pelo anel em pseudo-axial para os carbonos C-7', C-8' e C-9'. Podendo ser visto também um efeito de proteção nos carbonos C-9 e C-9' que pode ser compreendido pelo efeito γ provocado pelo carbono C-1 do grupo aromático na posição pseudo-axial.

No espectro de RMN de ^1H da lignana **2** foram observados sinais de hidrogênios que revelaram a presença de dois anéis aromáticos que absorvem na

faixa de δ 6,90–6,76, apresentando também um sinal em δ 4,73 que se refere aos hidrogênios carbinólicos equivalentes H-7 e H-7'. O sinal em δ 3,08 refere-se aos Hidrogênios H-8 e H-8' alifáticos, os sinais em δ 4,23 são dos hidrogênios H-9_{eq} e H-9'_{eq} e os sinais dos hidrogênios H-9_{ax} e H-9'_{ax} estão sobrepostos pelos sinais das metoxilas na região de δ 3,87–3,89. Enquanto o sinal em 5,95 é referente aos grupos metilenodióxido ligado ao anel aromático.

No espectro de RMN de ^{13}C da lignana **2** foram observados 12 sinais na região de carbonos aromáticos, sugerindo uma molécula assimétrica. O sinal em δ 133,60 referentes ao carbono C-1, sugere a presença de um grupo piperonila ligado ao sistema furofurânico e o sinal em δ 135,16 referente ao carbono C-1', indica a presença de um grupo veratrilal ligado ao sistema furofurânico. Sendo estes grupos ligados em equatorial na estrutura furofurânica (Agrawal e Thakur, 1985). A presença destes grupos arilas pode ser comprovada pelos sinais em δ 101,06 e 55,95 referentes aos carbonos do metilenodióxido do grupo piperonila e das metoxilas, respectivamente, dos grupos ligados ao sistema furofurânico.

Os deslocamentos químicos para os carbonos C-7,7', C-8,8' e C-9,9' da estrutura furofurânica em que os grupos arilas estão orientados equatorialmente aparecem nas faixas de δ 85,3-85,9, 53,7-54,4 e 71,3-72,0, respectivamente (Agrawal e Thakur, 1985).

A lignana **1**, identificada como sendo sesamina, foi isolada das folhas de *P. richardiaefolium*. Esta lignana, isolada anteriormente de espécies de Myristicaceae (Vidigal, 1993), da família Cupressaceae cuja espécie é *Chamaecyparis obtusa* (Takaku *et al.*, 2001), também foi encontrada na família Asteraceae e espécie *Artemisia absinthium* (Greger e Hofer, 1980).

A lignana **2**, identificado como sendo a kobusina, foi isolada das folhas de *P. richardiaefolium*. Esta lignana foi isolada anteriormente de *Hyptis fasciculata*, uma espécie pertencente à família Lamiaceae (Falcão, 2003).

A figura 4.3 mostra os cromatogramas, analisadas em CLAE, das lignanas furofurânicas isoladas das folhas de *Piper richardiaefolium*.

Figura 4.3. Cromatograma obtidos por CLAE das lignanas furofurânicas sesamina (**1**) e kobusina (**2**).

Tabela 4.2. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas sesamina (**1**) e kobusina (**2**) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).

Hidrogênios	1 sesamina	2 kobusina
Ar-H	6,84 – 6,78 (m, 6H)	6,90 – 6,76 (m, 6H)
H ₇	4,71 (d, 3.96 Hz, 2H)	4,73 (sl, 2H)
H _{7'}		
H ₈	3,05 (m, 2H)	3,08 (m, 2H)
H _{8'}		
H _{9 eq.}	4,23 (dd, 8.78 e 2.20, 2H)	4,23 (m, 2H)
H _{9' eq}		
H _{9 ax.}	3,87 (dd, 8.78 e 3.06, 2H)	3,83 (envelope com as metoxilas)
H _{9' ax.}		
-OMe	-	3,89 (s, 3H)
		3,87 (s, 3H)
-O ₂ CH ₂	5,95 (s, 4H)	5,95 (s, 2H)

Tabela 4.3. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas sesamina (**1**) e kobusina (**2**) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 50 MHz).

Carbonos	1 sesamina	2 kobusina
1	135,12	135,16
1'	135,12	133,60
2	106,50	106,50
2'	106,50	109,34
3	148,01	147,99
3'	148,01	148,29
4	147,14	147,12
4'	147,14	148,71
5	108,19	108,19
5'	108,19	111,17
6	119,34	119,35
6'	119,34	118,28
7	85,81	85,85
7'	85,81	85,77
8	54,36	54,36
8'	54,36	54,18
9	71,73	71,77
9'	71,73	71,70
OMe	-	55,95
O_2CH_2	101,06	101,06

Figura 4.4. Espectro de RMN de ^1H da sesamina (1) 200 MHz, CDCl_3 .

Figura 4.5. Espectro de RMN de ^{13}C da sesamina (1) 50 MHz, CDCl_3 .

Figura 4.6. Espectro de RMN de ¹H da kobusina (2) 200 MHz, CDCl₃.

Figura 4.7. Espectro de RMN de ¹³C da kobusina (2) 50 MHz, CDCl₃.

4.1.1.2. Lignanas dibenzilbutirolactônicas

Foram isolados de *P. richardiaefolium*, quatro compostos pertencentes à classe de lignanas dibenzilbutirolactônicas: a hinokinina (**3**), kusunokinina (**4**) e arctigenina (**5**), isoladas das folhas e a haplomirfolina (**8**) isolada dos frutos. Essa classe de compostos tem ampla ocorrência em plantas e possui reconhecidas atividades biológicas.

Os compostos isolados foram analisados por CLAE (Figura 4.8) e suas estruturas determinadas por RMN de ^1H (Tabela 4.4, Figuras 4.9, 4.11, 4.13 e 4.15) e por RMN de ^{13}C (Tabela 4.5, Figuras 4.10, 4.12, 4.14 e 4.16).

Nos espectros de RMN de ^1H de **3**, **4**, **5** e **8** foram observados sinais de hidrogênios que revelaram a presença de dois anéis aromáticos que apresentaram deslocamento químico na faixa de δ 6,75–6,44 (m, 6H), δ 6,79–6,48 (m, 6H), δ 6,45–6,84 (m, 6H) e 6,84–6,46 (m, 6H), para os compostos **3**, **4**, **5** e **8** respectivamente, que representa a características de dois anéis benzênicos para cada composto. Os

singletos em δ 5,93 (2H) são característicos do grupo metilenodioxifenílicos ligado aos anéis benzênicos dos compostos **3**, **4** e **8** enquanto os sinais em δ 3,86 (s, 3H) e δ 3,83 (s, 3H) indicam a presença de duas metoxilas no composto **4** e os sinais em δ 3,85 (s, 6H) e δ 3,81 (s, 6H) a presença de três metoxilas no composto **5**. Os sinais em δ 5,52 (s, 1H) e δ 3,85 (s, 3H) são referentes aos hidrogênios de OH e metoxílico ligados ao anel aromático do composto **8**. Pôde ser constatado ainda: sinais em 3,86 (dd, 9,2 e 6,1 Hz, 1H) e 4,13 (dd, 9,2 e 6,1 Hz, 1H), que são característicos dos hidrogênios alifáticos 9' do composto **3**; os sinais em δ 3,70–3,92 (m, 1H) e δ 4,14 (m, 1H) referem-se aos hidrogênios alifáticos 9' do composto **4** e sinais em δ 3,92–3,82 (m, 1H) e δ 4,13 (dd, 9,2 e 6,6 Hz, 1H) referentes hidrogênios alifáticos 9' do composto **5**. Tais hidrogênios foram apresentados como multipletos por estarem cobertos pelos sinais dos hidrogênios metoxílicos, não sendo possível discernir a multiplicidade dos mesmos, e dois duplos dubletes em δ 3,86 (dd, 8,8 e 6,1 Hz, 1H) e em δ 4,27 (dd, 8,8 e 6,1 Hz, 1H) refere-se aos hidrogênios H-9' do composto **8**. Os hidrogênios H-7', H-8 e H-8' são identificados pelo multipeto na região de δ 2,65–2,43 (m, 4H) para o composto **3**, na região de δ 2,64–2,47 (m, 4H) para o composto **4** e na região de δ 2,57–2,49 (m, 4H) para o composto **5**. Os dois hidrogênios H-7 são identificados pelos sinais em δ 2,82 (dd, 14,5 e 4,8 Hz, 1H) e δ 2,97 (dd, 14,5 e 4,8 Hz, 1H), para o composto **3**, em δ 2,84 (dd, 14,5 e 5,7 Hz, 1H) e δ 2,97 (dd, 14,5 e 3,9 Hz, 1H), para o composto **4** e sinais em δ 2,91 (m, 2H), para o composto **5**. Enquanto os sinais como duplo dubleto em δ 2,53 (dd, 10,9 e 5,2 Hz, 2H) refere-se ao hidrogênio H-7 e o sinal do multipeto em δ 2,60–2,46 (m, 4H) aos hidrogênios H-7', H-8 e H-8', completando o anel butirolactônico do composto **8**.

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **3**, **4**, **5** e **8** os sinais dos carbonos C-7 e C-7' são observados na região $\delta\ 34,5 \pm 0,3$ e $\delta\ 38,3 \pm 0,7$, respectivamente, indicando que os substituintes benzílicos na butirolactona estão *trans* entre si. No caso de manterem uma relação *cis*, estes sinais apresentariam deslocados para campo mais alto em cerca de 4-5 ppm devido às interações gama dos átomos de hidrogênios metilênicos (Agrawal e Thakur, 1985). Os sinais na região de $\delta\ 55,80$ a $5,91$ e $\delta\ 100,98$ a $101,02$ caracterizam a presença de metoxilas ligado ao anel aromático e anel metilenodioxifenílico, respectivamente, para todos compostos. E os sinais em $\delta\ 178,34$ a $178,78$ é características da carbonila C-9 destes compostos. Outros sinais característicos do anel butirolactônico são em $\delta\ 46,44$ a $45,59$, $\delta\ 40,88$ a $41,31$ e $\delta\ 71,08$ a $71,31$ referentes aos carbonos C-8, C-8' e C-9', respectivamente de todos compostos.

A lignana **3**, identificado como sendo hinokinina, foi isolado das folhas de *P. richardiaefolium*. Esta lignana foi isolada anteriormente de espécies de Myristicaceae (Vidigal, 1993) e *Chamaecyparis obtusa* (Takaku *et al.*, 2001). A lignana **4**, identificado como sendo kusunokinina foi isolado anteriormente de espécies de Myristicaceae (Vidigal, 1993), *Piper chaba* (Connolly *et al.*, 1995). A lignana **5**, identificado como sendo arctigenina, foi isolado anteriormente da família Thymelacaceae cuja espécie é *Wikstroemia indica* (Suzuki *et al.*, 1982). A lignana **8**, identificada como sendo lignana haplomirfolina foi isolado dos frutos de *P. richardiaefolium*. Esta lignana, isolada anteriormente da família Cupressaceae, espécie *Chamaecyparis obtusa* (Takaku *et al.*, 2001) e da espécie *Haplophyllum myrtifolium* uma Rutaceae (Evcim *et al.*, 1986). Os dados de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram conferidos com as referências citadas e Wenkert *et al.*, 1976.

Figura 4.8. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos hinokina (3), kusunokina (4), arctigenina (5) e haplomirfolina (8).

Tabela 4.4. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas hinokinina (**3**), kusunokinina (**4**), arctigenina (**5**) e haplomirfolina (**8**) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).

