BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
t: 13.621

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química

Estudo do metabolismo secundário em
Piper crassinervium
(Piperaceae)

Tese de Doutorado

Ana Paula Danelutte

Orientador: Massuo Jorge Kato

São Paulo
16/05/2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003888

Ficha Catalográfica

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

Danelutte, Ana Paula
D179e Estudo do metabolismo secundário em *Piper crassinervium*
(Piperaceae) / Ana Paula Danelutte. -- São Paulo, 2001.
117p.

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

1. Produtos naturais : Química orgânica 2. Célula :
Cultura : Plantas. I. T. II. Kato, Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

Recebido em 20/02/01
Gilson
NÃO LIGAR

"Estudo do Metabolismo Secundário em Piper crassinervium (Piperaceae)"

ANA PAULA DANELUTTE

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

Aprovado por:

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

**Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ - USP**

**Prof. Dr. JONAS GRUBER
IQ - USP**

**Profa. Dra. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG
IQ - UNICAMP**

**Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
IQ - Unesp - Araraquara**

**SÃO PAULO
16 DE MAIO 2001.**

**“ Tente ser uma pessoa de sucesso,
mas efetivamente
tente ser uma pessoa de valor. ”**

Albert Einstein

Dedico esta tese aos meus pais, Armando e Célia,
agradecendo todo apoio, incentivo e amor em
todos os momentos da minha vida.

Ao Eduardo, meu irmão, por ser meu
grande amigo.

Existem pessoas que cruzam nossos caminhos nas horas
mais oportunas, trazendo muita alegria, e em seguida,
começam a fazer parte desta trajetória.
Alexandre, obrigada pelo amor e dedicação.

Agradecimentos

Ao Prof. Massuo J. Kato, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

À amiga Patrícia Sartorelli, pela ajuda, dedicação e amizade durante estes 12 anos.

Ao Leandro R. Latorre, por sua atenção e amizade.

À Mara B. Costantin e Roberto C. C. Martins, pela ajuda durante o trabalho experimental.

À Isabel C. Moreira, por me alojar durante vários meses, em sua casa, e por ser tão gentil.

À minha tia Nair, pelas caronas nas minhas idas à USP.

Ao André, meu irmão, e à Roberta, minha cunhada, por estarem tão próximos em momentos especiais.

Ao Prof. Raimundo B. Filho e Marcelo J. P. Ferreira, pela valiosa ajuda na elucidação estrutural.

Ao Prof. Paulo R. H. Moreno, por suas dicas e observações durante o trabalho experimental.

À Alessandra, pela dica no espectro de IV.

Aos alunos do laboratório do Prof. Pio Colepicolo, pelo empréstimo dos equipamentos e ajuda no trabalho experimental.

À amiga Mariluci, pela ajuda prestada.

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, Paulo Benevides, Angélica, Ana Paula, Melânia, Serginho, Sérgio Galdino, Karine e Zezinho pelo convívio agradável durante todo tempo.

Aos funcionários da central analítica pela obtenção dos espectros.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

Conteúdo

Abreviaturas.....	ix
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xv
.....	
1. Introdução	01
1.1 A Família Piperaceae.....	06
1.2 <i>Piper crassinervium</i>	13
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 Material vegetal.....	15
3.2 Obtenção de plântulas axênicas, calos e suspensões celulares de <i>Piper crassinervium</i>	15
3.2.1 Micropropagação de <i>P. crassinervium</i>	15
3.2.2 Indução de calos	16
3.2.3 Suspensões celulares	16
3.3 Obtenção dos extratos de folhas e culturas de células de <i>Piper crassinervium</i>	18
3.3.1 Extratos de folhas de <i>P. crassinervium</i>	18
3.3.2 Extratos do meio BC-1 e das células provenientes das suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	18
3.4 Análise dos extratos de folhas e de cultura de células de <i>Piper crassinervium</i>	19
3.4.1 Cromatografia planar e cromatografia em coluna	19
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	19
3.4.3 Fracionamento do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i>	20
3.4.4 Fracionamento do extrato de células de <i>P. crassinervium</i>	24
3.5 Estudo do óleo volátil de folhas de <i>Piper crassinervium</i>	25

3.5.1 Material vegetal.....	25
3.5.2 Isolamento dos compostos voláteis.....	25
3.5.3 Condições de análise do óleo volátil.....	25
3.6 Extração de proteínas para doseamento da fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS)	26
3.6.1 Protocolo para extração da enzima PAL	26
3.6.2 Ensaio da atividade da PAL	26
3.6.3 Análise por CLAE.....	26
3.6.4 Doseamento de proteínas totais.....	27
3.6.5 Ensaio para extração enzimática da chalcona sintase (CHS).....	27
3.6.6 Ensaio da atividade da CHS.....	28
3.6.7 Análise por CLAE.....	28
3.7 Preparação dos precursores para o ensaio de doseamento da chalcona sintase....	29
3.7.1 Preparação do ácido <i>p</i> -cumárico.....	29
3.7.2 Preparação do éster succinimídico do ácido <i>p</i> -cumárico	30
3.7.3 Preparação do 4-hidroxi-cinamoil-CoA (<i>p</i> -cumaroil-CoA)	30
3.8 Caracterização das culturas de <i>Piper crassinervium</i>	31
3.8.1 Determinação do peso fresco.....	31
3.8.2 Determinação do peso seco.....	31
3.8.3 Determinação do pH do meio de cultura.....	31
3.8.4 Determinação da atividade específica da PAL	31
3.8.5 Quantificação das substâncias presentes no extrato de células de <i>P. crassinervium</i>	32
3.8.6 Quantificação das substâncias presentes no extrato do meio celular	32
3.8.7 Experimentos de eliciação com cultura de células de <i>P. crassinervium</i>	32
A) Experimento com fenilalanina.....	34
B) Experimento com luz UV	34
C) Experimento com extrato de levedura	34
3.9 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos e das substâncias isoladas dos diferentes tecidos de <i>Piper crassinervium</i>	35
3.9.1 Bioautografia dos extratos e das substâncias isoladas de <i>P. crassinervium</i>	35
3.10 Dados espectroscópicos das substâncias isoladas de <i>Piper crassinervium</i>	36

3.11 Substâncias isoladas de folhas e da cultura de células de <i>Piper crassinervium</i>	36
4. Resultados e Discussão	39
4.1 Substâncias isoladas do extrato de folhas de <i>Piper crassinervium</i>	39
4.2 Identificação das substâncias isoladas do extrato de folhas de <i>Piper crassinervium</i>	41
4.2.1 Flavanonas (1 e 2)	41
4.2.2 Hidroquinonas preniladas (3 e 4).....	45
4.2.3 Hidroquinona prenilada (5)	49
4.3 Substâncias identificadas no óleo volátil de <i>Piper crassinervium</i>	68
4.3.1 Análise qualitativa e quantitativa	68
4.3.2 Estrutura química dos constituintes identificados no óleo volátil de <i>P. crassinervium</i>	71
4.4 Estudo de etapas biossintéticas	73
4.4.1 Doseamento da PAL em folhas intactas e plantas propagadas de <i>P. crassinervium</i>	73
4.4.2 Doseamento das chalcona sintase em folhas de <i>P. crassinervium</i>	75
4.5 Caracterização da curva de crescimento para culturas de células de <i>Piper crassinervium</i>	78
4.5.1 Densidade do inóculo.....	78
4.5.2 Determinação do peso fresco e seco em suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	78
4.5.3 Determinação dos valores de pH do meio de cultura.....	80
4.5.4 Determinação da atividade específica da PAL em células de <i>P. crassinervium</i>	81
4.6 Cultura de células de <i>Piper crassinervium</i>	83
4.6.1 Substâncias isoladas do extrato de células	83
4.6.2 Identificação das substâncias isoladas do extrato de células provenientes das suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	84
4.7 Quantificação das substâncias isoladas do extrato de células.....	99
4.8 Experimentos com fenilalanina, luz UV e extrato de levedura	102
4.9 Bioautografia.....	107

5. Conclusões	110
----------------------------	------------

6. Referências Bibliográficas	112
--	------------

Abreviaturas

AIA – ácido indolacético

AG3 – ácido giberélico

ANA – ácido naftalenoacético

BAP – 6-benzilamino purina

CC – cromatografia em coluna

CHS – chalcona sintase

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CPC – cromatografia planar comparativa

CPP – cromatografia planar preparativa

CoA – coenzima A

d – dubleto

dd – duplo dubleto

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

EtOAc – acetato de etila

m – multiplete

PAL – fenilalanina

PVPP – polivinilpolipirrolidona

s - singleto

t – tripleto

Resumo

Este trabalho descreve o estudo do metabolismo secundário em folhas diferenciadas e em suspensões celulares de *Piper crassinervium* (Piperaceae). Este estudo foi monitorado pela análise do extrato de folhas por CLAE, assim como pela comparação entre os diferentes tecidos desta espécie (folhas, caule e raízes). Do extrato das folhas foram isoladas duas flavanonas, duas hidroquinonas preniladas e uma hidroquinona com um endoperóxido na cadeia lateral. A análise do óleo volátil das folhas através de CG e CG-EM, revelou a presença de trinta e seis componentes, sendo majoritários o germacreno-D (10,05%) seguido por β -cariofileno (9,91%) e 6-metil-5-hepten-2-ona (7,47%). Todas as substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio antifúngico bioautográfico contra *Cladosporium sphaerospermum*, sendo que as flavanonas, as duas hidroquinonas e o óleo volátil mostraram-se ativos. As suspensões celulares foram desenvolvidas a partir de calos, iniciados a partir de ápices, em meio B5 modificado, contendo ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilamino purina (BAP) como reguladores de crescimento. As células não produziram flavonóides, mas alcalóides do tipo aristolactamas, que são parcialmente excretados para o meio de cultura. A curva de crescimento estabelecida para as células foi analisada quanto à atividade específica da fenilalanina amônia-liase (PAL), à variação do pH e o acúmulo dos alcalóides. Alguns experimentos de eliciação demonstraram respostas positivas face ao uso de luz UV, adição de L-fenilalanina e uso de extratos de levedura.

Abstract

The present work studies the secondary metabolism in leaves of *Piper crassinervium* (Piperaceae) and in its cell suspension culture as well. The profile of secondary compounds in differentiated and undifferentiated tissues were evaluated by HPLC. The aerial parts of *Piper crassinervium* yielded two flavanones and three prenylated hydroquinones, one having an endoperoxide group in the side chain. The analysis of the volatile oil of *Piper crassinervium* by GC-MS allowed the identification of 36 compounds, germacrene-D (10,05%), β -cariofilene (9,91%) and 6-methyl-5-heptene-2-one (7,47%) being detected as the major ones. All isolated substances were evaluated using a bioautography technique against the fungus *Cladosporium sphaerospermum*. The isolated flavanones, two hydroquinones and the essential oil were found to be active against the fungus. The cell suspensions had their growth curve established on basis of the dry weight and pH variations. The cells were showed to accumulate several aristolactams alkaloids instead. Determinations of these alkaloids by HPLC indicated that the cells excreted them partially to the culture media. Determinations of specific activity of PAL and concentration of alkaloids during the growth cycle were further performed. Additional experiments revealed that UV light and the addition of either phenylalanine or yeast extract cause elicitation response with increased production of alkaloids.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do cloreto de tubocurarina	01
Figura 2: Exemplos de produtos naturais utilizados industrialmente.....	04
Figura 3: Algumas espécies dos gêneros <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i>	07
Figura 4: Estrutura da amida piperina	07
Figura 5: Estruturas de kavapironas isoladas de <i>Piper methysticum</i>	08
Figura 6: Estrutura do ácido aristolóquico	09
Figura 7: Estruturas químicas das flavanonas isoladas de espécies de <i>Piper</i>	12
Figura 8: Espécie de <i>P. crassinervium</i> cultivada no Instituto de Química - USP.....	13
Figura 9: Etapas principais para obtenção de plantas propagadas cultivadas <i>in vitro</i> e suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	17
Figura 10: Suspensão celular de <i>P. crassinervium</i>	18
Figura 11: Fracionamento do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i>	23
Figura 12: Fracionamento do extrato de células proveniente das suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	24
Figura 13: Cromatograma obtido por CLAE (sistema S7) do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i>	40
Figura 14: Estrutura de uma flavanona	41
Figura 15: Estrutura das substâncias 3 e 4	45
Figura 16: Estrutura da substância 5	49
Figura 17: Exemplos de hidroquinonas alergênicas de espécies de <i>Phacelia</i>	51
Figura 18: Alguns exemplos de hidroquinonas isoladas de <i>Aplidium californicum</i>	52
Figura 19: Estrutura das hidroquinonas isoladas de <i>I. spinosula</i>	53
Figura 20: Espectro de RMN- ¹ H de 1	54
Figura 21: Espectro de RMN- ¹³ C de 1	55
Figura 22: Espectro de massas de 1	56
Figura 23: Espectro de RMN- ¹ H de 2	57
Figura 24: Espectro de massas de 2	58
Figura 25: Espectro de RMN- ¹ H de 3	59
Figura 26: Espectro de RMN- ¹³ C de 3	60
Figura 27: Espectro de massas 3	61
Figura 28: Espectro de RMN- ¹ H de 4	62

Figura 29: Espectro de RMN- ¹³ C de 4.....	63
Figura 30: Espectro de massas de 4.....	64
Figura 31: Espectro de RMN- ¹ H de 5.....	65
Figura 32: Espectro de RMN- ¹³ C de 5.....	66
Figura 33: Espectro de massas de 5.....	67
Figura 34: Reação de desaminação da fenilalanina catalisada pela enzima PAL.....	74
Figura 35: Biossíntese do flavonóide naringenina, segundo Heller (1988).....	76
Figura 36: Curva de crescimento de suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	79
Figura 37: Variação do pH em função do crescimento celular.....	81
Figura 38: Atividade específica da PAL e quantidade de proteínas totais em função do crescimento celular.....	82
Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE (sistema S7) do extrato de células proveniente das suspensões celulares de <i>P. crassinervium</i>	84
Figura 40: Esqueleto das aristolactamas isoladas.....	84
Figura 41: Espectro de RMN- ¹ H de 6.....	91
Figura 42: Espectro de RMN- ¹ H de 7.....	92
Figura 43: Espectro de RMN- ¹³ C de 7.....	93
Figura 44: Espectro de massas de 7.....	94
Figura 45: Espectro de RMN- ¹ H de 8.....	95
Figura 46: Espectro de massas de 8.....	96
Figura 47: Espectro de RMN- ¹ H de 9.....	97
Figura 48: Espectro de massas de 9.....	98
Figura 49: Estrutura do ácido aristolóquico.....	89
Figura 50: Formação de aristolactamas a partir de alcalóides dioxoaporfínicos <i>in vitro</i>	89
Figura 51: Proposta de biossíntese para as aristolactamas isoladas.....	90
Figura 52: Quantificação dos alcalóides 6 e 7 nas células.....	100
Figura 53: Quantificação dos alcalóides 6 e 7 no meio.....	100
Figura 54: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com fenilalanina (células).....	103
Figura 55: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com fenilalanina (meio).....	103
Figura 56: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com luz UV (células).....	103
Figura 57: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com luz UV (meio).....	103
Figura 58: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com levedura (células).....	103

Figura 59: Quantificação do alcalóide 6 no experimento com levedura (meio)	103
Figura 60: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com fenilalanina (células)	104
Figura 61: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com fenilalanina (meio)	104
Figura 62: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com luz UV (células)	104
Figura 63: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com luz UV (meio)	104
Figura 64: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com levedura (células)	104
Figura 65: Quantificação do alcalóide 7 no experimento com levedura (meio)	104
Figura 66: Cromatoplaça das substâncias puras e frações do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i>	107
Figura 67: Comatoplaça das substâncias purificadas	108

Lista de Tabelas

Tabela 1	
Aristolactamas isoladas de espécies de <i>Piper</i>	10
Tabela 2	
Flavanonas isoladas de espécies de <i>Piper</i>	11
Tabela 3	
Condição eluotrópica (S7) utilizada na análise dos extratos de folhas, cultura de células e substâncias isoladas de <i>P. crassinervium</i>	20
Tabela 4	
Frações obtidas no fracionamento do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i> por cromatografia em coluna.....	21
Tabela 5	
Frações do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i> submetidas à purificação por cromatografia planar preparativa.....	22
Tabela 6	
Frações obtidas no fracionamento de FPc 28-29, proveniente do extrato de folhas de <i>P. crassinervium</i>	22
Tabela 7	
Experimentos de eliciação realizados com células de <i>P. crassinervium</i> provenientes das suspensões celulares.....	33
Tabela 8	
Dados de RMN- ¹ H e ¹³ C para a substância 1.....	42
Tabela 9	
Dados de RMN- ¹ H e ¹³ C para a substância 2.....	42
Tabela 10	
Dados de RMN- ¹ H e ¹³ C para as hidroquinonas 3 e 4.....	47
Tabela 11	
Dados de RMN- ¹ H e ¹³ C para a substância 5.....	50
Tabela 12	
Composição relativa dos constituintes do óleo volátil de <i>P. crassinervium</i>	69

Tabela 13

Teores de proteínas solúveis obtidos dos tecidos analisados de

P. crassinervium 74

Tabela 14

Dados de RMN-¹H e ¹³C para a substância **6**..... 85

Tabela 15

Dados de RMN-¹H e ¹³C para a substância **7**..... 87

Tabela 16

Dados de RMN-¹H e ¹³C para as substâncias **8 e 9** 88

Tabela 17

Limite mínimo de detecção em µg das substâncias ativas 109

1. Introdução

O interesse do homem pelas substâncias químicas que estão ao seu redor é tão antigo quanto sua própria existência. Embora de forma rudimentar, os produtos naturais foram utilizados pela espécie humana na caça, na alimentação e na medicina (Lobo, 1976; Balandrin *et al.* 1985; Walton, 1992). Mesmo em batalhas visando a conquista de territórios entre os diversos povos, relatos descrevem a utilização de venenos mortais em flechas. Atualmente sabe-se que produtos naturais como a tubocurarina (Figura 1), extraída de *Chondodendron tomentosum* e espécies de *Strychnos*, possuem forte atividade como agente bloqueador neuromuscular, causando paralisia do músculo de forma letal (Mann, 1994).

Figura 1 – Estrutura do cloreto de tubocurarina

Na medicina, as civilizações antigas utilizavam os metabólitos de plantas na forma de extratos brutos ou mesmo pela aplicação das ervas nas partes afetadas, visando curar diversos males (Stafford, 1991).

O início da história moderna de produtos naturais de plantas ocorreu a partir do século XIX, quando se teve o registro dos primeiros estudos com base científica, que resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas medicinais (Montanari & Bolzani, 2001).

Nos estudos fitoquímicos de plantas usadas na medicina popular antigamente, no tratamento de doenças, foi detectado um grande número de compostos com atividade antitumoral. Entre estes encontram-se o ácido úsnico e a podofilotoxina. Alcalóides com

atividades contra o câncer (vinblastina e vincristina) também foram isolados de *Catharanthus roseus*, embora nesse caso o uso tradicional estivesse relacionado à diabetes (Stafford, 1991). Outros quimioterápicos como o taxol e os análogos da podofilotoxina, etoposídeo e teniposídeo, também foram descobertos, fazendo com que aumentasse o interesse pelos medicamentos de origem vegetal (Montanari & Bolzani, 2001).

O progresso alcançado no isolamento de novos produtos naturais foi diretamente relacionado com a evolução das técnicas de separação. O advento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi de particular importância, pois permitiu o isolamento e a purificação de uma gama de compostos, especialmente os de maior polaridade (Hamburger & Hostettmann, 1991). A evolução das modernas técnicas espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas e difração de raios-X, foi de extrema importância na elucidação estrutural de moléculas orgânicas de uma forma geral.

Num organismo vivo, os produtos diversos são sintetizados e degradados através de uma série de reações químicas, catalisadas por enzimas altamente específicas e seletivas na maioria dos casos. Este processo, conhecido como metabolismo, origina e degrada diversos produtos essenciais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos. Estas substâncias constituem os metabólitos primários, que estão presentes em todos os organismos, sendo essenciais para a sobrevivência e bom funcionamento deles. A segunda grande classe de substâncias, denominada de metabólitos secundários, é produzida a partir de um pequeno número de moléculas-chave, provenientes do metabolismo primário. Entre estes precursores fundamentais destacam-se o (1) acetato, precursor de ácidos graxos; (2) mevalonato, um dos precursores de isoprenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, esteróides); (3) ácido chiquímico, precursor de muitos compostos aromáticos, incluindo aminoácidos aromáticos, ácidos cinâmicos e certos polifenóis; e (4) alguns aminoácidos, que constituem-se nos precursores dos alcalóides. Muitos outros produtos são provenientes da biossíntese mista envolvendo duas classes de compostos precursores e, como exemplos podem ser citados os flavonóides e as quinonas preniladas (Mann, 1994).

Estes produtos do metabolismo secundário possuem ocorrência bastante específica, sendo encontrados em determinados organismos ou espécies, e expressam a individualidade destas espécies. Estas substâncias não são necessariamente produzidas em todas as condições e, na maioria dos casos, não se sabe exatamente qual a função

destes compostos. Sabe-se que algumas delas são sintetizadas por um indivíduo como defesa em relação a determinado predador, outras agem como atraentes voláteis para uma futura polinização, outras ainda são agentes que conferem cor a determinadas espécies. Com base nestas informações, assume-se que de uma maneira ou outra, estes produtos naturais exercem alguma função vital para o organismo que os sintetizam (Dewick, 1997).