Hidrogênios	3 hinokinina	4 kusunokinina	5 arctigenina	8 Haplomirfolina
Ar-H	6,75-6,44 (m, 6H)	6,79-6,48 (m, 6H)	6,45–6,84 (m, 6H)	6,84–6,46 (m, 6H)
H ₇	2,82 (dd, 14.48 e 6.16, 1H) 2,97 (dd, 14.48 e 4.82, 1H)	2,84 (dd, 14.48 e 6.16, 1H) 2,97 (dd, 14.48 e 3.92, 1H)	2,91 (m, 2H)	2,53 (dd, 10.9 e 5.2, 2H)
H _{7'}				
H ₈	2,65–2,43 (m, 4H)	2,64–2,47 (m, 4H)	2,57–2,49 (m, 4H)	2,60–2,46 (m, 4H)
H _{8'}				
H _{9'}	3,86 (dd, 9.22 e 6.58, 1H) 4,13 (dd, 9.22 e 6.19, 1H)	3,70–3,92 (m, 1H) 4,14 (m, 1H)	3,92–3,82 (m, 1H) 4,13 (dd, 9.2 e 6.6, 1H)	3,86(dd, 8.78 e 6.16, 1H) 4,27(dd, 8.78 e 6.16, 1H)
-OMe	-	3,86 (s, 3H) 3,83 (s, 3H)	3,85 (s, 3H) 3,81 (s, 6H)	3,85 (s, 3H)
-O ₂ CH ₂	5,93 (s, 2H)	5,93 (s, 2H)	-	5,94 (s, 2H)
-OH				5,52 (s, 1H)

Tabela 4.5. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas hinokinina (**3**), kusunokinina (**4**), arctigenina (**5**) e haplomirfolina (**8**) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 50 MHz).

Carbonos	3 hinokinina	4 kusunokinina	5 arctigenina	8 haplomirfolina
1	131,60	131,39	129,48	129,75
1'	131,35	130,45	130,42	131,38
2	108,80	109,47	111,65	110,96
2'	109,42	111,80	111,50	108,20
3	147,89	147,91	147,80	146,55
3'	147,89	149,14	148,98	148,88
4	146,37	146,48	144,52	144,41
4'	146,48	147,98	146,68	147,85
5	108,32	108,17	111,17	114,48
5'	108,26	111,42	111,40	109,48
6	122,21	122,26	122,09	121,28
6'	121,52	120,65	120,55	122,26
7	34,83	34,78	34,49	34,76
7'	38,36	38,26	38,16	38,33
8	46,47	46,45	46,59	46,44
8'	41,28	41,23	40,88	41,31
9	178,34	178,45	178,78	178,55
9'	71,08	71,21	71,31	71,24
OMe	-	55,91 e 55,80	55,85	55,80
O ₂ CH ₂	100,98	101,01	-	101,02

Figura 4.9. Espectro de RMN de ¹H da hinokinina (3) 200 MHz, CDCl₃.

Figura 4.10. Espectro de RMN de ¹³C da hinokinina (3) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.11. Espectro de RMN de ¹H da kusunokinina (4) 200 MHz, CDCl₃.

Figura 4.12. Espectro de RMN de ¹³C da kusunokinina (4) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.13. Espectro de RMN de ¹H da arcigenina (5) 200 MHz, CDCl₃

Figura 4.14. Espectro de RMN de ¹³C da arcigenina (5) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.17. Espectro de massas (EI) da haplomirfolina (8).

Figura 4.18. Interpretação do espectro de massas da haplomirfolina (8).

4.1.1.3. Lignanas dibenzilbutirolactólicas

As lignanas dibenzilbutirolactólicas **6** (cubebina) e **7** (3',4'-dimetóxi-3,4-desmetilenodioxicubebina) foram isoladas das folhas de *P. richardiaefolium*.

As lignanas foram analisadas por CLAE (Figura 4.19) e suas estruturas determinadas através das análises dos dados de RMN de ^1H (Tabela 4.6, Figuras 4.20 e 4.22) e de RMN de ^{13}C (Tabela 4.7, Figuras 4.21 e 4.23).

cubebina (**6**)

3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina (**7**)

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais de hidrogênios na faixa de δ 6,73-6,50 (m, 12H) que revelaram a presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos. Estes sinais juntamente com os sinais em δ 5,91 (s, 8H) sugeriram a presença de dois grupos piperonílicos na lignana **6**. O singlete em δ 5,91 (s, 4H), observado no espectro de RMN de ^1H do composto **7** foi atribuído ao grupo metilenodioxifenílico, e os singletos em δ 3,81 (6H) e δ 3,86 (6H) aos hidrogênios metoxílicos e, portanto, sugerindo a presença de um grupo piperonílico e um grupo veratrílico em **7**. O número de hidrogênios está duplicado pelo fato de se tratar de dois isômeros de cada composto.

O singlete largo em δ 5,21 (2H) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico H-9 da estrutura **6** e o singlete largo em δ 5,24 (2H) atribuído ao

hidrogênio ligado ao carbono carbinólico H-9 da estrutura **7**. Observa-se um sinal na região de δ 4,09–3,52 (m, 4H) e δ 4,13–3,54 (m, 4H) referentes aos hidrogênios H-9' dos compostos **6** e **7**, respectivamente. Além disso, foram também observados, para cada composto, sinais relativos a oito hidrogênios benzílicos H-7 e H-7' e quatro hidrogênios metílicos H-8 e H-8'.

O composto **6**, identificado como sendo cubebina, isolada anteriormente de várias espécies de *Piper*, entre elas a *P. cubeba* (Bharathi e Newand, 1985) e a *P. cernuum* (Danelutte *et al.*, 2005). A lignana **7**, identificada como sendo 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina, isolado anteriormente da espécie *Virola michelii* Heckel (Vidigal, 1993).

Figura 4.19. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos cubebina (6) e 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina (7).

Tabela 4.6. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das lignanas cubebina (**6**), 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina (**7**) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).

Hidrogênios	6 cubebina	7 3',4'-dimetoxi-3,4- desmetilenodioxicubebina
Ar-H	6,73 – 6,50 (m, 12H)	6,80 – 6,52 (m, 12H)
H ₇		
H _{7'}	2,76 – 2,39 (m, 10H)	2,80 – 2,41 (m, 10H)
H _{8'}		
	2,13 (m, 4H)	2,19 – 2,12 (m, 4H)
H ₈		
H ₉	5,20 (sl, 2H)	5,22 (m, 2H)
H _{9'}	4,09 - 3,52 (m, 4H)	4,13 – 3,54 (m, 4H)
-OMe	-	3,86 (s, 6H) 3,84 (s, 6H)
-OC ₂ H ₂	5,91 (s, 8H)	5,91 (s, 4H)

Tabela 4.7. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C das lignanas cubebina (6), 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina (7) isoladas de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 50 MHz).

Carbonos	6		7	
	cubebina		3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxycubebina	
	A	B	A	B
1	134,48	134,09	134,55	133,34
1'	133,27	133,83	132,68	132,98
2	109,09	108,91	108,11	107,98
2'	109,34	109,17	111,27	111,27
3	147,58	147,66	147,44	147,68
3'	147,66	147,48	148,99	148,88
4	145,68	145,73	145,93	145,93
4'	145,68	145,86	147,44	147,55
5	108,83	108,83	109,29	109,14
5'	108,04	108,04	111,35	111,85
6	121,57	121,70	121,58	121,71
6'	121,37	121,37	120,52	120,35
7	33,55	39,13	33,59	39,09
7'	38,83	38,36	38,73	38,37
8	51,93	53,00	52,06	53,11
8'	42,83	45,83	42,80	45,88
9	98,75	103,34	98,83	103,37
9'	72,52	72,13	72,63	72,26
OMe	-	-	55,86	
			55,70	
O_2CH_2	100,73	100,88	100,75	100,85

Figura 4.20. Espectro de RMN de ¹H da cubebina (**6**) 200 MHz, CDCl₃

Figura 4.21. Espectro de RMN de ¹³C da cubebina (**6**) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.23. Espectro de RMN de ^{13}C da 3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxibebina (7) 50 MHz, CDCl_3 .

4.1.1.4. Cinamatos de bornila

Foram identificados dos frutos de *P. richardiaefolium* dois compostos de biossíntese intermediária. O ferulato de bornila (**9**) e o cumarato de bornila (**10**).

Os compostos foram analisados por CLAE (Figura 4.24) e suas estruturas determinadas por RMN de ^1H (Tabela 4.8, Figuras 4.25 e 4.27) e por RMN de ^{13}C (Tabela 4.9, Figuras 4.26 e 4.28) e espectrometria de massas (Figuras 4.29 e 4.30).

ferulato de bornila (**9**)

cumarato de bornila (**10**)

Os espectros de RMN de ^1H dos dois compostos apresentam sinais em comuns tais como sinais em δ 0,87 para os hidrogênios H-10' (s, 3H), δ 0,89 (s, 3H) para os hidrogênios H-9' e δ 0,94 (s, 3H) para os hidrogênios H-8' de ambos os compostos. Podem ser observados também sinais em δ 1,35 (m, 1H) e δ 2,03 (m, 1H) referentes aos hidrogênios H-6', sinais em δ 1,31 (m, 1H) e δ 1,75 (m, 1H) referentes aos hidrogênios H-5', sinal em δ 1,70 (t, 4,2Hz, 1H) referente aos hidrogênios H-4', sinais em δ 1,05 (dd, 13,2, 3,5Hz, 1H) e δ 2,42 (m, 1H) referentes aos hidrogênios H-3' e também sinais em δ 5,0 (ddd, 10,1, 3,5, 2,2Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-2'. Estes sinais em ambos compostos são característicos do grupo bornila. Os sinais em δ 6,3 (d, 15,8Hz, 1H) e δ 7,6 (d, 15,8Hz, 1H) são referentes ao H-8 e H-7, respectivamente, em ambos os compostos **9** e **10**. O valor

da constante de acoplamento (15,8Hz) dos sinais dos hidrogênios H-8 e H-7 indica uma estereoquímica *trans* para ambos compostos. Os sinais em δ 6,9 (d, 8,3Hz, 1H), δ 7,0 (dd, 8,3, 1,7Hz, 1H) e δ 7,1 (d, 1,7Hz, 1H) referem-se aos hidrogênios H-5, H-6 e H-2, respectivamente, do composto **9**. Enquanto o sinal em δ 6,8 (d, 8,7Hz, 2H) refere-se aos hidrogênios H-3 e H-5, e o sinal em δ 7,4 (d, 8,3Hz, 2H) aos hidrogênios H-2 e H-6 do composto **10**

Os espectros de RMN de ^{13}C de ambos os compostos **9** e **10** apresentam sinais comuns, que se referem aos sinais dos hidrogênios do grupo bornila ligados, formando os ésteres correspondentes. Os sinais em δ 13,5; 18,8; 19,7; 27,2; 28,0; 36,8; 44,9; 47,8 e 48,9 correspondem, respectivamente, aos carbonos C-10', C-8', C-9', C-6', C-5', C-3', C-4', C-7' e C-1' dos compostos **9** e **10**. O carbono C-2' exibe um sinal em δ 79,8 para o composto **9** e em δ 80,1 para o composto **10**. Os sinais em δ 167,6 e em δ 168,2, que são observados nos espectros dos compostos **9** e **10**, respectivamente, são característicos dos carbonos carbonílicos C-9 das estruturas sugeridas. Os sinais que correspondem aos carbonos C-7 aparecem em δ 144,2 para o composto **9** e em δ 144,3 para o composto **10**. Enquanto os sinais dos carbonos C-8 aparecem em δ 116,1 para o composto **9** e em δ 115,8 para o composto **10**, finalizando assim a parte alifática dos compostos. Entre os sinais do sistema aromático do composto **9**, pode-se notar um sinal em δ 146,7 de baixa intensidade para o carbono C-3, sugerindo uma substituição do hidrogênio ligado a este carbono, o que é confirmado pela observação de sinal em δ 55,9 da metoxila ligada ao sistema aromático. Outro sinal de baixa intensidade é observado em δ 127,0 e se refere ao carbono C-1, substituído pela cadeia alifática. Os demais sinais do sistema aromático, do composto **9**, são observados em δ 109,2; 114,6; 123,0 e 147,8 para os carbonos C-2, C-5, C-6 e C-4, respectivamente. Entre os sinais do

sistema aromático para o composto **10**, podem-se notar dois sinais de grande intensidade localizados em δ 115,7 para os carbonos C-3 e C-5 e em δ 129,9 para os carbonos C-2 e C-6. Os outros dois sinais de baixa intensidade são observados em δ 126,8 para o carbono C-1 e em δ 158,1 para o carbono C-4.

O composto **9**, identificado como ferulato de bornila, foi isolado anteriormente de *Conocephalum conicum*, uma Marchantiales (Suire *et al.*, 1982). O composto **10**, identificado como cumarato de bornila, foi também isolado de *Conocephalum conicum* (Toyota *et al.*, 1997).

A figura 4.24 mostra os cromatogramas, obtido por CLAE, dos compostos **9** e **10**.

Figura 4.24. Cromatogramas, obtidos por CLAE, do ferulato de bornila (**9**) e cumarato de bornila (**10**).

Tabela 4.8. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H do ferulato de bornila (**9**) e do cumarato de bornila (**10**) isolados de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).

Hidrogênios	9	10
	ferulato de bornila	cumarato de bornila
H ₂	7,10 (d, 1,7, 1H)	7,43 (d, 8,3, 2H)
H ₃	-	6,86 (d, 8,7, 2H)
H ₅	6,91(d, 8,1, 1H)	6,86 (d, 8,7, 2H)
H ₆	7,05 (dd, 8,1, 1,7, 1H)	7,43 (d, 8,3, 2H)
H ₇	7,60 (d, 15,8, 1H)	7,62 (d, 15,8, 1H)
H ₈	6,32(d, 15,8, 1H)	6,33 (d, 15,8, 1H)
H _{2'}	5,0 (ddd, 9,6, 3,0 e 1,7, 1H)	5,0 (ddd, 9,6, 3,0 e 1,7, 1H)
H _{3'}	2,42 (m, 1H)	2,42 (m, 1H)
	1,05 (dd, 13,2, 3,5, 1H)	1,05 (dd, 13,6, 3,6, 1H)
H _{4'}	1,70 (t, 4,2 1H)	1,70 (t, 4,2 1H)
H _{5'}	1,75(m, 1H)	1,75(m, 1H)
	1,31(m, 1H)	1,31(m, 1H)
	1,35 (m, 1H)	1,35 (m, 1H)
H _{6'}	2,03 (m,1H)	2,03 (m,1H)
	0,94 (s, 3H)	0,93 (s, 3H)
H _{8'}	0,89 (s, 3H)	0,89 (s, 3H)
H _{9'}	0,88 (s, 3H)	0,87 (s, 3H)
H _{10'}	0,88 (s, 3H)	0,87 (s, 3H)
OH	5,96 (s, 1H)	-
-OMe	3,93 (s, 3H)	-

Tabela 4.9. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C do ferulato de bornila (**9**) e do cumarato de bornila (**10**) isolados de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 50 MHz).

Carbonos	9	10
	ferulato de bornila	cumarato de bornila
1	127,08	126,89
2	109,27	129,95
3	146,73	115,72
4	147,82	158,16
5	114,68	115,72
6	123,02	129,95
7	144,29	144,39
8	116,13	115,89
9	167,63	168,29
1'	48,92	48,92
2'	79,81	80,13
3'	36,86	36,82
4'	44,94	44,90
5'	27,23	27,19
6'	28,07	28,02
7'	47,84	47,82
8'	18,88	18,83
9'	19,73	19,70
10'	13,55	13,53
OMe	55,93	-

Figura 4.25. Espectro de RMN de ¹H do ferulato de bornila (9) 200 MHz, CDCl₃.

Figura 4.26. Espectro de RMN de ¹³C do ferulato de bornila (9) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.27. Espectro de RMN de ¹H do cumarato de bornila (**10**) 200 MHz, CDCl₃.

Figura 4.28. Espectro de RMN de ¹³C do cumarato de bornila (**10**) 50 MHz, CDCl₃.

Figura 4.29. Espectro de massas do ferulato de bornila (9).

Figura 4.30. Espectro de massas (EI) do cumarato de bornila (10).

Figura 4.31. Interpretação dos espectros de massas do ferulato de bornila (**9**) e do cumarato de bornila (**10**).

4.1.1.5. Amidas

Foram identificadas, em mistura, nos frutos de *P. richardiaefolium* duas amidas, a piplartina (**11**) e a diidropiplartina (**12**).

Os compostos foram analisados por CLAE (Figura 4.32) e suas estruturas determinadas por RMN de ^1H (Tabela 4.9, Figura 4.33) e por RMN de ^{13}C (Tabela 4.10, Figura 4.34) e espectrometria de massas (Figuras 4.35, 4.36 e 4.37).

piplartina (**11**)

diidropiplartina (**12**)

Os compostos **11** e **12** foram identificados como pertencentes à classe das amidas piperidônicas e diferem apenas quanto à cadeia alifática (C-8 e C-9) que pode apresentar-se saturada ou insaturada com configuração *trans*.

No espectro de RMN de ^1H da mistura de **11** e **12** observam-se sinais correspondentes à ligação dupla de configuração *trans*, indicada pelos deslocamentos químicos em δ 7,4 (*d*, 15,6 Hz, 1H) e δ 7,68 (*d*, 15,6 Hz, 1H) da amida **11** e sinais correspondentes à ligação simples entre os carbonos C-8 e C-9, indicados pelos deslocamentos químicos em δ 3,24 (*t*, 7,7 Hz, 2H) e δ 2,94 (*t*, 7,7 Hz, 2H), respectivamente da amida **12**. O espectro de RMN de ^{13}C da mistura de **11** e **12** mostra os sinais dos respectivos carbonos em δ 120,9 (C-8) e δ 143,6 (C-9) da

amida **11** e foram observados seus respectivos sinais em δ 40,8 (C-8) e δ 31,4 (C-9) da amida **12**.

No espectro de hidrogênio da mistura das amidas **11** e **12** foram observados duplos tripletos em torno de δ 6,05 (9,7 e 1,8Hz, H-3), um multiplete em torno de δ 6,95 (H-4), multipletos em δ 2,49 (H-5) e um triplete em δ 4,04 (6,4Hz, H-6), que referem-se a presença de um anel 2-piperidônico para estas estruturas.

O padrão de substituição dos anéis aromáticos para as duas amidas foi identificado como sendo 3',4',5'-tetrassubstituído e simétrico. Os substituintes nas posições 3',4',5' foram determinados como sendo metoxilas com base nos singletos observados nos espectros de RMN de ^1H em torno de δ 3,83 e também nos singletos em torno de δ 6,80 para **11** e δ 6,47 para **12**, correspondentes aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-6'.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para as amidas **11** e **12** foram comparados com os da literatura (Duh e Wang, 1990; Maxwell e Rampersad, 1991).

Os espectros de massas dos compostos **11** e **12** comprovaram as estruturas moleculares propostas para estes compostos. Os picos em 317 e 319 foram compatíveis com as fórmulas moleculares $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ e $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, respectivamente. Os espectros de massas apresentaram ainda os íons fragmentários compatíveis com as estruturas da piplartina 274(22), 190 (26), 205 (17) e 221 (100), e da diidropiplartina 222 (97), 194 (53), 207 (23), 151 (21), 98 (31), 136 (21) e 170 (100).

O composto **11**, identificado como piplartina foi isolado anteriormente de *Piper arborescens* (Duh *et al.*, 1990) e de *Piper tuberculatum* (Silva *et al.*, 2002). O composto **12**, identificado como diidropiplartina foi isolado anteriormente de *Piper tuberculatum* (Silva *et al.*, 2002).

Figura 4.32. Cromatogramas obtidos por CLAE da piplartina (**11**) e diidropiplartina (**12**).

Tabela 4.10. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H da mistura das amidas piplartina (**11**) e diidropiplartina (**12**) de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 200 MHz, J em Hertz).

Hidrogênios	11 piplartina	12 diidropiplartina
H ₃	6,05 (dt, 9.66 e 1.81)	6,01 (encoberto)
H ₄	6,95 (m, 1H)	6,95 (m, 1H)
H ₅	2,52 (m, 2H)	2,48 (m, 2H)
H ₆	4,04 (t, 6.4, 2H)	3,92 (t encoberto)
H ₈	7,4 (d, 15.6, 1H)	3,24 (t 7.7, 2H)
H ₉	7,68 (d, 15.6, 1H)	2,94 (t 7.7, 2H)
H _{2'} e H _{6'}	6,80 (s, 2H)	6,47 (s, 2H)
H _{4'} -OMe	3,85 (s, 3H)	3,79 (s, 3H)
H _{3'} e H _{5'} -OMe	3,87 (s, 6H)	3,83 (s, 6H)

Tabela 4.11. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da mistura das amidas piplartina (**11**) e diidropiplartina (**12**) de *P. richardiaefolium* (CDCl_3 , δ , 50 MHz).

Carbonos	11	12
	piplartina	diidropiplartina
2	165,78	165,78
3	125,67	125,53
4	145,52	145,24
5	24,69	24,53
6	41,56	40,92
7	168,78	175,42
8	120,99	40,82
9	143,65	31,45
10	130,54	136,87
2'	105,33	106,46
3'	153,22	152,97
4'	139,82	143,38
5'	152,96	153,22
6'	105,28	105,33
3'-OMe	55,95	56,05
4'-OMe	60,74	60,87
5'-OMe	55,95	56,05

Figura 4.33. Espectro de RMN de ^1H da piplartina (11) e diidropiplartina (12) 200 MHz, CDCl_3 .

Figura 4.34. Espectro de RMN de ^{13}C da piplartina (11) e diidropiplartina (12) 50 MHz, CDCl_3 .

Figura 4.35. Espectro de massas (EI) da piplartina (11).

Figura 4.36. Espectro de massas (EI) da diidropiplartina (12).

Figura 4.37. Interpretação dos espectros de massas da piplartina (**11**).

4.2. Óleos voláteis das folhas de *Piper richardiaefolium*

Com a finalidade de avaliar a composição do óleo volátil, 100 g das folhas de *Piper richardiaefolium* foram submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Obteve-se 73 mg de óleo volátil, tendo 0,073 % de rendimento. O óleo foi analisado por cromatografia a gás em coluna capilar OV-5 de 30 m, um detector por ionização em chama e nas condições descritas no item 3.1.

Para a identificação das substâncias presentes no óleo volátil foram utilizadas técnicas de CG-EM e índice de retenção de Kováts. A tabela 4.12 apresenta as substâncias identificadas no óleo de *P. richardiaefolium* e o cromatograma do óleo com os sinais identificados para as substâncias correspondentes estão apresentados na figura 4.38A e ampliação na figura 4.38B.

Os óleos essenciais são produtos vegetais constituídos de terpenóides, lignóides e outras substâncias voláteis. Independente de sua constituição química, os óleos voláteis estão depositados em estruturas anatômicas que evoluíram de células oleíferas, cavidades e canais secretores a pelos glandulares. Na divisão vegetal, os óleos voláteis são considerados características primitivas que foram substituídas por outros sistemas defensivos com a evolução. O caráter alelopático de defesa ou atração de polinizadores dos óleos voláteis é extensamente abordado na literatura (Gottlieb e Salatino, 1987)

Figura 4.38. Cromatograma do óleo das folhas de *Piper richardiae* folium A e ampliação B.

Tabela 4.12. Substâncias identificadas no óleo volátil de *P. richardiaefolium*.

Substâncias	Nome	TR	Porcentagem
1	β -borboneno	27,318	2,590
2	β -cubebeno	27,703	0,943
3	β -elemeno	27,912	1,368
4	<i>E</i> -cariofileno	29,167	4,575
5	γ -cariofileno	29,520	1,497
6	gemacreno D	29,950	3,353
7	nerolidol	30,840	13,196
8	globulol	31,392	4,504
9	espatulenol	31,842	3,133
10	apiol	32,192	7,226
11	fitol	32,312	8,516

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

4.3. Análise de componentes principais (PCA) de algumas espécies de piperaceae.

O estudo inicial da PCA para as onze espécies foi iniciado com quatro amostras das espécies as quais se pretendia trabalhar (*P. richardiaefolium* - k 350, *P. pseudopotifolium* - k 211, *P. cernuum* - k 137 e *P. truncatum* - k 112) e a inserção de dezesseis amostras de espécies ainda do gênero *Piper*.

Pôde-se notar no diagrama de similaridade (Figura 4.39) que as quatro espécies supracitadas apresentaram isoladas em um grupamento com o maior grau de simiralidade. Desta forma, iniciou-se o trabalho analisando juntamente com as quatro anteriores, outras sete espécies cujas folhas possuíam o mesmo formato e tamanhos diferentes.