Embora estas substâncias isoladas sejam denominadas “metabólitos secundários” e estejam muitas vezes em quantidades ínfimas nas plantas, elas culminaram por assumir várias aplicações no cotidiano do homem moderno (Figura 2). Alguns exemplos incluem inseticidas, flavorizantes, adoçantes e perfumes, além de serem utilizadas na área médica como analgésicos, anticolinérgicos, antimaláricos, etc (Stafford, 1991). Assim, tais produtos representam a base do arsenal terapêutico da medicina do século XX e, em função da sua importância econômica, representam as bases do mercado farmacêutico que movimenta cerca de 350 bilhões de dólares anualmente (Ferreira *et al.*, 1998). Alguns dos produtos naturais possuem uso indireto, como precursores de substâncias importantes, como é o caso das sapogeninas extraídas dos carás (*Dioscorea* spp), na síntese de hormônios sexuais e anticoncepcionais. A bacatina III ou cefalomanina são exemplos recentes de substâncias empregadas na síntese comercial do antitumoral taxol (Matos, 1988; Montanari & Bolzani, 2001).

codeína
(*Papaver somniferum*)
analgésico

quinina
(*Cinchona ledgeriana*)
antimalárico

atropina
(*Atropa belladonna*)
anticolinérgico

nicotina
(*Nicotiana tabacum*)
inseticida

Figura 2 - Exemplos de produtos naturais utilizados industrialmente

Um dos grandes atrativos de produtos naturais derivados de plantas continua sendo o estudo de suas rotas biossintéticas, que são extremamente elegantes do ponto de vista mecanístico e notáveis em termos de rendimento. Tais aspectos têm inspirado químicos sintéticos na busca de alternativas, utilizando-se enzimas de plantas ou de microrganismos em algumas etapas específicas, com o objetivo de se obter diversos produtos com atividade biológica, de maneira a minimizar a dependência de plantas como única fonte destas substâncias (Kutney, 1997).

Sabe-se que, dependendo da época do ano em que a planta é coletada, ou mesmo de seu habitat, existem variações nas concentrações dos compostos de interesse, o que acaba por dificultar o seu isolamento e caracterização (Kutney, 1997). As plantas estão sujeitas a uma variedade de estresses climáticos, que podem alterar o nível de produção destas substâncias, interferindo, desta maneira, na obtenção do produto desejado (Stafford, 1991).

Tendo-se em vista tais considerações, torna-se complexo depender exclusivamente de determinada espécie vegetal para a obtenção da substância de interesse, além de ser necessário quantidades adequadas para os fins requisitados. Através de processos de isolamento das substâncias a partir de plantas obtém-se quantidades que podem servir como materiais de partida para síntese de determinados produtos, mas tais enfoques são freqüentemente limitados pelos baixos rendimentos.

Os produtos naturais apresentam uma grande complexidade estrutural e as sínteses requerem tantas etapas que acabam por inviabilizar economicamente o processo. Do ponto de vista acadêmico, muitas sínteses constituem-se em grandes desafios intelectuais mas tornam-se inviáveis para produções em escala comercial (Kutney, 1997).

A cultura de células surgiu na década de 50 como uma poderosa ferramenta complementar para o estudo do metabolismo em plantas intactas. Entre as principais vantagens do uso de cultura de tecidos e células, podem ser citadas a relativa uniformidade de biomassa, a reprodutibilidade dos experimentos e a facilidade de obter grandes quantidades de células (Dougall, 1981). Por receberem condições de tratamento controladas em laboratório, os parâmetros de crescimento, tais como pH, mudanças nos nutrientes do meio e temperatura, podem ser manipulados e otimizados com a finalidade de se alcançar uma produção maior dos produtos secundários, em comparação com a planta cultivada. A menor complexidade dos extratos obtidos através da cultura de células constitui-se também num aspecto favorável contribuindo para a separação das substâncias alvo. Estes sistemas *in vitro* constituem-se também numa excelente fonte de enzimas, freqüentemente superior à das plantas diferenciadas, favorecendo a realização de experimentos de biossíntese e de biotransformações, relacionados à produção dos metabólitos (Zenk, 1991; Kutney, 1997).

Apesar disso, existem também as desvantagens, que incluem um esforço contínuo em se manter estes sistemas celulares, através da realização freqüente de sub-culturas, os custos de manutenção, assim como problemas causados pela instabilidade genética

que culminam por alterar todo o comportamento destas células, afetando a produção de determinado metabólito secundário (Dougall, 1981). A produção econômica de produtos naturais através dessa técnica está ainda restrita a poucos exemplos e constitui-se ainda num desafio.

Diante desse cenário, pode-se compreender a razão pela qual a pesquisa de novos fármacos provenientes de plantas constitui-se numa das áreas mais competitivas no meio acadêmico e, principalmente, no setor industrial. De uma forma geral, essa investigação é tipicamente uma atividade interdisciplinar que requer a colaboração tanto de químicos de produtos naturais e de síntese orgânica, como de botânicos, biólogos e farmacólogos, sendo praticamente impossível atingir resultados satisfatórios através de pesquisas realizadas de forma isolada.

1.1 A Família Piperaceae

A família Piperaceae compreende 14 gêneros e cerca de 1950 espécies, segundo Mabberley (1997). Os gêneros *Piper* e *Peperomia* (Figura 3) são os mais representativos, com aproximadamente 700 e 600 espécies, respectivamente (Joly, 1985).

Em geral, as espécies de Piperaceae caracterizam-se por serem plantas predominantemente herbáceas, raramente sendo arbóreas ou arbustivas. Espécies de *Piper*, presentes nas regiões tropicais e subtropicais, têm sido amplamente investigadas devido a inúmeras substâncias biologicamente ativas nelas presentes, o que justifica seu amplo uso na medicina popular, como remédios para dores no estômago, agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e contra asma, e até como repelentes de insetos (Parmar *et al.*, 1997).

Figura 3 – Algumas espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*

No início do século XIX o sabor picante dos frutos de *Piper nigrum* motivou estudos fitoquímicos que resultaram no isolamento e caracterização da amida piperina (Figura 4), responsável pelo princípio picante desta pimenta (Sengupta & Rao, 1987).

Figura 4 – Estrutura da amida piperina

De *Piper methysticum* (kava-kava), uma espécie de ocorrência restrita às ilhas do Pacífico Sul, de importância comercial por causa de suas propriedades calmantes, foram

isoladas substâncias denominadas de kavapironas (metisticina e kavaína) (Figura 5), que apresentam efeitos hipnótico e anestésico (Smith, 1983; Singh, 1992).

Figura 5 – Estruturas de kavapironas isoladas de *Piper methysticum*

A pesquisa de novos constituintes de *Piper* foi intensificada recentemente devido à detecção de várias substâncias com atividade biológica, como alcalóides citotóxicos, amidas com atividade antifúngica e lignanas com atividade anti-PAF, antifúngica e anti-tumoral (Matsui & Munakata, 1976; Sun *et al.*, 1987; Duh, *et al.*, 1990; Ruangrunsi *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1997; Alécio *et al.*, 1998).

Investigações fitoquímicas das espécies de *Piper* possibilitaram a descrição de uma grande variedade de novos compostos químicos, incluindo-se alcalóides e amidas, lignanas, neolignanas, propenilfenóis, terpenos, esteróides, chalconas, diidrochalconas, flavonas, flavanonas, kavapironas e piperolídeos (Sengupta & Rao, 1987; Jensen *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1997). Alcalóides e amidas são considerados os constituintes mais comuns de espécies de *Piper* e também os mais estudados por apresentarem atividades biológicas. A aduncamida, isolada de *Piper aduncun*, apresentou atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (Orjala *et al.*, 1993) enquanto a amida pirrolidínica, *N*-[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(*Z*),4(*Z*)-heptadienoil]pirrolidina, isolada de *P. hispidum*, mostrou ser ativa contra o fungo *Cladosporium shaerospermum* (Alécio *et al.*, 1998).

As aristolactamas pertencem a um reduzido grupo de alcalóides, encontrados principalmente na família Aristolochiaceae, sendo responsáveis pela origem do nome desta classe de compostos. Entretanto as aristolactamas têm sido relatadas em espécies de Piperaceae, além das famílias Annonaceae, Menispermaceae e Monimiaceae (Desai *et al.*, 1990).

O interesse por esta sub-classe de alcalóides é devido a diversidade de atividades biológicas, destacando-se a potente atividade inseticida apresentada pelas aristolactamas. A relação estrutural entre o ácido aristolóquico (Figura 6), um nitrocomposto bastante tóxico, as aristolactamas e os alcalóides dioxoaporfínicos e isoquinolínicos tem motivado diversos estudos biossintéticos (Chen, Z-L. & Zhu, D-Y., 1987).

Figura 6 - Estrutura do ácido aristolóquico

As lactamas fenantrênicas, ou aristolactamas, isoladas de espécies de *Piper* são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Aristolactamas isoladas de espécies de *Piper*

Estruturas	Referência
<p style="text-align: center;">1</p> <p> 1a $R_1 = R_2 = \text{Me}; R_3 = \text{H}$ (piperolactama D) 1b $R_1 = R_3 = \text{Me}; R_2 = \text{H}$ (goniopetalina) 1c $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{Me}$ (piperolactama B) 1d $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Me}$ (piperolactama C) </p>	Olsen <i>et al.</i> , 1993; Singh <i>et al.</i> , 1996
Ruangrunsi <i>et al.</i> , 1992
<p style="text-align: center;">Piperolactama A</p>	Singh <i>et al.</i> , 1996

Flavonóides são produtos naturais presentes em muitas espécies de plantas, mas que apresentam uma ocorrência restrita no gênero *Piper* (Tabela 2). Estes compostos estão associados à capacidade protetora contra radiação UV além de estarem envolvidos como compostos de defesa contra microorganismos. Os flavonóides também são encontrados em frutas, vegetais, chás e vinhos, fazendo parte da dieta alimentar humana (Harborne & Williams, 2000). A Tabela 2 relaciona as flavanonas isoladas de diferentes espécies de *Piper* (Sengupta & Rao, 1987; Parmar *et al.*, 1997).

Tabela 2 – Flavanonas isoladas de espécies de *Piper*

Composto	Planta
5,7-dihidroxi-flavanona (1)	<i>P. hostmannianum</i> <i>P. steerni</i>
6-hidroxi-5,7-dimetoxi-flavanona (2)	<i>P. hispidum</i>
8-hidroxi-5,7-dimetoxi-flavanona (3)	<i>P. hispidum</i>
5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetil-flavanona (4)	<i>P. hostmannianum</i>
5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (5) (pinostrobin)	<i>P. aduncum</i> <i>P. fadyenii</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. steerni</i>
5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona (6) (sakuranetina)	<i>P. aduncum</i>
5,7,8-trimetoxi-flavanona (7)	<i>P. hispidum</i>
7-hidroxi-5-metoxi-flavanona (8) (alpinetina)	<i>P. methysticum</i>
5,7-dihidroxi-6-metoxi-flavanona (9) (dihidrooroxilina A)

- (1) $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$
- (2) $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=OH$; $R_4=R_5=H$
- (3) $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=R_5=H$; $R_4=OH$
- (4) $R_1=R_5=H$; $R_2=R_3=R_4=CH_3$
- (5) $R_1=R_2=R_4=R_5=H$; $R_3=CH_3$
- (6) $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=CH_3$; $R_5=OH$
- (7) $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=R_5=H$; $R_4=OCH_3$
- (8) $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=R_4=R_5=H$
- (9) $R_1=R_3=R_4=R_5=H$; $R_2=OCH_3$

Figura 7 – Estruturas químicas das flavanonas isoladas de espécies de *Piper*

1.2 *Piper crassinervium*

Piper crassinervium Kunth, objeto deste trabalho, é um arbusto que ocorre na Mata Atlântica (Brasil), além de ser encontrada na Colômbia, Equador e Peru. Tem 2 a 5 metros de altura. Suas folhas possuem um formato ovalado, com um ápice acuminado, medindo de 5 a 15 cm de largura e de 13 a 25 cm de comprimento (Yuncker, 1972).

Figura 8 - Espécie de *P. crassinervium* cultivada no Instituto de Química - USP

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos o estudo químico e biológico da espécie *P. crassinervium*. Devido a ausência de relatos anteriores sobre sua composição química, o estudo foi direcionado para a comparação dos metabólitos secundários presentes em folhas de *P. crassinervium* com aqueles encontrados em suspensões celulares desta espécie. Sendo frequente a presença de compostos fenólicos em espécies de *Piper*, a capacidade metabólica foi avaliada através da determinação da atividade de enzimas específicas. Dessa maneira, este trabalho foi desenvolvido através das etapas seguintes:

1. Isolamento e determinação estrutural dos principais metabólitos secundários de folhas de plantas diferenciadas, incluindo a análise do óleo essencial de *P. crassinervium*;
2. Estabelecimento de suspensões celulares e obtenção de diversos parâmetros de crescimento visando sua caracterização, incluindo-se o isolamento e a determinação estrutural dos principais metabólitos secundários;
3. Análise das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS) envolvidas na biossíntese dos metabólitos fenólicos isolados de folhas e das suspensões celulares;
4. Avaliação das respostas das suspensões celulares mediante a utilização de precursores ou de agentes estimulantes (eliciadores) da biossíntese de metabólitos secundários, e
5. Investigação da atividade antifúngica (Bioautografia) dos metabólitos secundários isolados dos diferentes tecidos de *P. crassinervium*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

As folhas estudadas de *P. crassinervium* foram coletadas no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR, localizado no Vale do Ribeira, município de Iporanga, Estado de São Paulo. Esta espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidade Pedro Ruiz Gallo, Tambayeque, Peru) e a exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica. As sementes utilizadas para germinação de plântulas, fonte de explantes para cultura de células, foram coletadas em outubro de 1998 no Parque Estadual da Serra do Mar, Picinguaba, município de Ubatuba, Estado de São Paulo. Esta espécie de *Piper* também é cultivada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Figura 8).

3.2 Obtenção de plântulas axênicas, calos e suspensões celulares de *Piper crassinervium*

3.2.1 Micropropagação de *P. crassinervium*

A partir de plantas intactas de *P. crassinervium*, de 3 a 5 meses de idade, obtidas por germinação de sementes, ápices caulinares e nós, de 1 cm de comprimento, foram inoculados para o estabelecimento de plantas propagadas cultivadas *in vitro*. Estes explantes foram desinfetados durante 10 minutos em solução etanólica 70% e, posteriormente, lavados com água destilada em condições assépticas, antes da inoculação. O meio utilizado para a propagação de plântulas, classificado como N1, consistiu dos sais inorgânicos Gamborg B5 (1968) suplementado com mio-inositol (100 mg/L), tiamina (1 mg/L), sacarose (30 g/L), ácido indolacético (AIA) (0,02 mg/L), ácido giberélico (AG₃) (0,02 mg/L) e Fitagel® (Sigma) (0,7%). Esta formulação foi estabelecida pelo prof. Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes (Universidade Pedro Ruiz Gallo, Tambayeque, Peru).

Estas plântulas cultivadas *in vitro* serviram como fonte de explantes para a micropropagação de plântulas de *P. crassinervium*, no caso, os ápices caulinares e os nós, cultivados em posição vertical no meio de cultura N1. Estas culturas foram mantidas

sob $35 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ de irradiância, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 30 W, sob temperatura de 24-26°C e fotoperíodo de 16/8 h.

Para conservação do germoplasma *in vitro* foram mantidas 5-8 plantas desta espécie, propagadas por culturas de nós e mantidas sob $20 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ de irradiância.

3.2.2 Indução de calos

Para a indução de calos foram utilizados os nós provenientes de plantas axênicas obtidas *in vitro*, que serviram como fonte de explantes, que foram mantidos a $0-5 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ de irradiância e nas mesmas condições ambientais de incubação já descritas. O meio de cultura utilizado foi denominado de BC-1 e consistiu no meio Gamborg B5 (1968) suplementado com mio-inositol (100 mg/L), tiamina (1 mg/L), sacarose (30 g/L), ácido naftalenoacético (ANA) (1,0 mg/mL), 6-benzilamino purina (BAP) (0,2 mg/mL) e Fitigel® (Sigma) (0,7%).

A manutenção dos calos foi realizada por repicagens sucessivas (intervalo de 20 dias), e constituiu-se num processo mais crítico que a própria indução, devido ao problema de oxidação, necrosamento e morte das células do calo após a repicagem.

3.2.3 Suspensões celulares

A partir dos calos friáveis foram iniciadas as suspensões celulares, utilizando-se o meio de cultura denominado BC-1, sem a adição do Fitigel®. As repicagens das suspensões celulares estabelecidas foram efetuadas com intervalo de quinze a vinte dias, descartando-se o meio usado e distribuindo uma quantidade equivalente de células em dois Erlenmeyers contendo o meio BC-1 fresco.

A Figura 9 apresenta a sequência de passos para obtenção de plantas propagadas cultivadas *in vitro* e suspensões celulares de *P. crassinervium*.

Cultura de células de *Piper crassinervium*

Figura 9 – Etapas principais para obtenção de plantas propagadas cultivadas *in vitro* e suspensões celulares de *P. crassinervium*

3.3 Obtenção dos extratos de folhas e de cultura de células de *Piper crassinervium*

Os solventes utilizados para a extração dos tecidos estudados foram das marcas Merck, Vetec, CRQ e Synth com diferentes graus de pureza dependendo da finalidade do uso. Os que não apresentaram qualidade adequada foram purificados por destilação fracionada.

3.3.1 Extratos de folhas de *P. crassinervium*

Folhas de *P. crassinervium* (748 g) foram secas, moídas, e submetidas à extração a frio com 500 mL de EtOAc por três vezes, obtendo-se 10,6 g do extrato de folhas, após a concentração e eliminação do solvente.

3.3.2 Extratos do meio BC-1 e das células provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*

Células de *P. crassinervium* obtidas a partir da filtração a vácuo das suspensões celulares (Figura 10) foram extraídas com metanol sob banho de ultrassom. Depois da eliminação do solvente, o extrato obtido foi submetido à partição com acetato de etila, e novamente concentrado, obtendo-se então o extrato de células.

Figura 10 – Suspensão celular de *P. crassinervium*

Para obtenção do extrato do meio celular BC-1 fez-se a partição do meio de cultura das suspensões celulares, com aproximadamente 300 mL de EtOAc, por três vezes. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada em rotaevaporador para eliminação do solvente.

3.4 Análise dos extratos de folhas e de cultura de células de *Piper crassinervium*

O fracionamento dos extratos obtidos foi realizado através das técnicas de cromatografia em coluna e planar, enquanto que a análise dos extratos e das substâncias isoladas foi realizada por CLAE e por cromatografia planar comparativa.

3.4.1 Cromatografia planar e cromatografia em coluna

Para preparação das placas usadas para cromatografia planar comparativa (CPC) e preparativa (CPP) utilizou-se sílica gel PF₂₅₄, da Merck. As revelações das substâncias foram efetuadas com irradiação de luz UV de 254 e 366 nm, seguidas de borrifações com sulfato cérico e aquecimento a 80°C, por 15 minutos. A recuperação das frações após a separação por CPP foi realizada por extração com EtOAc.

Para o fracionamento cromatográfico em coluna (CC) utilizou-se sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm) da Merck.

Os eluentes usados para o fracionamento das substâncias foram:

S1 - diclorometano: acetona: hexano 79,6 : 0,4: 20

S2 - hexano: acetato de etila: isopropanol 70: 30: 1

S3 - hexano: acetato de etila 70: 30

S4 - hexano: diclorometano: acetato de etila 70: 17,5: 37,5

S5 - diclorometano: acetona: hexano 78,4: 1,6: 20

S6 – clorofórmio: metanol 90: 10

A concentração dos solventes foi realizada sob pressão reduzida, por bomba de vácuo, usando-se rotaevaporadores.

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo, Shimadzu, mod. LC-10, munido de detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável e injetor automático, modelo SIL-10A. Para as análises por CLAE foram utilizados solventes de grau cromatográfico da Merck e colunas (a) analítica, fase reversa - RP-18 Supelco 5 µm, 250 x 4 mm (Supelcosil), (b) analítica, fase reversa - Luna C18, 250 x 4 mm 5 µm (Phenomenex) e (c) semi-preparativa, fase reversa -Luna C18, 250 x 10 mm 5 µm (Phenomenex).

Na análise qualitativa dos extratos de folhas e culturas de células de *P. crassinervium*, assim como na purificação das substâncias isoladas, foi utilizado o sistema de solventes metanol:água (S7), no modo gradiente (Tabela 3), com detecção a 254 nm. O fluxo e o volume de injeção variaram de acordo com a coluna utilizada, sendo 1,0 mL/min e 20 µL, respectivamente, para colunas analíticas e 4,7 mL/min e 350 µL para a coluna semi-preparativa. O tempo de equilíbrio estabelecido antes de cada injeção foi de 7 minutos.

Um tratamento prévio dos extratos foi introduzido antes das injeções e constituiu-se na suspensão de uma massa conhecida de cada extrato ou fração em metanol, seguida de filtração em coluna C-18 seppak, para eliminação da matriz lipofílica.

Tabela 3 – Condição eluotrópica (S7) utilizada na análise dos extratos de folhas, cultura de células e substâncias isoladas de *P. crassinervium*

MeOH	H ₂ O	Tempo (min)
65	35	0
100	0	25
100	0	30

- Para o ensaio da atividade da PAL

A análise do ácido cinâmico formado nos ensaios de atividade da PAL foi realizada através do sistema S8, MeOH:H₂O:CH₃COOH 60:40:1, no modo isocrático, com detecção a 275 nm e fluxo de 1 mL/min.