Figura 4.39. Diagrama de similaridade (dendrograma) da análise de “cluster” para as 20 amostras de extratos de espécies de *Piper*.

A análise foi realizada e um gráfico dos deslocamentos químicos foi plotado para observar a contribuição dos mesmos na análise dos componentes principais (Figura 4.40).

Figura 4.40. Distribuição dos deslocamentos químicos das amostras.

De acordo com a Análise Hierárquica de Clusters (AHC) as amostras foram divididas em dois grupos principais e quatro subgrupos (Figura 4.41 e 4.42). O primeiro grupo principal é formado pelas espécies *P. truncatum* - k 616, *P. richardiaefolium* - k 290, *P. richardiaefolium* - k 350, *P. richardiaefolium* - k 593, *P. truncatum* - k 597 e *P. pseudopotifolium* - k 598. Este grupo possui uma similaridade entre as espécies de 34,06 %. Destacou-se neste grupo o subgrupo formado pelas espécies *P. richardiaefolium* - k 290 e *P. richardiaefolium* - k 350, com uma similaridade entre elas de 51,9 %. Esta similaridade pôde ser observada na figura 3.12 onde os espectros mostraram se muito parecidos, e na figura 4.41. Outro subgrupo a se destacar foi o das espécies *P. truncatum* - k 597 e *P. pseudopotifolium* - k 598, que mostrou uma similaridade de 48,7 % entre elas.

O segundo grupo principal é formado pelas espécies *P. richardiaefolium* - k 854, *P. richardiaefolium* - k 610, *P. truncatum* - k 112, *P. pseudopotifolium* - k 211 e *P. cernuum* - k 137. Neste grupo a similaridade entre as espécies foi de 24,6 %. Destacou-se neste grupo, o subgrupo formado pelas espécies *P. pseudopotifolium* - k 211 e *P. cernuum* - k 137 que apresentou uma similaridade de 61,2 % e o subgrupo formado pelas espécies *P. richardiaefolium* - k 854 e *P. richardiaefolium* - k

610 que apresentou uma similaridade de 48,3 %. Este último subgrupo apresentou com a *P. truncatum* - k 112 uma similaridade de 44,9%.

Desta forma, pôde-se notar que, as espécies *P. richardiaefolium* - k .854 e *P. richardiaefolium* - k 350/290 embora possuindo a mesma classificação e tamanho e formas muito próximas nas folhas, apresentaram pela AHC uma divergência significativa entre elas dentro do grupo principal. Por outro lado, as espécies *P. pseudopotifolium* - k 211 (folhas com dimensões média de 8 x 20 cm) e *P. cernuum* - k 137 (folhas com dimensões média de 20 x 50 cm) e classificações distintas, mostraram-se mais semelhantes em relação ao segundo grupo principal e à todas as espécies analisadas.

Figura 4.41. Diagrama de similaridade (dendrograma) da análise de “cluster” para as onze amostras.

Figura 4.42. Gráfico de “scores” da amostras de *Piper*.

4.4. Estudo de ligninas

Para os estudos das ligninas existente em cada espécie de *Piper* foram selecionados alguns métodos para a análise quantitativa e qualitativa. Os métodos de análise quantitativa foram escolhidos o método de Klason, método de Björkman e o método de oxidação por nitrobenzeno.

O método Klason basea-se na digestão parcial da madeira com H_2SO_4 a 72%, que fornece a lignina como resíduo (Anterola e Lewis, 2002)

O método de Björkman basea-se na extração com dioxano:água (95:5). Este método fornece a lignina de uma forma menos alterada quando comparado a outros métodos. Desta forma ele foi escolhido também para a análise qualitativa (Björkman, 1956).

O método de oxidação por nitrobenzeno basea-se no tratamento fortemente alcalino à temperatura elevada, fornecendo como produtos os aldeídos correspondentes às unidades siringila e guaiacila, que podem ser quantificados através do cálculo da proporção das unidades resultantes (Billa *et al.*, 1996; Anterola e Lewis, 2002).

4.4.1. Determinação quantitativa

4.4.1.1. Determinação quantitativa de lignina de Klason

Com as massas dos resíduos obtidos após a operação de extração das ligninas insolúveis de Klason, foi possível calcular o rendimento e a quantidade de ligninas insolúveis presentes no caule das espécies vegetais.

As massas e porcentagens dos resíduos correspondentes às ligninas insolúveis de Klason, a partir de 2,1 g do caule, estão ilustrado na tabela 4.12.

Tabela 4.13. Massa e rendimento do resíduo obtido do caule das espécies estudadas utilizando o método de Klason.

Espécie	Massa do resíduo (mg)	Rendimento (%)
<i>Piper regnellii</i>	407	19,3
<i>Piper solmsianum</i>	392	18,6
<i>Piper aduncum</i>	517	24,6
<i>Piper richardiaefolium</i>	375	17,8
<i>Piper cernuum</i>	382	18,2
<i>Piper malacophyllum</i>	389	18,5

Considerando esta percentagem e o fato de que no material também existe a ocorrência de ligninas solúveis, o resultado obtido está de acordo com o que é relatado na literatura (Sarkanen e Herbert, 1971).

De acordo com a tabela 1, pôde-se verificar um maior rendimento para a *P. aduncum* e um menor rendimento para a *P. richardiaefolium*.

4.4.1.2. Determinação quantitativa de lignina de Björkman

Após a extração das ligninas, segundo o método de Bjorkman, obteve-se um pó fino amorfo conforme figura 4.43 e verificaram-se os seguintes rendimentos, a partir de 100 g de caule triturado de cada espécie (tabela 2).

Figura 4.43. Foto do pó do caule de uma das espécies de *piper* livre de extrativos e da lignina isolada pelo método de Bjorkman.

Tabela 4.14. Massa e rendimento do resíduo obtido do caule das espécies estudadas utilizando o método de Bjorkman.

Espécie	Massa do resíduo (mg)	Rendimento (%)
<i>Piper regnellii</i>	185	0,18
<i>Piper solmsianum</i>	115	0,11
<i>Piper aduncum</i>	335	0,33
<i>Piper richardiaefolium</i>	214	0,21
<i>Piper cernuum</i>	225	0,22
<i>Piper malacophyllum</i>	148	0,14

Uma observação a ser feita é que as espécies não são espécies arbóreas, logo, seus caules são pouco lignificados, o que ocasiona um rendimento inferior na extração das ligninas solúveis de madeira moída.

4.2.1.3. Determinação quantitativa de lignina por oxidação por nitrobenzeno

A determinação quantitativa das ligninas por oxidação por nitrobenzeno foi realizada baseando-se no cálculo da razão entre os monômeros siringil e guaiacil obtidos através da reação de oxidação por nitrobenzeno.

Para a análise dos produtos de oxidação foram utilizados padrões de vanilina e siringaldeído. Estes padrões foram utilizados pelo fato de que a oxidação de madeira tem como produtos principais a vanilina, o siringaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído (Freudemberg, 1968; Billa *et al.*, 1996). A proporção desses produtos de degradação irá depender da espécie em estudo e do grau de maturação.

Através da injeção dos padrões construiu-se uma curva de calibração e fez-se a injeção e leitura dos produtos de reação utilizando um sistema CLAE.

Uma amostra da lignina de *Eucalyptus grandis* foi também submetida à reação e análise para comparação com os produtos obtidos dos caules de *Piper*.

As leituras e os resultados dos cálculos das razões são mostrados na tabela 4.14.

Tabela 4.15. Relação entre os monômeros siringil (S) e guaiacil (G) por oxidação por nitrobenzeno.

Amostras		Relação S/G (mol/mol)			
		Leitura		Valores	Média
<i>P. aduncum</i>	1,323	/	0,931	1,42	1,42
	1,409	/	0,99	1,42	
<i>E. grandis</i>	2,07	/	0,849	2,43	2,39
	1,99	/	0,846	2,35	
<i>P. regnellii</i>	0,66	/	0,836	0,79	0,83
	0,782	/	0,905	0,86	
<i>P. richardiaefolium</i>	0,451	/	1,316	0,34	0,36
	0,487	/	1,319	0,37	
<i>P. solmsianum</i>	0,361	/	1,17	0,31	0,31
	0,384	/	1,203	0,32	
<i>P. cernuum</i>	0,389	/	1,191	0,33	0,31
	0,375	/	1,263	0,30	
<i>P. malacophyllum</i>	0,412	/	1,299	0,31	0,32
	0,455	/	1,313	0,34	

O *Eucalyptus grandis* é uma espécie vegetal que se encontra entre as angiospermas e possui seu caule bastante lenhoso e lignificado. Sua lignina é classificada como lignina de madeira dura (Chen, 1991; Piló-Veloso *et al.*, 1993) possuindo então uma razão entre os monômeros S e G maior que 1. Baseado nessa informação e nos resultados obtidos da análise por CLAE através da oxidação por nitrobenzeno pôde-se verificar que a *P. aduncum* possui em seu caule lignina

tipicamente de madeira dura, que a *P. richardiaefolium*, *P. solmsianum*, *P. malacophyllum*, *P. cernuum* e *P. regnellii* possuem caules lignina tipicamente de madeira mole. Sendo que a *P. regnellii* se aproxima um pouco da lignina de madeira dura.

4.2.1.4. Análise elementar, determinação do conteúdo de metoxilas e determinação da fórmula mínima.

A análise elementar foi feita na central analítica do IQ-USP, com o objetivo de conhecer a composição de carbono, hidrogênio e oxigênio das ligninas. Os resultados são mostrados na tabela 4.16.

Na determinação do conteúdo de metoxilas pôde-se observar que as ligninas de todas as espécies estudadas apresentaram um teor de metoxilas equivalentes aos de madeira dura (Tabela 4.15). Estes valores estão de acordo com a classificação das espécies, onde ligninas de madeira dura contém um teor de metoxilas entre 18 e 22% . No entanto foi possível observar que as ligninas de *P. regnellii* e *P. aduncum* apresentaram valores de teor de metoxilas bem elevado em relação às demais. Estes resultados corroboram com os obtidos pela determinação por oxidação por nitrobenzeno.

Tabela 4.16. Dados analíticos e fórmula mínima por unidade C₉ para as ligninas em espécies de *Piper*.

Espécie	% C	% H	% O	% OCH ₃	Formula elemental/C ₉
<i>P. regnellii</i>	55,01	5,90	38,33	20,7	C ₉ H _{8,8} O _{3,97} (OCH ₃) _{1,53}
<i>P. solmsianum</i>	55,53	5,20	38,26	18,9	C ₉ H _{7,45} O _{3,99} (OCH ₃) _{1,36}
<i>P. richardiaefolium</i>	57,41	5,67	35,92	18,7	C ₉ H _{8,20} O _{3,54} (OCH ₃) _{1,30}
<i>P. aduncum</i>	51,30	5,51	43,05	23,0	C ₉ H _{8,24} O _{4,97} (OCH ₃) _{1,89}
<i>P. cernuum</i>	56,54	5,39	38,04	19,3	C ₉ H _{7,65} O _{3,86} (OCH ₃) _{1,36}
<i>P. malacophyllum</i>	56,38	5,46	37,99	18,5	C ₉ H _{7,95} O _{3,90} (OCH ₃) _{1,31}

4.4.2. Determinação qualitativa

As angiospermas caracterizam-se por produzirem ligninas possuindo os grupos aromáticos guaiacila e siringila, como é mostrado abaixo, em sua estrutura em diferentes proporções (Abreu, 1994). Para identificar esses grupos aromáticos substituídos foram utilizadas as técnicas de IV e RMN. Para a obtenção da lignina necessária para a determinação qualitativa foi escolhido o método de Björkman.

Resíduo guaiacila

Resíduo siringila

4.2.2.1. Análise de lignina isolada pelo método de Bjorkman por espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros das ligninas das espécies *P. regnellii* (PR), *P. solmsianum* (PS), *P. aduncum* (PAD), *P. richardiaefolium* (PRI) e *P. cernuum* (PCE) (Figuras 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48 e 4.49 e Tabela 4.16) foram obtidos em pastilha de KBr.