- Para o ensaio da atividade da CHS

A análise da naringenina formada no ensaio da chalcona sintase foi realizada de acordo com o método estabelecido por Zuurbier (1993), e denominado neste trabalho como sistema de solventes S9, MeOH:H₂O:H₃PO₄ 85% (v/v) (70:30:0,25), no modo isocrático, com detecção a 290 nm e fluxo de 1 mL/min.

3.4.3 Fracionamento do extrato de folhas de *P. crassinervium*

Extrato de folhas de *P. crassinervium* (10 g) foi submetido à cromatografia em coluna utilizando-se como eluente misturas de hexano:acetato de etila em ordem

crescente de polaridade. Foram obtidas 50 frações de 50 mL, analisadas em seguida por cromatografia planar comparativa e agrupadas, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Frações obtidas no fracionamento do extrato de folhas de *P. crassinervium* por cromatografia em coluna

Frações	Denominação	Massa (mg)
2	FPc2	103,2
3-4	FPc3	85,5
5-6	FPc5	688,3
7	FPc7	381,7
8	FPc8	206,2
9-12	FPc9	328,4
13	FPc13	25,1
14	FPc14	41,1
15	FPc15	42,9
16	FPc16	51,1
17-18	FPc17	125,2
19-22	FPc19	148,0
23	FPc23	49,7
24-27	FPc24	326,0
28-29	FPc28	136,0
30	FPc30	101,6
31	FPc31	210,4
32	FPc32	113,1
33	FPc33	115,1
34-36	FPc34	439,0
37-38	FPc37	630,6
39-40	FPc39	278,6
41	FPc41	441,9
42-45	FPc42	467,4
46	FPc46	659,2
47	FPc47	700,8
48	FPc48	263,5
49	FPc49	393,1
50	FPc50	468,6

As frações agrupadas foram analisadas por CLAE (sistema S7) e posteriormente, submetidas a purificação por CPP, utilizando-se diferentes sistemas de solventes (Tabela 5).

Tabela 5 – Frações do extrato de folhas de *P. crassinervium* submetidas à purificação por cromatografia planar preparativa

Frações	Sistema de solventes utilizado
24-27	S1
28-29	S2, CC
30	S3
32-33	S1
34-36	S2
42-45	S1
46	S3
48	S2

A fração 28-29, depois de analisada por CLAE (sistema S7), foi submetida a CC, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila, em ordem crescente de polaridade, resultando em 23 frações, que depois de analisadas por CPC, foram agrupadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Frações obtidas no fracionamento de FPc 28, proveniente do extrato de folhas de *P. crassinervium*

Frações	Massa (mg)
28.4	75,4
28.10-28.11	22,7
28.12-28.17	16,3

A Figura 11 descreve o fracionamento cromatográfico para obtenção das substâncias isoladas de folhas de *P. crassinervium*.

Figura 11 – Fracionamento do extrato de folhas de *P. crassinervium*

3.4.4 Fracionamento do extrato de células de *P. crassinervium*

O extrato de células proveniente das suspensões celulares de *P. crassinervium* foi purificado por cromatografia planar preparativa, tendo-se como eluentes o sistema S3. Nesta condição foram separadas quatro faixas (Figura 12), dentre elas duas substâncias puras (alcalóides **6** e **7**), sendo que a segunda fração (cel 1) foi submetida novamente à cromatografia planar preparativa (sistemas S3 e S6), originando duas frações. A fração denominada 1b, ainda uma mistura, foi submetida à cromatografia líquida (sistema S7), em coluna Luna semi-preparativa, resultando nas substâncias **8** e **9**.

Figura 12 – Fracionamento do extrato de células provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*

3.5 Estudo do óleo volátil de folhas de *Piper crassinervium*

Além do isolamento das substâncias acumuladas nas folhas de *P. crassinervium* fez-se o estudo dos componentes voláteis presentes no óleo obtido dessas folhas, através da cromatografia gasosa e CG/EM, considerando que não existem até o momento dados sobre sua composição.

3.5.1 Material vegetal

As folhas utilizadas no estudo da composição dos componentes voláteis foram coletadas em Araraquara, Estado de São Paulo, em outubro de 1998.

3.5.2 Isolamento dos compostos voláteis

Folhas frescas (280 g) de *P. crassinervium* foram submetidas à hidrodestilação, durante três horas, em um aparelho do tipo Clevenger. O óleo originado desta extração foi utilizado para o estudo dos componentes voláteis presentes.

3.5.3 Condições de análise do óleo volátil

O fracionamento e análise quantitativa do óleo volátil foram realizados por cromatografia gasosa (CG), sendo que a associação desta técnica à espectroscopia de massas (CG/EM) permitiu inferir sobre a identidade da maioria dos constituintes da mistura. A determinação dos constituintes voláteis de *P. crassinervium* foi baseada na comparação dos tempos de retenção dos constituintes do óleo com os de padrões ou de compostos de banco de dados.

Nesta análise foram utilizados um cromatógrafo Shimadzu GC-17A equipado com um programa Shimadzu GC 10, uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, cobertas com DB-5) e um detector de ionização de chama. A temperatura do forno variou de 60 a 300°C, a 3°C/min, utilizando-se gás hélio como gás de arraste (1 mL/min). As temperaturas do injetor e detector foram de 220 e 250°C, respectivamente. Para cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu, com coluna capilar, acoplado a um espectrômetro de massa com analisador quadrupolar (QP 5000) operando a 70 eV nas mesmas condições descritas acima.

3.6 Extração de proteínas para doseamento da fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS)

Com o objetivo de se comparar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas, plantas propagadas *in vitro* e culturas de células de *P. crassinervium*, foram feitos ensaios de doseamento desta enzima para estes tecidos.

3.6.1 Protocolo para extração da enzima PAL

O material fresco (folhas, células e tecidos de plantas propagadas de *P. crassinervium*) foi congelado em nitrogênio líquido e triturado com auxílio de um almofariz e pistilo. Foram adicionados polivinilpolipirrolidona (PVPP) (0,005g/g de material fresco) e uma quantidade equivalente de sílica-60 neste processo. Este material fresco foi suspenso em tampão borato 0,1 M, pH 8,8 (3 mL de tampão/g de material fresco). O homogeneizado foi filtrado em gaze, em banho de gelo. O filtrado foi então centrifugado a 10.000 g por 20 min a 4°C (Moreno *et al.*, 1994). As proteínas do sobrenadante foram dessalinizadas e concentradas em uma coluna PD-10 (Sephadex G-25) e foram usadas tanto para o ensaio da atividade enzimática por CLAE como para o doseamento de proteína segundo Bradford (1976).

3.6.2 Ensaio da atividade da PAL

Duzentos microlitros do extrato proteico foram incubados durante 30 min, a 29 °C, em 1 mL de tampão borato 0,1 M, pH 8,8, contendo 300 µL de fenilalanina 10 mM. A incubação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido clorídrico. Após a adição de 50 µL do padrão interno 4-metilumbeliferona 1 mM, a mistura foi centrifugada por 5 min a 10000 g e então analisada por CLAE (Heide *et al.*, 1989).

3.6.3 Análise por CLAE

O ácido cinâmico foi determinado por CLAE, por meio da injeção de 20 µL do sobrenadante utilizando-se uma coluna Supelcosil LC-18 e o sistema de solventes S8.

A determinação da atividade da PAL nos tecidos estudados foi baseada na seguinte equação:

$$\text{Atividade PAL (pKatal/mL)} = \frac{[(A \text{ ácido/A p.i.}) - (A \text{ ácido B/ A p.i.})] \times \text{p.i.}}{R \times \text{tempo incubação} \times V}$$

Onde,

A = área

B = ensaio branco

R = fator de conversão obtido através da curva padrão da albumina sérica bovina

tempo de incubação = 30 min

V = volume da preparação enzimática utilizada no ensaio (0,2 mL)

p.i. = massa do padrão interno (50 pmol)

3.6.4 Doseamento de proteínas totais

O doseamento de proteínas em folhas intactas, plântulas propagadas *in vitro* e células provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*, foi realizado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (kit Bradford – Bio-Rad). A ligação do corante à proteína causa um deslocamento no máximo de absorção do corante, de 465 para 595 nm, onde a formação do complexo pode ser monitorada.

Protocolo do ensaio:

1. Dez microlitros do extrato proteico foram pipetados em uma cubeta de poliestireno (1 cm, 1,5 mL).
2. Adicionou-se 1190 µL de tampão borato pH 8,8 e 300 µL do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250), seguido de agitação.
3. A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 min.
4. Mediu-se a absorbância a 595 nm (espectrofotômetro UV/VIS Perkin-Elmer, modelo Lambda 3P).
5. O teste branco deste ensaio foi feito com 1200 µL de tampão borato e 300 µL do corante.

3.6.5 Ensaio para extração enzimática da chalcona sintase (CHS) (0-4°C)

Folhas de *P. crassinervium* foram congeladas em N₂ líquido, trituradas com auxílio de um almofariz e pistilo, com sílica e cerca de 10% PVPP (peso/peso). O pó formado foi misturado com o tampão de extração (2 mL de tampão / g de tecido vegetal), filtrado e

centrifugado a 14000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio da chalcona sintase (Zuurbier *et al.*, 1993).

Tampão de extração:

Para extração da CHS foi utilizado o tampão fosfato 0,5 M, pH 8, com adição de 1,5% de polietilenoglicol (peso/volume), 400 mM de sacarose, 1 mM de cloreto de cálcio e 0,1% de albumina sérica bovina (peso/volume). Este tampão foi deaerado e posteriormente foram adicionados 200 mM de ácido ascórbico, 50 mM de EDTA, 50 mM de cisteína e 10% Dowex (peso/volume).

3.6.6 Ensaio da atividade da CHS

Foram adicionados em um Eppendorf 25 µL do extrato protéico (sobrenadante), 75 µL do tampão para ensaio, 5 µL de malonil-CoA 0,4 mM (2 nmol) (Sigma) em tampão citrato 0,1 M (pH 3) e 5 µL de *p*-cumaroil-CoA 0,2 mM (1 nmol) (previamente preparado). Para controle fez-se um ensaio sem *p*-cumaroil-CoA. As soluções foram incubadas à 30°C, por 30 minutos. No final da incubação foram adicionados 1200 µL de EtOAc, sendo a mistura agitada em vórtex e posteriormente centrifugada por 2 minutos.

A fase orgânica destes ensaios foi evaporada e o resíduo foi ressuspendido em 20 µL de metanol e analisado por CLAE (sistema S9) (Zuurbier *et al.*, 1993).

Tampão para o ensaio:

Para o ensaio da atividade da CHS foi utilizado o tampão fosfato, 0,5 M, pH 6,8, com adição de 2,8 mM 2-mercaptoetanol e 2% de albumina sérica bovina (peso/volume).