Nos espectros no IV podem-se destacar alguns sinais para a atribuição. Nesses espectros no IV a banda de absorção com ν em 1328 cm^{-1} foi atribuída à respiração do anel siringílico com contribuição do estiramento C=O e de estruturas condensadas. A banda de absorção com ν em $1268\text{-}1266\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à respiração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O. A banda de absorção com ν em $1131\text{-}1124\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à deformação de C-H típico de anel siringílico. A banda de absorção com ν em $1033\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à deformação no plano de C-H do anel guaiacílico, mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado.

Tabela 4.17. Atribuições dos sinais nos espectros no IV das ligninas originais PRE, PSO, PAD, PRI, PCE e PMA.

1/λ						Atribuições
PRE	PSO	PAD	PRI	PCE	PMA	
3435	3434	3431	3418	3434	3431	Estiramento O-H.
2938	2936	2936	2924	2940	2940	Estiramento de C-H dos grupos metoxílicos.
2846	2849	2846	2850	2845		
		1723		1722	1721	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas e em aldeídos
1657	1660			1660	1657	conjugados.
1594	1595	1595	1602	1595	1596	Vibração do esqueleto aromático com estiramento C=O.
1507	1509	1505	1510	1509	1509	Vibração do esqueleto aromático
1463	1463	1461	1460	1462	1461	Deformação assimétrica em CH ₃ e CH ₂ .
1422	1422	1422	1424	1423	1423	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel.
1328	1328	1328	1328	1328	1328	Respiração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas.
1266	1267	1268	1268	1268	1268	Respiração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O.
1223	1222	1227	1224	1221	1221	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível a substituição do anel aromático.
1125	1129	1124	1126	1131	1131	Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico).
1088	1087	1078		1088	1085	Deformação de C-O de álcool secundário e de éter alifático.
1030	1030	1033	1032	1031	1032	Deformação (no plano) de C-H do anel guaiacílico.
	857	858		858	859	Deformação de C-H (fora do plano) dos H do C-2, C-5 e C-6 do anel guaiacílico.
834				829	830	Deformação de C-H (fora do plano) dos H do C-2 e C-6 do anel siringílico.
	818		822			Deformação de C-H (fora do plano) nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacílicas.

4.2.2.2. Análise de ligninas isolada pelo método de Bjorkman e acetilada, por espectroscopia na região do infravermelho

A lignina acetilada foi fundamental para a realização do experimento de RMN de ^1H e a interpretação dos espectros obtidos e contribui para a interpretação do IV da lignina original.

Os espectros das ligninas acetiladas das espécies *P. regnellii* (PREA), *P. solmsianum* (PSOA), *P. aduncum* (PADA), *P. richardiaefolium* (PRIA) e *P. cernuum* (PCEA) (Figuras 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48 e 4.49 e Tabela 4.17) foram obtidos em pastilha de KBr.

Os espectros das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA revelaram o aparecimento adicional de um sinal largo com ν em 1744-1742 cm^{-1} que corresponde ao estiramento de C=O de éster e sinais com ν em 1371 cm^{-1} e com ν em 1228-1225 cm^{-1} referentes ao estiramento de C-O de éster. O sinal com ν em 1129-1127 cm^{-1} foi atribuído à deformação no plano de C-H típico de anel siringílico. O sinal com ν em 1042-1035 cm^{-1} , foram atribuídos à deformação no plano de C-H do anel guaiacílico.

Tabela 4.18. Atribuições dos sinais dos espectros no IV das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA.

1/λ						Atribuições
PREA	PSOA	PADA	PRIA	PCEA	PMAA	
3431	3441	3444	3451	3457	3464	Estiramento O-H.
2941	2940	2943	2940	2942	2942	
2847	2845	2845	2849	2843	2843	Estiramento de C-H dos grupos metoxílicos.
1740	1740	1743	1744	1742	1742	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas e de grupo éster e/ou de grupos carboxílicos.
1637	1636	1674	1668	1673	1671	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas e em aldeídos conjugados.
1595	1595	1595	1601	1594	1595	Vibração do esqueleto aromático com estiramento C=O.
1509	1509	1507	1508	1509	1509	Vibração do esqueleto aromático
1464	1464	1462	1461	1464	1463	Deformação assimétrica em CH ₃ e CH ₂ .
1424	1423	1423	1424	1422	1423	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel.
1331	1332	1370 1332	1371 1331	1371 1331	1371 1331	Respiração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas.
1228	1226	1225	1228	1226	1226	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível a substituição do anel aromático.
1127	1129	1127	1127	1129	1129	Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico).
1035	1036	1040	1042	1035	1037	Deformação (no plano) de C-H do anel guaiacílico.
832		834	840	834		Deformação de C-H (fora do plano) dos H do C-2 e C-6 do anel siringílico.

Figura 4.44. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. regnellii*.

Figura 4.45. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. solmsianum*.

Figura 4.46. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. aduncum*.

Figura 4.47. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. richardiae* folium.

Figura 4.48. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. cernuum*.

Figura 4.49. Espectros no IV (KBr) da madeira moída (A), da lignina isolada pelo método de Bjorkman (B) e da lignina acetilada (C) da *P. malacophyllum*.

4.2.2.3. Análise das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA e PCEA por RMN de ^1H .

Os espectros de RMN de ^1H das ligninas apresentaram sinais compatíveis com estruturas. As atribuições dos sinais na região entre 3 e 5 ppm, por envolver um grande número dos sinais, não permitiram atribuição completa. Evidentemente a estrutura de natureza cruzada, tridimensional, proporciona uma restrição relativa de movimentos conformacionais, resultando numa sobreposição de sinais. Adicionalmente a baixa solubilidade contribui para diminuir mais ainda a qualidade dos espectros de RMN de ^1H de ligninas. Um exemplo de análise espectroscópica de lignina original é mostrado na figura 4.50. Este espectro não permite uma análise da lignina. A reação de acetilação aumenta a solubilidade da lignina e o espectro pode ser melhor interpretado.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um aparelho Bruker 200 MHz em CDCl_3 para as ligninas acetiladas (PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA) (Figuras 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55 e 4.56 e Tabela 4.18) e em DMSO para a lignina original (PRE) (Figura 4.50).

As ligninas são polímeros de fenilpropanóides cujos padrões de substituição do anel aromáticos podem varia de acordo com a espécie. Estes anéis aromáticos poderão conter nenhuma, uma ou duas metoxilas. No entanto, basicamente esse será o único critério de variação entre as ligninas analisadas. Desta forma, os espectros serão discutidos em conjunto.

Devido ao fato de que a lignina é uma molécula complexa, com uma formação polimérica cruzada seus espectros nos fornecem sinais largos dificultando uma análise precisa dos mesmos. Mas podem-se interpretar esses sinais em pequenas faixas do espectro. O que será feito neste estudo.

Nos espectros de RMN de ^1H das ligninas isoladas e acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA observam-se sinais na região de δ 6,90 a 6,94 referentes aos hidrogênios aromáticos característicos de unidades guaiacílicas. Os sinais em δ 6,58-6,60 são atribuídos aos hidrogênios aromáticos tipicamente de unidades siringílicas. Os sinais em δ 5,90-6,15 são atribuídos aos hidrogênios H-7 acetobenzílicos, onde o hidrogênio H-7 se revela para a forma treo em δ 6,01 e para a forma eritro em δ 6,06 sempre que o oxigênio fenólico em C-4 estiver ligado a um grupo alquila e em δ 6,06 para a forma eritro e em δ 6,11 para a forma treo sempre que o oxigênio fenólico estiver ligado a um grupo acila. O sinal em δ 5,19 é atribuído ao hidrogênio H-7 de uma estrutura não totalmente acetilada nesta posição. Este sinal pode ser visto apenas na lignina da PSOA. O sinal em δ 4,55-4,62 é atribuído ao hidrogênio H-8 da estrutura com ligação do tipo 8-8'. Os sinais na região de δ 4,15-4,45 são atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-9 de estruturas com vários tipos de ligações. Os hidrogênios acetílicos dos anéis aromáticos se revelam em deslocamentos por volta de δ 2,28 e δ 2,12, enquanto os hidrogênios acetílicos alifáticos se revelam em deslocamentos δ 2,08 e 2,0.

Observou-se que, nos espectros de PADA e de PREA o sinal em δ 6,6 está proporcionalmente mais intenso que nos espectros de PSOA, PRIA, PCEA e PMAA, o que nos indica que PADA e de PREA possui um padrão siringílico maior em relação as demais espécies.

Tabela 4.19. Atribuições dos sinais de RMN de ^1H das ligninas acetiladas PREA, PSOA, PADA, PRIA, PCEA e PMAA.

Deslocamento Químico (ppm)						Atribuições
PREA	PSOA	PADA	PRIA	PCEA	PMAA	
6,94	6,92	6,91	6,92	6,91	6,90	H-2, H-5 e H-6 em unidades guaiacílicas
6,60	6,60	6,59	6,59	6,58	6,59	H-2 e H-6 em unidades siringílicas
6,01	6,00	5,99	6,00	5,99	5,97	H-7 acetobenzílicos em 8-O-4'
	5,19					H-7 oxibenzílicos
4,60	4,62	4,55		4,59	4,57	H-8 em 8-O-4'
4,41	4,40	4,40	4,34	4,38		Hidrogênios alifáticos de várias estruturas
4,21	4,23	4,18	4,27	4,26	4,19	Hidrogênios alifáticos de várias estruturas
3,78	3,81	3,74	3,80	3,80	3,76	Hidrogênios metoxílicos
3,76						Hidrogênios metoxílicos
2,29	2,29	2,29	2,26	2,28	2,26	Hidrogênios acetílicos aromáticos
2,12		2,13	2,17			Hidrogênios acetílicos aromáticos e alifáticos
2,06	2,08	2,08				Hidrogênios acetílicos alifáticos
2,00	2,01	2,01	2,01	2,00	1,99	Hidrogênios acetílicos alifáticos
1,25	1,25	1,25	1,25	1,23		Graxas contaminantes

Figura 4.50. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PRE, em DMSO.

Figura 4.51. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PREA, em CDCl_3 .

Figura 4.52. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PSOA, em CDCl_3 .

Figura 4.53. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PRIA, em CDCl_3 .

Figura 4.54. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PCEA, em CDCl_3 .

Figura 4.55. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PADA, em CDCl_3 .

Figura 4.56. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da lignina PMAA, em CDCl_3 .

4.2.2.4. Análise de madeira moída e de lignina por RMN de ^{13}C no estado sólido (CP-MAS) e de lignina acetilada por RMN de ^{13}C em solução, de *P. regnellii*.

As técnicas de análise de ligninas por RMN de ^{13}C são de grande importância para determinação estrutural. No entanto a baixa solubilidade das ligninas dificulta as análises das mesmas e, portanto podemos fazer as análises realizando uma reação de acetilação, derivatizando assim a lignina, o que não interfere na análise e interpretação do espectro, ou ainda realizando a análise da lignina original utilizando a técnica RMN de ^{13}C em estado sólido (Lindberg e Hortling, 1985).

A utilização da RMN de ^{13}C em estado sólido, envolvendo técnicas de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP/MAS, cross-polarization/magic angle spinning), tem também propiciado estudos importantes sobre a estrutura de ligninas. Apresenta a grande vantagem de não modificar a composição da lignina quanto a fragmentos macromoleculares, mas não possibilita resolução espectral comparável àquela obtida na RMN em fase líquida. Aplica-se principalmente ao estudo dos produtos da pirólise de ligninas, a análise de protoligninas e de ligninas insolúveis, estas últimas de particular interesse para o conhecimento aprofundado do processo de deslignificação.