3.6.7 Análise por CLAE

O produto formado no período da incubação foi analisado por CLAE, de acordo com o método estabelecido por Zuurbier (1993), para detecção da naringenina, substância proveniente da reação entre o malonil-CoA e *p*-cumaroil-CoA, tendo-se como referência o tempo de retenção da naringenina (Sigma) previamente analisada nas mesmas condições. Utilizou-se nesta análise uma coluna C-18 (Supelcosil) e o sistema de solventes S9.

tempo de retenção da naringenina (Sigma) previamente analisada nas mesmas condições. Utilizou-se nesta análise uma coluna C-18 (Supelcosil) e o sistema de solventes S9.

3.7 Preparação dos precursores para o ensaio de doseamento da chalcona sintase

De acordo com Grisebach (1985), o primeiro produto na biossíntese dos flavonóides, a 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (naringenina chalcona), é formado pela condensação de uma molécula de *p*-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, através da ação da chalcona sintase (Cooman *et al.*, 1993). O tioéster *p*-cumaroil-CoA foi preparado através da conversão em seu éster succinimídico correspondente que, por sua vez, reagiu com a coenzima A.

3.7.1 Preparação do ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico foi preparado através da condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e o *p*-hidroxi-benzaldeído, catalisada por aminas (Katayama *et al.*, 1992). Foram utilizados 2,43 g de ácido malônico e 1,9 g de *p*-hidroxi-benzaldeído, que foram solubilizados em 3,5 mL de piridina, e adicionou-se uma gota de piperidina e uma gota de anilina, previamente destiladas. A temperatura foi mantida por 55°C, por 24 horas, e depois foi elevada para 100°C, por mais uma hora. Fez-se a adição de 15 mL de água à 80°C e a mistura foi resfriada à temperatura ambiente. Em seguida foi acidificada com 5,0 mL de HCl 2M e extraída com EtOAc (25 mL x 6). A fase orgânica foi concentrada até metade do volume inicial e extraída posteriormente com uma solução de bicarbonato de sódio 5% (20 mL x 4). As frações aquosas foram combinadas, extraídas com diclorometano (20 mL), acidificadas à pH 1 e extraídas com EtOAc (20 mL x 6).

A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida, fornecendo o ácido *para*-cumárico, que foi caracterizado por CLAE (sistema S7) através da comparação com o ácido padrão e RMN-¹H (H-2, δ 6,94, *dd*; H-3, δ 7,72, *dd*; H-5, δ 7,62, *dd*; H-6, δ 6,94, *dd*; H-7, δ 6,40, *d*; H-8, δ 7,70, *d*).

3.8 Caracterização das culturas de *Piper crassinervium*

Suspensões celulares com 15 a 20 dias de cultivo foram utilizadas como inóculo para a determinação da curva de crescimento. Estas suspensões foram filtradas à vácuo, em condições assépticas, sendo inoculados 5 g de células por frasco contendo 50 mL de meio BC-1. Este procedimento foi realizado em triplicata, nos intervalos apresentados na parte dos resultados, e foram mantidos em agitadores a 100 rpm.

3.8.1 Determinação do peso fresco

As células foram separadas das suspensões celulares de *P. crassinervium* por filtração a vácuo e foram pesadas para determinação do peso fresco.

3.8.2 Determinação do peso seco

Para determinação do peso seco as células separadas das suspensões de *P. crassinervium* foram colocadas em estufa, a 50°C, até atingir peso constante.

3.8.3 Determinação do pH do meio de cultura

Os meios provenientes da filtração das suspensões celulares de *P. crassinervium*, foram analisados quanto ao pH com auxílio de um pH-metro.

3.8.4 Determinação da atividade específica da PAL

Com base na equação da reta da curva padrão da albumina sérica bovina, em diferentes concentrações, determinou-se a quantidade total de proteínas nas células avaliadas desta curva. A atividade específica da PAL (nkat/mg proteína) foi calculada como a relação entre a atividade da PAL e a quantidade de proteínas totais.

A sequência biossintética que conduz à formação das aristolactamas tem como importante precursor a fenilalanina/tirosina, que devem sofrer uma reação de

descarboxilação mediada pela tirosina descarboxilase, resultando na feniletilamina. Ainda assim, a determinação da atividade da PAL foi realizada, visando determinar algumas condições básicas para induzir a formação de flavonóides nas suspensões celulares.

3.8.5 Quantificação das substâncias presentes no extrato de células de *P. crassinervium*

A quantificação das substâncias isoladas do extrato de células foi baseada na curva de crescimento celular. Foi feita uma nova curva nos mesmos parâmetros da descrita previamente, a fim de se poder analisar o acúmulo das substâncias no decorrer do crescimento das células. Foram analisados novamente oito pontos da curva, nos mesmos intervalos de tempo da anterior, e para cada ponto foram determinados o peso fresco e o peso seco. Neste caso, porém, as células foram congeladas a -80°C , liofilizadas e pesadas, para a determinação da matéria seca.

A partir destas células obteve-se os extratos em metanol referentes aos diversos pontos da curva, que foram tratados em Sep-pak (fase reversa), filtrados e analisados por CLAE (sistema S7). Utilizou-se como padrão interno 1 mg de ferulato de metila, que foi extraído junto com as células, para posterior quantificação, além da curva padrão de cada substância isolada em diferentes concentrações.

3.8.6 Quantificação das substâncias presentes no extrato do meio celular

Os meios de cultura provenientes dos oito pontos da curva também foram analisados, a fim de se determinar a quantidade de substâncias excretadas das células. Para esta análise, os meios, depois de separados das células (aproximadamente 40 mL), foram submetidos à partição com EtOAc, por três vezes, juntamente com o padrão interno ferulato de metila (1 mg). Após evaporação do solvente em rotaevaporador, sob pressão reduzida, estes foram analisados por CLAE (sistema S7), tendo-se como referência o padrão interno e as curvas padrão das substâncias isoladas.

3.8.7 Experimentos de eliciação com cultura de células de *P. crassinervium*

Estes experimentos foram realizados visando-se observar e determinar quais metabólitos estariam envolvidos nas respostas defensivas das células, mediante tratamento com fenilalanina, extrato de levedura e luz UV. Em princípio seriam observados os teores relativos das aristolactamas previamente isoladas, mas eventualmente outros

metabólitos produzidos em níveis detectáveis poderiam ser analisados quanto à suas estruturas.

Para estes experimentos com eliciadores foram utilizadas suspensões celulares de 21 e 28 dias. Estas suspensões celulares foram filtradas à vácuo, em condições assépticas, fornecendo as células frescas, que foram transferidas para Erlenmeyers autoclavados com o meio BC-1 (Tabela 7).

Tabela 7 – Experimentos de eliciação realizados com células de *P. crassinervium* provenientes das suspensões celulares

Tipo de experimento	Volume do meio BC-1	Massa de células (g)	Quantidade de Erlenmeyers	Idade das suspensões
Fenilalanina	50 mL	5,5	9	28 dias
Luz UV	30 mL	4,0	12	21 dias
Extrato de levedura	50 mL	5,0	9	21 dias

Para os experimentos com fenilalanina e extrato de levedura os ensaios foram preparados em duplicata, enquanto experimentos com luz UV, em triplicata. Em todos experimentos foram realizados ensaios controle (branco).

Foram determinados os intervalos de tempo de tratamento, após a adição do precursor/eliciador, de 24h, 48h e 66h para cada série de experimentos. Após cada intervalo, as suspensões celulares de cada experimento foram filtradas a vácuo, separando-se as células dos meios de cultura. Em seguida, as células foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, liofilizadas para a determinação da matéria seca. Estas células foram extraídas com metanol, juntamente com 1 mg do padrão interno, ferulato de metila, e evaporadas para eliminação do solvente. Estes extratos foram submetidos à partição, com EtOAc, sendo que a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e analisada por CLAE (sistema S7).

Os meios de cultura foram submetidos à partição com EtOAc, juntamente com 1 mg do padrão interno, e evaporados. As fases orgânicas, após secagem e concentração, foram analisadas por CLAE (sistema S7).

A) Experimento com fenilalanina

Uma solução estoque de fenilalanina foi preparada numa concentração de 51 mM e esta foi filtrada em filtro estéril, em condições assépticas. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para cada um dos 6 erlenmeyers contendo 5,5 g de células/50 mL de meio BC-1. Nos 3 Erlenmeyers restantes foram adicionados 1 mL de água destilada, previamente autoclavada, que foram utilizados como ensaios controle neste experimento. As células e os meios provenientes deste experimento foram analisados nos intervalos de 24, 48 e 66 horas.

A análise dos extratos das células e do meio de cultura foi realizada de forma análoga à descrita no item anterior.

B) Experimento com luz UV

Duas lâmpadas de luz UV, de 20 W cada, foram adaptadas em agitadores (aproximadamente 50 cm de distância) e estes foram revestidos com uma cobertura para ficarem isolados da luz branca.

Os 12 Erlenmeyers deste experimento foram divididos em conjuntos, dos quais nove Erlenmeyers foram colocados sob luz UV e três foram mantidos sob luz branca, a fim de se obter os ensaios controle. Estes foram analisados nos intervalos de 24, 48 e 66 horas, da mesma maneira que o ensaio anterior.

C) Experimento com extrato de levedura

Fez-se uma solução de extrato de levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, 10 mg/mL, e esta foi autoclavada. Em condições assépticas, uma alíquota de 100 µL da solução de levedura foi transferida para cada um dos 6 erlenmeyers, contendo 5,0 g de células/50 mL de meio BC-1, enquanto nos 3 erlenmeyers restantes, ensaios controle, foram adicionados 100 µL de água destilada autoclavada. Estes foram analisados nos mesmos intervalos de tempo dos ensaios anteriores, seguindo o mesmo procedimento.

3.9 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos e das substâncias isoladas dos diferentes tecidos de *Piper crassinervium*

Os ensaios para verificação da atividade antifúngica foram realizados no Instituto Botânico (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) com a colaboração da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

Para detecção de substâncias fungitóxicas presentes nos extratos dos diferentes tecidos de *P. crassinervium* foi utilizada a técnica da bioautografia (Homans & Fuchs, 1970). As substâncias ou extratos analisados são aplicados numa cromatoplaça e esta é desenvolvida com um sistema de solventes adequado. Após evaporação do solvente esta placa é aspergida com uma suspensão de esporos de fungos (solução de glicose e sais), e então incubada por um período de 2 a 3 dias, a 25°C, em atmosfera úmida. O aparecimento de zonas de inibição visíveis indica a presença de compostos fungitóxicos.

3.9.1 Bioautografia dos extratos e das substâncias isoladas de *P. crassinervium*

As substâncias isoladas neste trabalho, provenientes de folhas, suspensões celulares e folhas de plantas micropropagadas de *P. crassinervium*, foram aplicadas em uma cromatoplaça de sílica e esta foi eluída com o sistema de solventes S3. Para as substâncias puras foram aplicadas 100 µg, enquanto que para os extratos, 500 µg. Esta placa foi aspergida com uma suspensão de esporos de *Cladosporium sphaerospermum*, em meio de glicose e sais, e incubada durante 72 horas em uma câmara úmida e escura, a 25°C. O padrão utilizado como referência foi a nistatina (1 µg).