A figura 4.57 apresenta os espectros em fase sólida (CP/MAS) da madeira moída, a figura 4.58 da lignina de *P. regnellii* e a figura 4.59 o espectro desta lignina acetilada em solução no clorofórmio deuterado. A figura 4.57 mostra a maior intensidade relativa dos sinais de carbono alifáticos, entre δ 50 e 110, por causa da maior abundância da celulose na madeira. Nesse espectro os sinais característicos da lignina são relativamente mais fracos, podendo ser observados entre δ 110 e 160, região da ressonância dos carbonos aromáticos e em δ 55, devido aos carbonos de metoxilas (Tabela 4.20) (Schmidt *et al.*, 1997)

Há uma correspondência geral entre os espectros de RMN do ^{13}C da amostra no estado sólido (figura 4.58) e em solução (figura 4.59). Entretanto, verificam-se diferenças na feição dos sinais em cada intervalo de δ que engloba determinados sinais. O espectro 4.58 da lignina apresenta sinais mais largos e mal resolvidos, se comparados aos sinais mais distintos e numerosos do respectivo intervalo do espectro 4.59 dessa mesma lignina, porém obtido em solução. Além do efeito residual da interação dipolar magnética entre os núcleos de carbono e hidrogênio, a largura dos sinais de ressonância de ligninas registrados no estado sólido reflete a dispersão dos deslocamentos químicos muito próximos, causada pela variação dos arranjos espaciais diferentes das unidades básicas arilpropanóides, que estão “imobilizadas”. Essa imobilização relativa das diferentes configurações faz com que haja ambientes químicos e magnéticos ligeiramente diferentes para um mesmo tipo de carbono, o qual ocorre repetidas vezes na macromolécula, porém sem uma regularidade estrutural. No líquido, o movimento das moléculas faz os sinais serem relativamente mais estreitos, representando a média desses arranjos espaciais e refletindo, portanto, uma configuração média da macromolécula.

Nos espectros 4.58 e 4.59 observaram-se sinais característicos das ligninas (Himmelsbach *et al*, 1983; Martínez *et al.*, 1999; Hatcher, 1987). No espectro em solução foram observados sinais típicos de unidades guaiacílicas que se revelaram por volta de δ 150 referente ao carbono C-3 de unidade eterificada, δ 147 referente ao carbono C-4 de unidade eterificada e C-3 não eterificada, δ 135 referente ao carbono C-1 de unidade eterificada, em δ 111,3 referente ao carbono C-2 nas unidades eterificadas e não eterificadas. Os sinais referentes aos carbonos C-5 e C-6 não foi possível a identificação pela baixa intensidade do sinal. No entanto, observou-se que no espectro há evidência da existência dos mesmos. O sinal em δ

80,5 se refere ao carbono C-8 de ligações do tipo 8-O-4' na forma. O sinal em δ 69,3 refere-se ao carbono C-7' de estruturas tipo 8-O-4' das formas *treo* e *eritro*. O sinal em δ 63,1 e 62,5 dos carbonos C-9 de estruturas tipo 8-O-4' das formas *eritro* e *treo* das unidades guaiacólica ou siringólica.

Os sinais típicos de unidades siringílicas se revelaram em δ 152,8 referentes aos carbonos C-3 e C-5 de unidades eterificadas e em δ 147,9 de unidades não eterificadas. O sinal em δ 135,3 é referente ao carbono C-4 de unidade não eterificada. O sinal de C-1 de unidades não eterificada aparece em δ 131,8. Em δ 104,1 aparece um sinal referente aos carbonos C-2 e C-6 de unidades eterificadas. O sinal em δ 74,3 refere-se ao carbono C-7 de estruturas 7-O-4' na forma *eritro*. Os sinais referentes aos carbonos C-8 não foi observar.

No espectro no estado sólido os sinais não se revelam de forma discreta, dificultando assim a interpretação do mesmo. No entanto, é evidente pelo formato do espectro, embora sobrepostos, os sinais existem.

A proximidade dos tipos de lignina existente nas espécies estudadas limitou a caracterização das mesmas usando os espectros de carbono. Isso nos levou a não realizar a análise de todas as espécies. No entanto os experimentos de RMN de ^1H e oxidação por nitrobenzeno nos forneceram dados suficientes para o estudo da lignina.

As atribuições dos espectros de RMN de ^{13}C de lignina original no estado sólido e de lignina acetilada em solução estão mostradas e os espectros de madeira moída, de lignina original e de lignina acetilada de nas figuras 4.57, 4.58 e 4.59, respectivamente.

Tabela 4.20. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de lignina original (PRE) no estado sólido (CP-MAS) e (PREA).

Deslocamentos químicos (δ)			Atribuições*
	RMN de ^{13}C sólido	RMN de ^{13}C em solução	
193,6			7-CO e 9-CHO
191,0			7-CHO
172,0		170,0	-C=O de ácidos carboxílicos alifáticos
169,6		169,6	-C=O de grupos acetílicos de xilanas
152,9			C-7 de Ar-CH=CH-CHO
152,9-152,2	153	152,8	C-3/C-5 de Se, C-3/C-5' de 5-5'
149,5-149,2	148	150,6	C-3 de Ge
147,7-146,5		147,9	C-4 de Ge, C-3/C-5 de Sne e C-3 de Gne
145,5			C-4 de Gne
143,2			C-4 de subestruturas fenilcumarânicas
138,0			C-1 de Se
136,1	136		C-4 de Se
135,6-135,0		135,3	C-1 de Ge, C-4 de Sne
132,2		131,8	C-1 de Gne, C-1 de Sne
130,0-128,0			C-7/C-8 em Ar-CH=CHCH ₂ OH, C-8 em Ar-CH=CH-CHO, -CH=CH de olefinas
119,3-119,0	120	119,6	C-6 Ge e Gne
		118,1	
115,8-1146			C-5 de Ge e Gne
112,2		111,3	C-2 de Ge e Gne
106,8-103,5	105	104,1	C-2/C-6 de Se e Sne com ou sem 7-C=O
101,9-101,6			C-1 de xilanas
87,0-86,2			C-8 de 8-O-4' de S (forma eritro)
84,6-84,0	84	80,5	C-8 de 8-O-4' de G (forma eritro)
73,3-72,4	73	74,3	C-7 de 7-O-4' de S (forma eritro), C-7 de 7-O-4' de G (forma eritro)
71,6		69,3	C-7 de 8-O-4' de S ou G (forma treo) C-9 de 8-8' de G e S
62,9-62,6	60	63,1 e 62,5	C-9 de 8-O-4' de G ou S (formas treo e eritro)
56,0	56	55,9	-OCH ₃ de G e S
54,2-53,8			C-8 de 8-8' de G e S
53,5			C-8 de 8-5' de G e S
20,9	20	20,9	-CH ₃ de grupos acetílicos de xilana

* Se, Ge: unidades siringílicas eterificadas; Sne, Gne: unidades siringílicas não eterificadas; S, G: unidades siringílicas eterificadas ou não eterificadas

Figura 4.57. Espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido de madeira moída de *P. regnellii* (75MHz).

Figura 4.58. Espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido de lignina de *P. regnellii* (75MHz).

Figura 4.59. Espectro de RMN de ^{13}C em solução de lignina acetilada de *P. regnellii* (PREA), CDCl_3 (50 MHz).

4.5. Análise biossintética

4.5.1. Biossíntese de lignanas

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

Biossinteticamente as lignanas são produtos derivados por uma ramificação da rota do ácido chiquímico, conhecida como via fenilpropanoídica. Nesta via, o aminoácido *L*-fenilalanina normalmente sofre desaminação por meio da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) levando à produção de ácidos cinâmicos, e, por redução destes, a álcoois cinâmicos substituídos (Kato *et al.*, 1998). O álcool correspondente se dimeriza através do acoplamento oxidativo formando o pinoresinol. Usando os (±)-pinoresinois marcados isotopicamente, Kato (1989), demonstrou que o (+)-pinoresinol empregado como precursor com estágios seqüenciais de formação do grupo metilenodioxido levou a formação de (+) piperitol e a seguir a sesamina. A reação de metilação da posição C-4 ocorre por intermédio de *O*-metil-transferases do piperitol que leva a formação do metilpiperitol (kobusina).

A introdução da ponte metilenodioxifenílica na estrutura furofurânica ocorre durante a conversão do (+)-pinoresinol a (+)-piperitol e é catalisada por uma enzima do citocromo P-450 O₂- e NADPH-dependente contidas nos microsossomos celulares da planta

O (+)-pinoresinol formado sofre uma redução enantioespecífica dependente de NADPH para produzir a lignana benziltetraidrofurânica (-)-secoisolariciresinol, e

posteriormente, uma lignana dibenzilbutânica, o (+)-lariciresinol (Katayama, 1992a, 1992b).

O (-)-secoisolariciresinol, após esta etapa, é oxidado estereoespecificamente e fornece o (-)-matairesinol (Umezawa *et al.*, 1990, 1991).

Por sua vez o matairesinol leva a formação da (-)-arctigenina a partir da metilação da posição C-4 por intermédio de *O*-metil-transferases (Osawa, 1993).

E mais uma vez ocorre a introdução da ponte metilenodioxifenílica na estrutura do matairesinol catalisada por uma enzima do citocromo P-450 O_2^- e NADPH-dependente, formando a hinokinina, kusunokinina e haplomirfolina.

A carbonila do matairesinol, pode também ser reduzida a álcool formando assim a cubebina e 3',4'-dimetoxi-3,3-desmetilenocubebina.

Em relação à estereoquímica não há exemplos de lignanas furofurânicas opticamente puras analisadas por CLAE quiral exibindo assim, várias composições enantioméricas, enquanto as lignanas dibenzilbutirolactônicas tem sido identificadas em CLAE quiral, observando-as como opticamente puras (Umezawa, 2003).

Baseado nos estudos anteriores uma rota biossintética para as substâncias isoladas é proposta na figura 4.60.

Figura 4.60. Rota biossintética das lignanas isoladas das folhas e dos frutos de *P. richardiaefolium*.

4.5.2. Biossíntese de ligninas

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular, que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores nos compartimentos citoplasmáticos. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. As enzimas oxi-redutoras tais como peroxidases, e isoenzimas correspondentes, atuam na polimerização da lignina, dentro da parede celular, formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio. A lacase entre outras oxidases também promovem oxidação desidrogenativa dos monolignóis na parede celular (Lewis e Sarkanen, 1998; Whetten *et al.*, 1998; Ranocha *et al.*, 2000) (Figura 4.61).

Figura 4.61. Ressonância dos monolignóis iniciada por peroxidases e lacases.

Sua arquitetura molecular difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (Larroque e Planchon, 1990). Normalmente as plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica onde o tempo e local de deposição pode ser endógena e exogenamente afetado (Donaldson, 2001).

O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam as plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (Boatright *et al.*, 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais (Allina *et al.*, 1998).

E nestes caminhos há atuação de enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina. Durante a formação dos precursores da lignina algumas dessas enzimas atuam sobre o núcleo aromático dos fenilpropanóides, introduzindo hidroxilas em C-3 e C-5 e as metilando em seguida enquanto outras desempenham importante papel na redução da cadeia lateral. A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas desde a fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil COA ligase (4CL), 4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H), 5-adenosil-metionina:cafeato/5-hidroxilase (OMT), ferulato-5-hidroxilase (F5H), hidroxicinamoil COA redutase (CCR) até a cinamil álcool desidrogenase (CAD) (Figura 4.62).

Figura 4.62. Rota biossintética dos monolignóis precusores da lignina. (Dixon, *et al.*, 2001).

Uma polimerização enzimática destas unidades de fenilpropanóides é o passo final da biossíntese das ligninas pelas plantas, sendo que a porcentagem relativa de cada monômero fenólico dentro da molécula é dependente da origem filogenética do vegetal (Sarkanen e Ludwig, 1971).

4.5.3. Biossíntese de lignanas x ligninas

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

As ligninas são polímeros naturais cujas unidades básicas são os mesmos monolignóis responsáveis pela biossíntese das lignanas e propenil- e alilfenóis. São consideradas metabólitos primários, pois são responsáveis pela sustentação e transporte de água nas plantas. A via fenilpropanoídica pode ser considerada como um elo entre os metabolismos primário e secundário (Sarkanen e Herbert, 1971; Whetten e Sederoff, 1995).

O acoplamento oxidativo que leva à formação das lignanas e ligninas na natureza ocorre de modo diferente. No caso das lignanas, existe a ação de enzimas com alto controle régio- e estereosseletivo levando a produtos opticamente ativos, enquanto que o acoplamento oxidativo que ocorre na biossíntese das ligninas dá origem a produtos racêmicos. O termo “lignana” então foi criado para definir as substâncias produzidas pela união regioespecífica de duas unidades monoméricas C_6-C_3 . (Gottlieb *et al.*, 1995b)

Uma rota biossintética para alguns metabólitos secundários derivados parcial ou completamente da via fenilpropanoídica é mostrada na figura 4.63.