3.10 Dados espectroscópicos das substâncias isoladas de *Piper crassinervium*

Os espectros de RMN-¹H das substâncias isoladas foram obtidos utilizando-se espectrômetros Bruker DPX-300 e DRX- 500 (Instituto de Química-USP), operando a 300 e 500 MHz, respectivamente, enquanto que os espectros de RMN-¹³C foram registrados a 75 e 125 MHz, respectivamente. O deuteroclorofórmio foi utilizado como solvente, tendo o tetrametilsilano como padrão de referência interna.

Para as análises espectroscópicas foram utilizados espectrofotômetros na região do IV operando por FT (Nicolet e Perkin-Elmer) e espectrofotômetros de massas de baixa e alta resolução (Hewlett-Packard e Finnigan).

3.11 Substâncias isoladas de folhas e da cultura de células de *Piper crassinervium*

(1) 4'-metoxi-5,7-dihidroxi flavanona

RMN-¹H , Figura 20, página 54

RMN-¹³C, Figura 21, página 55

Espectro de massas, Figura 22, página 56

E.M. m/z (int. rel.) 286 [M]⁺ (57), 179 (13), 134(12), 121 69), 119 (24), 91 (13)

(2) 5, 4'-dihidroxi-7-metoxi flavanona

RMN-¹H , Figura 23, página 57

Espectro de massas, Figura 24, página 58

E.M. m/z (int. rel.) 286 [M]⁺ (73), 193 (29), 180 (39), 167 (100), 166 (28), 120 (44), 107 (12), 95 (22)

(3)

RMN- ^1H , Figura 25, página 59

RMN- ^{13}C , Figura 26, página 60

Espectro de massas, Figura 27, página 61

E.M. m/z (int. rel.) 260 $[\text{M}]^+$ (3), 178 (11), 177 (100), 137 (22), 109 (4), 69 (12)

(4)

RMN – ^1H , Figura 28, página 62

RMN – ^{13}C , Figura 29, página 63

Espectro de massas, Figura 30, página 64

E.M. m/z (int. rel.) 260 $[\text{M}]^+$ (3), 242 (10), 199 (13), 177 (100), 137 (44), 109 (11), 69 (27)

(5)

RMN – ^1H , Figura 31, página 65

RMN – ^{13}C , Figura 32, página 66

Espectro de massas, Figura 33, página 67

E.M. m/z (int. rel.) 292 $[\text{M}]^+$ (2), 177 (35), 137 (100), 109 (11), 81 (17), 55 (12)

(6) 10-amino-2,3,4 –trimetoxi fenantreno –1-ácido carboxílico lactama (piperolactama C)

RMN- ^1H : Figura 41, página 91

(7) 10- amino metil- 2,3,4- trimetoxi- fenantreno-1-ácido carboxílico lactama

RMN – ^1H , Figura 42, página 92

RMN – ^{13}C , Figura 43, página 93

Espectro de massas, Figura 44, página 94

E.M. m/z (int. rel.) 323 $[\text{M}]^+$ (100), 308 (47), 250 (33), 139 (12)

(8) 10- amino - 2,4- dimetoxi-3-hidroxi fenantreno –1-ácido carboxílico lactama

$C_{17}H_{13}NO_4$

RMN – 1H , Figura 45, página 95

Espectro de massas, Figura 46, página 96

E.M. m/z (int. rel.) 295 $[M]^+$ (79), 280 (45), 209 (15), 164 (12)

(9) 10- amino metil- 2- metoxi-3-hidroxi fenantreno –1-ácido carboxílico lactama

$C_{17}H_{13}NO_3$

RMN – 1H , Figura 47, página 97

Espectro de massas, Figura 48, página 98

E.M. m/z (int. rel.) 279 $[M]^+$ (100), 236 (16), 193 (21), 164 (24)

4. Resultados e Discussão

O estudo químico de *P. crassinervium* consistiu na análise dos metabólitos secundários de folhas e suspensões celulares desta espécie. A primeira parte do trabalho foi baseada no isolamento e determinação estrutural dos principais constituintes visando-se comparar as substâncias biossintetizadas neste tecido com aquelas acumuladas na cultura de células. A análise dos constituintes do óleo essencial de folhas foi realizado através de CG/EM, pois o procedimento para o isolamento a partir dos extratos obtidos por maceração normalmente não permite tal tarefa, em função da alta complexidade da mistura. Além disso, a técnica CG/EM é bastante eficiente e tem sido utilizada como instrumento preferido em função da maioria dos constituintes em óleos essenciais serem conhecidos e identificados pelo uso de padrões.

4.1 Substâncias isoladas do extrato de folhas de *Piper crassinervium*

O extrato obtido de folhas de *P. crassinervium* foi inicialmente caracterizado por CLAE (Figura 13, página 40) e por espectroscopia de RMN-¹H. Os dados no espectro de hidrogênio indicaram a presença de substâncias contendo anéis aromáticos e metoxilas aromáticas. Este extrato foi submetido a etapas de purificação por cromatografia em coluna, além de purificações por cromatografias planares com detecção no UV, resultando no isolamento das duas flavanonas, **1** e **2**, e de três hidroquinonas preniladas, **3**, **4** e **5**.

Figura 13 – Cromatograma obtido por CLAE (sistema S7) do extrato de folhas de *P. crassinervium*

4.2 Identificação das substâncias isoladas do extrato de folhas de *Piper crassinervium*

4.2.1 Flavanonas (1 e 2)

Os espectros de RMN-¹H das substâncias **1** e **2** (Figuras 20 e 23, páginas 54 e 57) apresentaram absorções características de hidrogênios que compõem os anéis aromáticos A e B além das absorções de hidrogênios metoxílicos aromáticos. Os sinais do anel aromático A estão claramente representados em δ 6,05, para os hidrogênios 6 e 8 (*d*, 2,4 Hz), indicando a presença de substituintes nas posições 5 e 7, enquanto *que* para o anel B os deslocamentos observados em δ 6,95 para os prótons 3', 5' (*dd*) e δ 7,37, para 2' e 6' (*dd*) indicaram a presença de um anel aromático dissustituído. Os espectros de RMN-¹H, para ambas substâncias, apresentaram um singlete em aproximadamente δ 3,8, referente ao hidrogênios metoxílicos. A definição da natureza das substâncias **1** e **2** como flavanonas (Figura 14) foi inferida através da presença de três *duplos dubletos* em δ 5,32-5,39 (H-2) e δ 2,73-3,15 (H-3), indicando, portanto, ausência da ligação dupla entre C2 e C3 nestas estruturas.

Figura 14 – Estrutura de uma flavanona

A única diferença entre estas duas flavanonas estaria associada à posição da metoxila, que em **1** pode ser localizada na posição C-4' enquanto que a mesma poderia ser posicionada em C-7 na flavanona **2**. De particular importância para a determinação das flavanonas foi a fragmentação clássica retro Diels-Alder indicada pelos íons em 152/134 e 166/120 para **1** e **2**, respectivamente, no espectro de massas (Esquemas 2 e 3, páginas 43 e 44). As fórmulas moleculares foram determinadas como sendo C₁₆H₁₄O₅, condizente com o pico relativo ao íon molecular em *m/z* 286 (Figuras 22 e 24, páginas 56 e 58).

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN- ^{13}C possibilitaram confirmar as estruturas destas flavanonas **1** e **2** (Tabelas 8 e 9) além da comparação com os dados da literatura (Bohlmann *et al.*, 1981; Mc Cormick *et al.*, 1986).

Tabela 8 – Dados de RMN- ^1H e ^{13}C para a substância **1**

Posição	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C
2	5,32-5,39 (dd, 13; 2,9)	79,9 /
3	2,73-2,81 (dd, 16,9; 2,9) 3,06-3,15 (dd, 16,9; 13)	43,1 /
4	-----	196,7 /
5	-----	
6	6,05 (d, 2,4)	96,7 /
7	-----	
8	6,05 (m)	95,5 /
2'/6'	7,37 (d, 8,8)	127,7 /
3'/5'	6,95 (d, 8,8)	114,2 /
OMe - 4'	3,87 (s)	55,4 /

Tabela 9 – Dados de RMN- ^1H e ^{13}C para a substância **2**

Posição	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C
2	5,34-5,38 (dd, 13; 3,0)	78,9
3	2,75-2,81 (dd, 17,1; 3,0) 3,06- 3,16 (dd, 17,1;13)	43,1
4	-----	196,7
5	-----	
6	5,98 (d, 2,4)	96,7
8	5,98 (d, 2,1)	95,4
2'/6'	7,38 (d, 8,7)	127,7
3'/5'	6,95 (d, 8,7)	114,2
OMe - 7'	3,84 (s)	55,4

Esquema 2 – Interpretação dos dados de EM da flavanona 1

Esquema 3 – Interpretação dos dados de EM da flavanona 2

4.2.2 Hidroquinonas preniladas (3 e 4)

Os espectros de RMN-¹H e de ¹³C (Figuras 25, 26, 28 e 29 páginas 59, 60, 62 e 63) das substâncias **3** e **4** apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos, de hidroxilas fenólicas quelatadas e de grupos prenilicos. A atribuição dos deslocamentos químicos das cadeias laterais das hidroquinonas preniladas foi baseada no uso do programa SISCONST (Fromanteau *et al.*, 1993), desenvolvido para auxiliar no processo de determinação estrutural de produtos naturais, a partir dos deslocamentos químicos e multiplicidades observadas no espectro de RMN-¹³C. O programa prevê o tipo de esqueleto mais provável para o composto sob análise e sugere várias subestruturas, de acordo com os sinais apresentados no espectro de RMN-¹³C. A partir dos diversos fragmentos sugeridos para a cadeia lateral das hidroquinonas, selecionou-se aquele que apresentava semelhança de deslocamentos no espectro de RMN-¹H. Desta maneira, os dados obtidos para as substâncias **3** e **4** indicaram tratar-se de isômeros (Figura 15), com a fórmula molecular C₁₆H₂₀O₃. Observou-se nos espectros de massas das substâncias **3** e **4** picos correspondentes aos íons moleculares em m/z 260, condizente com a fórmula sugerida.

Figura 15 – Estruturas das substâncias **3** e **4**

O espectro de RMN-¹H mostrou para estas substâncias absorções referentes ao hidrogênio hidroxílico (C-2) quelatado com a carbonila em δ 12 (s), confirmando a relação *orto* entre a carbonila e a hidroxila. Os sinais dos hidrogênios do anel aromático foram observados em δ 6,84 (*d*, 8,9 Hz) para o hidrogênio H-3, δ 6,98 (*dd*, 8,9 e 3,0) para o H-4 e em δ 7,21 (*d*, 3,0 Hz) referente ao hidrogênio H-6.

encontrou mais desprotegida do que a metila na hidroquinona **4** (*cis*), δ 2,2 e δ 2,0, respectivamente. Por outro lado, os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^{13}C foram compatíveis com essa atribuição, especialmente em função do pronunciado efeito de proteção γ sobre o carbono metílico C-16 na hidroquinona **3**, que apresentou sinal em δ 20,0. No caso da hidroquinona **4**, o carbono metílico C-16 apresentou sinal em δ 26,1. Coerentemente, nesse último caso, o efeito γ de proteção é observado para o carbono metilênico C-10 que absorve em δ 34,5.