5. Conclusão

A análise do padrão de substituição dos anéis aromáticos dos principais metabólitos secundários de *Piper regnellii* e *Piper solmsianum*, indica que o conocarpano e a grandisina são produzidos a partir de álcoois *p*-cumárico (monoxigenados) e siringílico (trioxigenados), respectivamente (Sartorelli *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003). No caso de *Piper aduncum*, o dilapiol possui o anel aromático tetraoxigenado (Parmar *et al.*, 1998) sugerindo que o precursor pode ser também o álcool siringílico. Finalmente, em *Piper richardiaefolium*, os principais produtos são as lignanas cubebina e outros estruturalmente relacionados que devem ser resultantes de alcoóis coniferílico.

Assim sendo, a questão que se colocou foi relacionado a possível correlação entre o padrão de oxigenação desses metabólitos secundários e o padrão de oxigenação das ligninas dessas espécies.

As análises de amostras de ligninas dos caules de *Piper* indicaram que a lignina de *P. aduncum* e de *P. regnellii* tem um predomínio de anéis aromáticos do tipo siringílico enquanto que nas demais espécies foram constatadas um padrão guaiacílico mais acentuado. Esta inferência foi baseada principalmente no método de degradação por nitrobenzeno, onde a relação das unidades S/G para *P. aduncum* mostrou ser o mais elevado, seguido de *P. regnellii*. Outro dado relevante para a comparação entre as ligninas das espécies de *piper* foi a proporção relativa entre os sinais por volta de δ 6,6 e 6,9 nos espectros de RMN de ^1H das ligninas extraídas pelo método de Bjorkman e analisadas em solução. Estes sinais são atribuídos, respectivamente a hidrogênios siringílicos e guaiacílicos. Estes sinais aliados aos sinais de hidrogênios de metoxilas permitiram calcular semiquantitativamente a

fórmula mínima das ligninas que, embora não precisos, mostrou pode ser usado para auxiliar nos estudos de lignina.

Portanto, os resultados obtidos sugerem que a via biossintética envolvida na formação de ligninas deve atuar de forma independente daquela envolvida na formação dos metabólitos das mesmas espécies.

6. Referências Bibliográficas

- Abreu, H. S. (1994) *Biossíntese de lignificação*. Ed. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 63.
- Abreu, H. S., Nascimento, A. M., Maria, M. A. (1999) Lignin and structure. *Wood and Fiber* **31**, 426-433.
- Agrawal, P. K., Thakur, R. S. (1985) ^{13}C NMR Spectroscopy of Lignan and Neolignan Derivatives. *Magnetic Resonance In Chemistry* **23**, 389-418.
- Akin, D. E., Chesson, A. (1989) Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. In: Proc. 16th Int. Grassl. Congr., 4-11. Assoc. Francaise pour la Production Fourragere, Nice, France, 1753-1760.
- Albiero, A. L. M., Paoli, A. A. S., Souza, L. A., Mourão, K. S. M. (2005) Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* **19**, 305-312.
- Albrecht, K. A., Wedin, W. F., Buxton, D. R. (1987) Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Science* **27**, 735-741.
- Alécio, A. C., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Kato, M. J., Furlan, M. (1998) Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products* **61**, 637-639.
- Allina, S. M. Pri-Hadash, A. Theilmann, D. A., Ellis, B. E., Douglas, C. J. (1998) 4-Coumarate:coenzyme-a ligase in hybrid poplar. *Plant Physiology* **116**, 743-754.
- Aloni, R., Tollier, M. T., Monties, B. (1990) The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and xylem of *Coleus blumei* stems. *Plant Physiology* **94**, 1743-1747.
- Ampofo, S. A., Roussis, V., Wiemer, D.F. (1987) New prenylated phenolics from *Piper auritum*. *Phytochemistry* **26**, 2367-2370.
- Anterola, A. M., Lewis, N. G. (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of the genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* **61**, 221-294.
- Asprey, G. F., Thornton, P. (1954) Medical Plants of Jamaica, *West Indies Medicinal Journal*, **17**, Kingston, Jamaica.
- Bailey, N. J. C., Oven, M., Holmes, E., Nicholson, J. K., Zenk, M. H., (2003) Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via ^1H NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*, **62**, 851-858.

- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavaleiro, A. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Furlan, M. (1999) A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **51**, 899-902.
- Barata, L. E. S., Baker, P. M., Gottlieb, O. R., Rùveda, E. A. (1978) Neolignans of *Viola surinamensis*. *Phytochemistry* **17**, 783-786.
- Baucher, M. Claire, H. Petit-Conil, M., Boerjan, W. (2003) Lignin: Genetic Engineering and Impact on Pulping. *Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 305-350.
- Benevides, P.J.C., Sartorelli, P., Kato, M.J. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* **52**, 339.
- Bharathi R. P., Newand, B. M. (1985) Lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, **24**, 329-331.
- Billa, E., Tollier, M., Monties, B. (1996) Characterisation of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *Journal of Science Food and Agriculture* **72**, 250-256.
- Björkman, A. (1956). Studies on finely divided wood, Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidning* **59**, 477-485.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C. M., Wood, B., Peel, G. Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., Dudareva, N. (2004) Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in *Petunia* Petal Tissue. *Plant Physiology* **135**, 1993-2011.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Plant Biology* **54**, 519-546.
- Boudet, A. M., Grima-Pettenati, J. (1996) Lignin genetic engineering. *Molecular Breeding* **2**, 25-39.
- Brunow, G., Kilpelainen, I., Lapierre, C., Lundquist, K., Simola, L. K., Lemmetyinen, J. (1993) The chemical structure of extracellular lignin released by cultures of *Picea abies*. *Phytochemistry* **32**, 845-850.
- Campbell, M. M., Sederoff, R. R. (1996) Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiology* **110**, 3-13.
- Chen, C. L., Robert, D. (1988). Characterization of lignin by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy In: *Methods Enzymology*, Wood, W.A., Kellog, S. T. Eds., Academic Press, New York **161**, 137.
- Chen, C. L. (1991) Lignins: Occurrence in wood tissues isolation reactions, and structure. In: Lewis, M., Goldstein, I. S. (ed). *Wood structure and composition*.
- Connolly, J. D., Deans, R., Haque, M. E. (1995) Constituents of *Piper chaba*. *Fitoterapia* **66**, 188.

- Cronquist, H. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, New York, Columbia University Press, EUA.
- Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T., Yeo, P. (1985) *The families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy*. Springer-Verlag. New York.
- Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Kato, M. J. (2003) Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **64**, 555-559.
- Danelutte, A. P., Costantin, M. B., Delgado, G. E., Braz-Filho, R., Kato, M.J. (2005) Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1425-1430.
- Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L. (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* **48**, 21-33.
- Defernez, M., Colquhoun, I. J. (2003) Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry* **62**, 1009-1017.
- Donaldson, L. A. (2001) Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**, 859-873.
- Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D., Parvathi, K. (2001) The biosynthesis of monolignols: a "metabólic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57**, 1069-1084.
- Duh, C., Wu, Y., Wang, S. (1990) Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper arborescens*. *Phytochemistry* **29**, 2689-2691.
- Duh, C. Y., Wu, Y. C. (1990) Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. *Journal of Natural Products* **53**, 1575-1577.
- Evcim, U., Gozler, B., Freyer, A. J., Shamma, M. (1986) Haplomirtin and (-) haplomirfolin: two lignans from *Haplophyllum myrtifolium*. *Phytochemistry* **25**, 949-951.
- Falcão, D. Q. (2003) Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado*. UFRJ, RJ.
- Felipe, F. C. B., Filho, J. T. S., Souza, L. E. O., Silveira, J. A., Uchoa, D. E. A., Silveira, E. R., Pessoa, O. D. L., Viana, G. S. B. (2007) Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomedicine* **14**, 605-612.
- Fengel, D., Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin and New York, 613
- Figueiredo, R. A., Sazima, M. (2000) Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* **85**, 455-460.

- Freudenberg, K., Neish, A. C. (1968). *The Constitution and Biosynthesis of lignin*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, NY-USA . 64.
- Fukushima, R. S., Dehotity, B. A., Loerch, S. C. (1991) Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* **69**, 295.
- Gilardi, G., Abis, L., Cass, A. E. G. (1995) Carbon-13 CP/MAS solid-state NMR and FT-IR spectroscopy of wood cell wall biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 268-275.
- Gordon, A. J. (1975) A comparison of some chemical and physical propeties of alkali lignins from grass and Lucerne hays before and after digestion by sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **26**, 1551-1559.
- Gottlieb, O. R. (1972) Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* **11**, 1537-1570.
- Gottlieb, O. R. (1987) Evolução química vegetal. *Ciência e Cultura* **39**, 357-360.
- Gottlieb, O. R. (1988) Lignóides de plantas amazônicas: Investigações biológicas e químicas. *Acta Amazônica* **18**, 333-334. Suplemento
- Gottlieb, O. R., Borin, M. R. de M. B., Kaplan, M. A. C. (1995) Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in angiosperms. *Phytochemistry* **40**, 99-113.
- Gottlieb, O. R., Borin, M. R. de M. B., Bosisio, B. M. (1995) Lignification: An evolutionary perspective. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **67**, 355-362.
- Gottlieb, O. R., Borin, M. R. de M. B., Bosisio, B. M. (1996) Trends of plant use by humans and non-human primates in Amazonia. *American Journal of Primatology* **40**, 189-195.
- Gottlieb, O. R., Borin, M. R. de M. B., Bosisio, B. M. (1996) Chemosystematic clues for the choice of medicine and food plants in Amazonia. *Biotropica* **2**, 401-406
- Greger, H., Hofer, O. (1980) New unsymmetrically substituted tetrehydrofurofuran lignans from *Artemisia absinthum*. *Tetrahedron* **36**, 3551-3558.
- Grisebach, H. (1981) In: The Biochemistry of Plants (Stumpf, P. K. & Conn, E. E., eds.) **7**, 457-478. Academic Press, New York.
- Hatcher, P. G. (1987) Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.* **11**, 31-39.
- Hermoso, A., Jiménez, I. A., Mamani, Z. A., Bazzocchi, I. L., Piñero, J. E., Ravelo, A. G., Valladares, B. (2003) Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity. *Bioorganic & Medical Chemistry* **11**, 3975-3980.

- Higuchi T (1990) Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood of Science Technology* 24,23-63.
- Himmelsbasch, D. S., Barton F. E., Wimdham, W.R. (1983) Comparison of carbohydrate, lignin, and protein ratios between grass species by cross polarization-magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**, 401-404.
- Inoue, K., Sewalt, V. J., Murray, G. B., Ni, W., Sturzer, C., Dixon, R. A. (1998) Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology* **117**, 761-770.
- Isao, K. (1984) Molluscicidal and insecticidal activities of isobutylamides isolated from *Fagara macrophylla*. *Experientia* **40**, 340-341.
- Jensen, S., Hansen, J., Boll, P.M. (1993) Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry* **33**, 523-530.
- Jung, H. G., Fahey Jr, G. C. (1983) Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism. *Journal of Nutrition* **113**, 546-556.
- Jung, H. G., Varel, V. H., Weimer, P. J., Ralph, J. (1999) Accuracy of Klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2005-2008.
- Katayama, T., Davin, L. B. Lewis, N. G. (1992a) An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry* **31**, 3875-3881.
- Katayama, T., Davin, L. B. Chu, A. Lewis, N. G. (1992b) Novel benzylic reductions in lignans biogenesis in *Forsythia intermedia*, *Phytochemistry* **33**, 581-591.
- Kato, M. J. (1989) A Distribuição de Lignóides e Policetídeos nos Frutos de *Virola elongata* (Benth) Warb (Myristicaceae) Tese de Doutorado, IQ-USP, São Paulo.
- Kato, M. J., Chu, A., David, L. B., Lewis, N. G. (1998) Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. *Phytochemistry* **47**, 583-591.
- Kato, M. J., Furlan, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 529-538.
- Kawai, S., Jensen, K. A., Bao, W. e Hammel, K. E. (1995). New Polymeric Model Substrates for the Study of Microbial Ligninolysis. *Applied And Environmental Microbiology* **61**, 3407-3414.
- Kretzschmar, R., Meyer, H. J., Teschendorf, H. J. (1970) Strychnine antagonistic potency of pyrone compounds of the kavaroot (*Piper methysticum* Forst.) *Experientia* **26**, 283-284.

- Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. A., Bergamo, D. C. B., Cavaleiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M., Guimarães, E. F., Young, M. C. M., Kato, M. J. (2004) Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1783-1788.
- Lapierre, C. (1986). Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung* **40**, 113-118.
- Larroque, C. M., Planchon, C. L. (1990) Lignification and physiological factors of yield in maize. *Published in Crop Sci*, **30**, 1105-1109.
- Lee, E. B., Shin, K. H., K. H., Woo, W. S. (1984) Pharmacological study on piperine. *Archives of Pharmacology Research*, **7**, 127.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E. (1990). Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**, 455-496.
- Lewis, N. G., Sarkanen, S. (1998) Lignin and lignan biosynthesis. American Chemical Society. Washington, DC, 436.
- Lin, Z. X., Hoult, J. R. S., Beneett, D. C., Raman, A. (1999) Aggregation Inhibitory Activity of Minor Acetophenones from *Paeonia* Species *Planta Médica* **7**, 65, 600.
- Lindon, J. C., Holmes, E., Nicholson, J. K. (2001) Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **39**, 1-49.
- Lindberg, J.J., Hortling, B. (1985) Cross polarization-magic angle spinning NMR studies of carbohydrates and aromatic polymers. *Advances in Polymer Science* **66**, 1-22.
- Livingstone, D. *Data Analysis for Chemists*. New York: Oxford Science Publications, 1995.
- Luckner, M. (1990) *Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.
- Mabberley, D. J. (1997) *The Plant-book. A Portable Dictionary of The Higher Plants*. Cambridge Univ. Press. New York.
- Mann, J. (1995) *Secondary Metabolism*, 2nd ed. Oxford Science Publications, 374.
- Martínez, A. T., Almendros, G., González-Vila, F. J., Frund, R. (1999) Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **15**, 41-48.
- Martins, R. C. C., Lago, J. H. G., Albuquerque, S., Kato, M. J. (2003) Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **64**, 667-670.

- Masselter, S., Zemman, A., Bobleter, O. (1995). Analysis of lignin degradation products by capillary electrophoresis. *Chromatographia* **40**, 51-57.
- Medola, J. F., Cintra, V. P., Silva, E. P. P., Royo, V. A., Silva, R., Saraiva, J., Albuquerque, S., Bastos, J. K., Silva, M. L. A., Tavares, D. C. (2007) (-)-Hinokinin causes antidgenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 638-642.
- Miranda, J. E., Navickiene, H. M. D., Nogueira-Couto, R. H., De Bortoli, S. A., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Furlan, M. (2003) Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie* **34**, 409-415.
- Monties, B. (1989) Lignins. *Methods in Plant Biochemistry* vol. **1**, 113-157.
- Morais, S. A. L. (1992) Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída de *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural. Tese de Doutorado, Departamento de Química, ICE, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Moreira, D. de L., Guimarães, E. F., Kaplan, M.A. C. (2000) A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry* **55**, 783-786.
- Nascimento, E. A. (1989) Obtenção e caracterização do coque da lignina hidroelétrica do *E. grandis*. Belo Horizonte. Tese de doutorado, UFMG/ICEx
- Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Young, M. C. M., Cavalheiro, A. J., Furlan, M. (2000) Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **55**, 621-626.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T., Sticher, O. (1993) Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **34**, 813-818.
- Park, I.K., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, J.D. & Ahn, Y.J. (2002) Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50**, 1866-1870.
- Parmar, V. S., Sinha, R., Shakil, N. A., Tyagi, O. D., Boll, P. M., Wengel, A. (1993) An insecticidal amide from *Piper falconeri*. *Indian journal of Chemistry* **32B**, 392-393.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. M., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., Boll, P. M. (1997) Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**, 597-673.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N. Jain, R., Sharma, N. K., Tyagi, O. D., Lawrie, S. J., Errington, W., Howarth, O. W., Olsen, C. E., Singh, S. K. Wengel, J. (1998) Polyphenols and alkaloids from *Piper Species*. *Phytochemistry* **49**, 1069-1078.

- Pereda-Miranda, R. Bernard, C. B., Durst T., Arnason, J. T., Sánchez-Vindas, P., Poveda, L., Román, L. S. (1997) Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl)benzoate, major insecticidal principle from *Piper guanacastensis*. *Journal of Natural Products* **60**, 282-284.
- Perrim, D. D., Armarego, W. L. F. (1988) *Purification of Laboratory Chemical*, 3^a Ed. Oxford: Pergation, 391.
- Piló-Veloso, D., Nascimento, E. A., Morais, S. A. L. (1993) Isolamento e análise estrutural de ligninas. *Química Nova* **16**, 435-448.
- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L. Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M. (2001). Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* **57**, 1167-1176.
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada R., Miranda-Esquivel D. R. (2006) Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical Piper species (Piperaceae). *J Biogeogr.* **33**, 1266-1278.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Grabber, J.H., Jung, H. G, Quideau, S. and Helm. R. F. (1998) Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: Lewis, N. G and Sarkanen, S. (ed), *Lignin and Lignan Biosynthesis*, 697, *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* American Chemical Society, Washington, DC., 209-236.
- Ranocha, P., Chabanes, M., Chamayou, S., Jauneau, A., Boudet, A. M., Goffner, D. (2000) Laccasse Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiology*, **129**, 145-155.
- Saeed, S. A., Farnaz, S., Simjee, R.U., Malik, A. (1993) Triterpenes and β -sitosterol from *Piper betle*: isolation, antiplatelet and anti-inflammatory effects. *Biochemistry Society Transactions*, **21**, 462 (*Chemical Abstracts* **119**, 195314).
- Saliba, E. O. S., Rodrigues, N. M., Pilo-Veloso, D., (2000) Estudos de caracterização química das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja. In: Reunião anual da SBZ, **37**, Viçosa.
- Saliba, E. O. S., Rodrigues, N. M., Morais, S. A. L., Pilo-Veloso, D. (2001) Ligninas - Métodos de obtenção e caracterização Química. *Ciência Rural* **31**, 917-928.
- Santos, P. R. D., Moreira, D. L., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C. (2001) Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry* **58**, 547-551.
- Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H. (1971). In.: *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, New York, Wiley Interscience, 882
- Sarkanen, K. V., Herbert. H. L. (1971). Classification and distribution. In: Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (Ed.) *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, 43-94. Wiley-Interscience, New York.

- Silva, E.M.J., Machado, S.R. (1999) Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.)C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae) *Revista Brasileira de Botânica* **22**, 117-124.
- Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Méda, C. I., Young, M. C. M., Furlan, M. (2002) Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**, 521-527.
- Silva, M. L. A., Coímbra, H. S., Pereira, A. C., Almeida, V. A., Lima, T. C., Costa, E. S., Vinhólis, A. H. C., Royo, V. A., Silva, R., Filho, A. A. S., Cunha, W. R., Furtado, N. A. J. C., Martins, C. H. G., Carvalho, T. C., Bastos, J. K. (2007) Evaluation of *Piper cubeba* Extract, (-)-Cubebin and its Semi-synthetic Derivatives against Oral Pathogens. *Phytotherapy Research* **21**, 420-422.
- Schmidt, M. W. I., Knicker, H., Hatcher, P. G., Kogel-Knabner, I. (1997) Does ultrasonic dispersion and homogenization by ball milling change the chemical structure of organic matter in geochemical samples?-a CPMAS ¹³ C NMR study with lignin. *Organic Geochemistry* **26**, 491-496.
- Suire C., Asakawa, Y. Toyota, M., Takemoto, T. (1982) Chirality of terpenoids isolated from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry* **21**, 349-352.
- Suzuki, H., Lee, K., Haruna, M., Iida, T., Ito, K., Huang, H. (1982) (+)-Arctigenin, a lignan from *Wikstroemia indica*. *Phytochemistry*, **21**, 1824-1825.
- Takaku, N., Choi, D., Mikame, K., Okunishi, T., Suzuki, S., Ohashi, H., Umezawa, T., Shimada, M. (2001) Lignans de *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of Wood Science* **47**, 476-482.
- Taylor, D. W., Hyckel, L. J. (1992) Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of Angiosperms. *Plant Systematic and Evolution*, **180**, 137-156.
- Thring, R. W., Chornet, E., Bouchard, J., Vidal, P. F., Overend, R. P. (1990) Characterization of lignin residues derived from the alkaline hydrolysis of glycol lignin. *Canadian Journal of Chemistry* **68**, 82-89.
- Toyota, M., Saito, T. Matsunami, J., Asakawa, Y. (1997) A comparative study on three chemo-types of the liverwort *Conocephalum conicum* using volatile constituents. *Phytochemistry* **44**, 1265-1270.
- Umezawa, T. Davin, L. B., Yamamoto, E., Kingston, D. G. I., Lewis, N. G. (1990) Lignan biosynthesis in *Forsythia* species. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 1405-1408.
- Umezawa, T. Davin, L. B., Lewis, N. G. (1991) Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 10210-10217.
- Umezawa, T. (2003) Diversidade in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* **2**, 371-390.

- Vance, C. P., Kirt, T. K., Sherwood, R. T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 259-288.
- Vidigal, M. C. S. (1993) Lignanas de *Virola michelii* Heckel. Dissertação de Mestrado. UFMG, Belo Horizonte, MG.
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M.-S., Quandt, D., Neinhuis, C. (2007) Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 477-497.
- Wenkert, E., Gottlieb, H. E., Gottlieb, O. R., Pereira, M. O. S., Formiga, M. D. (1976) ¹³C NMR Spectroscopy of neolignans. *Phytochemistry* **15**, 1547-1551.
- Whetten, R., Sederoff, R. (1991). Genetic engineering of wood. *Forest Ecology and Management* **43**, 301-316
- Whetten, R., Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 1001-1013
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R., (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 585-609.
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987) Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 37-52.
- Yamauchi, K., Yasuda, S., Hamada, K., Tsutsumi, Y. Fukushima, K. (2003) Multifunctional biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. *Planta* **216**, 496-501.
- Zhang, S., Chen, K., Liu, X., Zhang, D., Tao-Wiedmann, T., Leu, S., McPhail, A. T., Lee, K. (1995) The isolation and structural elucidation of three new neolignans, puberlins A, B and C, as platelet activating factor receptor antagonists from *P. puberulum*. *Journal of Natural Products* **58**, 540-547.
- Zunic, W. M. Ding, S., Durig, J. R., Cohen, A. D. (1992) Pyrolysis GC/FID/FT-IR, pyrolysis GC/MS, and FT-IR studies of pore water extracts derived from peat samples differing in depositional environments. *Journal of Molecular Structure* **267**, 371-376.

7. CURRÍCULUM VITAE

7.1. Informações Pessoais

Nome: Adalberto Manoel da Silva

Local de nascimento: São Miguel do Anta/MG

Data de nascimento: 9 de junho de 1970

Nacionalidade: Brasileiro

7.2. Formação

- Departamento de Química – Universidade Federal de Viçosa

Licenciatura em Química, 1996-2000

Bacharelado em Química, 1996-2001

7.3. Ocupação

Profissão: Supervisor de Qualidade

Empresa: Atina – Indústria e Comércio de Ativos Naturais S/A.

7.4. Atividades de Monitoria

- Atividade de monitoria (PAE) da disciplina QFL 314 – Química Orgânica Experimental VII. Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- Atividade de monitoria (PAE) da disciplina QFL 2343 – Química Orgânica Experimental. Curso de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Atividade de monitoria (PAE) da disciplina QFL 341 – Química Orgânica I. Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- Atividade de monitoria (PAE) da disciplina QFL 341 – Química Orgânica I. Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

7.5. Participações em Congressos

- XXV RESEM 2003 – Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares.

Trabalho: Análise de ligninas de *Piper solmsianum* e *Piper regnellii*

- XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Trabalho: Caracterização de ligninas de *Piper* por RMN de ^{13}C no estado sólido (CP-MAS)

- 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Trabalho: Lignanas de *Piper richardiaefolium* kunth.

Trabalho: Ecologia química entre espécies de homópteros e Piperaceae.