Os sinais observados nos espectros de RMN- ^{13}C das hidroquinonas **3** e **4** (Tabela 10) confirmaram estas estruturas como as apresentadas .

Tabela 10- Dados de RMN- ^1H e ^{13}C para as hidroquinonas 3 e 4

	Hidroquinona 3		Hidroquinona 4	
Posição	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C	^1H (δ , J em Hz)	^{13}C
1	-----	120,6	-----	120,5
2	-----	157,4	-----	157,4
3	6,84 (<i>d</i> , 8,9)	119,2	6,87 (<i>d</i> , 9,0)	119,2
4	6,98 (<i>dd</i> , 8,9;3,0)	123,0	6,99 (<i>dd</i> , 9; 2,8)	123,5
5	-----	147,3	-----	147,2
6	7,21 (<i>d</i> , 3,0)	119,7	7,23 (<i>d</i> , 2,8)	120,3
7	-----	196,1	-----	195,6
8	6,66 (<i>s</i>)	115,0	6,66 (<i>s</i>)	115,0
9	-----	161,1	-----	161,5
10	2,20-2,30 (<i>m</i>)	41,6	2,58-2,64 (<i>m</i>)	34,5
11	2,20-2,30 (<i>m</i>)	26,2	2,17-2,25 (<i>m</i>)	26,8
12	5,12 (<i>t</i>)	124,2	5,13 (<i>t</i> , 7,2)	124,1
13	-----	132,8	-----	132,6
14	1,71 (<i>s</i>)	25,7	1,64 (<i>s</i>)	25,6
15	1,63 (<i>s</i>)	17,8	1,62 (<i>s</i>)	17,7
16	2,17 (<i>s</i>)	20,0	2,00(<i>s</i>)	26,1

3

4

Esquema 4 – Interpretação dos dados de EM das hidroquinonas 3 e 4

4.2.3 Hidroquinona prenilada (5)

O espectro de RMN-¹H da substância **5** (Figura 31, página 65) apresentou os sinais dos hidrogênios aromáticos e da hidroxila fenólica quelada, de forma semelhante aos observados para as hidroquinonas **3** e **4**. Diferentemente das hidroquinonas **3** e **4**, os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C apresentaram sinais correspondentes a duas metilas (δ 1,28 e 1,79; δ 24,7 e 19,6), três metilenos (δ 3,37-3,58; 1,74-1,91; δ 43,1, 33,2 e 24,8) e um carbono metínico (δ 4,48; δ 83,7). O espectro de RMN-¹³C apresentou ainda dois sinais relativos a carbonos carbinólicos em δ 83,7 e 79,9. Considerando que o espectro de massas (Figura 33, página 67) apresentou o íon molecular em m/z 292, compatível com a fórmula molecular C₁₆H₂₀O₅, foi proposta a estrutura contendo um endoperóxido entre os carbonos C-10 e C-13. Através do programa SISCONST citado anteriormente, foi possível a confirmação da cadeia lateral desta hidroquinona **5** (Figura 16).

Figura 16 – Estrutura da substância **5**

A ausência de sinais de uma ligação dupla sugeriu a presença do grupo CH₂ ligado ao H-9, que pôde ser comprovado pelo deslocamento do C-9 no espectro de RMN-¹³C, que variou de δ 161,0 para 142,0 em relação aos isômeros **3** e **4**, e através das constantes de acoplamento de 13,0 Hz para os hidrogênios do grupo metileno (H-16), que apresentou no espectro de RMN-¹H os deslocamentos em δ 4,98. No espectro de RMN-¹³C o deslocamento de δ 83,7 ppm para o C-10 sugeriu a presença do anel com um átomo de oxigênio ligado. Os deslocamentos observados no espectro de RMN-¹³C (Figura 32, página 66) confirmaram a estrutura da substância **5** (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados de RMN-¹H e ¹³C para a substância 5

Posição	¹ H (δ, J em Hz)	¹³ C
1	-----	119,9
2	-----	157,0
3	6,87 (<i>d</i> , 8,9)	119,3
4	7,04 (<i>dd</i> , 8,9; 3,0)	125,3
5	-----	147,6
6	7,35 (<i>d</i> , 3,0)	115,7
7	-----	204,7
8	3,37-3,58 (<i>2d</i> , 15,5Hz)	43,1
9	-----	142,4
10	4,48 (<i>d</i> , 9,6 Hz)	83,7
11	1,86 -1,91 (<i>m</i>)	33,2
12	1,74 -1,78 (<i>m</i>)	24,8
13	-----	79,9
14	1,28 (<i>s</i>)	24,7
15	1,79 (<i>s</i>)	19,6
16	4,98 (<i>d</i> , 13,0)	113,5

5

Hidroquinonas e benzoquinonas preniladas não substituídas são comuns em organismos marinhos. Triprenil- e tetraprenilhidroquinonas são os compostos mais abundantes desta classe de metabólitos, enquanto que diprenil- e triprenilhidroquinonas são os mais estudados, em virtude da variedade de suas atividades biológicas (De Rosa, 1994). Esta classe de metabólitos tem ocorrência restrita em plantas superiores (Williams *et al.*, 2001) sendo esta a primeira descrição do isolamento de hidroquinonas preniladas em espécies de *Piper*.

As hidroquinonas isoladas de *P. crassinervium* foram avaliadas quanto à sua atividade antifúngica através da técnica da bioautografia (página 35). Entre as hidroquinonas 3 e 4, somente o isômero *E* (3) mostrou-se ativo frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, além da hidroquinona 5, cuja inibição foi menor em

relação à substância 3. Como referência utilizou-se o antibiótico poliênico nistatina, que não exerce ação contra bactérias, mas contra fungos, aparentemente por apresentar afinidade com as substâncias presentes na membrana do fungo (Korolkovas, 1976).

Geranilhidroquinonas e geranilquinonas estão presentes em várias espécies de *Phacelia* (Hydrophyllaceae), e são responsáveis pela alergia de contato em humanos. Verificou-se que o principal constituinte tanto de *Phacelia minor* como de *Phacelia parryi* é a geranil-geranil hidroquinona e um constituinte minoritário, também alergênico, a 1-oxofarnesil hidroquinona. Ambos compostos são novos em plantas superiores sendo que a geranil-geranil-hidroquinona havia sido previamente isolada de esponjas marinhas (Reynolds & Rodriguez, 1981) (Figura 17).

geranil-geranilhidroquinona

1- oxofarnesilhidroquinona

Figura 17- Exemplos de hidroquinonas alergênicas de espécies de *Phacelia*

Derivados simples de hidroquinonas preniladas (Figura 18) têm sido isolados de *Aplidium californicum*, um tunicado marinho. Entre elas, algumas mostraram propriedades antioxidantes e foram sugeridas como agentes de proteção contra o câncer, devido à semelhança estrutural das substâncias formadas, após ciclização das hidroquinonas, com o α -tocoferol (Cotelle *et al.*, 1991).

Figura 18 – Alguns exemplos de hidroquinonas isoladas de *Aplidium californicum*

A partir de estudos de hidroquinonas isoladas de esponjas de *Ircinia spinosula* (Dictyoceratida) ou sintetizadas, verificou-se que as substâncias contendo cadeias laterais com 5-15 átomos de carbonos, apresentaram maior potencial frente aos ensaios antimicrobianos e de toxicidade, mostrando que o comprimento desta cadeia influenciou na atividade. Para cadeias hidrogenadas com mais de 20 átomos de carbono observou-se uma diminuição de atividade. Os derivados da quinona mostraram maior toxicidade do que as hidroquinonas (De Rosa, 1994).

De esponjas de *Ircinia spinosula* foram isoladas duas hidroquinonas (1 e 2), sendo que somente a substância 2 mostrou uma atividade citotóxica moderada e uma atividade específica contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a bactéria gram-negativa *Enterobacter cloacae* (Figura 19) (Mihopoulos, 1999).

(1) $R_1 = H$, $R_2 = Me$ (2-octaprenil-1,4-hidroquinona)

(2) $R_1 = H$, $R_2 = CH_2OH$ (2-[24-hidroxi]-octaprenil-1,4-hidroquinona)

Figura 19 – Estruturas das hidroquinonas isoladas de *I. spinosula*

Com base nos ensaios de citotoxicidade dos derivados sintéticos destas hidroquinonas, verificou-se a necessidade de grupos hidroxílicos livres, tanto no anel aromático como na cadeia lateral dos compostos. A oxidação das hidroquinonas a quinonas também aumentou a atividade contra *E. coli*. As quinonas podem ser consideradas tóxicas aos organismos aeróbios devido ao seu poder de reação com a glutatona reduzida e com grupos $-SH$ de proteínas, bem como pelo potencial redox que as reduzem a semi-quinonas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Estes resultados confirmam os efeitos antimicrobianos de moderados a fortes, e mostram que tanto a oxidação das hidroquinonas como a hidrogenação das ligações duplas da cadeia lateral aumenta o efeito farmacológico das moléculas (Mihopoulos, 1999).

De acordo com os relatos sobre hidroquinonas, verificou-se que as substâncias isoladas 3 e 4 enquadraram-se no perfil descrito quanto ao número de carbonos na cadeia lateral, o que pode justificar a atividade antifúngica apresentada por estas substâncias.

Figura 20 – Espectro de RMN-¹H de **1** (300 MHz, CDCl₃)

Figura 21 – Espectro de RMN- ^{13}C de 1 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 22 – Espectro de massas de 1

Figura 23 – Espectro de RMN-¹H de **2** (300 MHz, CDCl₃)

Figura 24 – Espectro de massas de 2

Figura 25 – Espectro de RMN-¹H de 3 (500 MHz, CDCl₃)

Figura 26 – Espectro de RMN- ^{13}C de **3** (125MHz, CDCl_3)

Figura 27 -- Espectro de massas de 3

Figura 28 – Espectro de RMN-¹H de 4 (500 MHz, CDCl₃)

Figura 29 – Espectro de RMN-¹³C de 4 (125 MHz, CDCl₃)

Figura 30 – Espectro de massas de 4

Figura 31 – Espectro de RMN-¹H de 5 (500 MHz, CDCl₃)

Figura 32 – Espectro de RMN-¹³C de **5** (125 MHz, CDCl₃)

Figura 33 – Espectro de massas de 5

4.3 Substâncias identificadas no óleo volátil de *Piper crassinervium*

4.3.1 Análise qualitativa e quantitativa

A família Piperaceae tem sido fonte de vários estudos sobre óleos essenciais. Espécies de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. auritum*, *P. peltatum*, *P. lolot*, *P. pierrei*, *P. acutifolium*, *P. aduncum* e *P. cernuum* foram previamente estudadas quanto à composição de seus componentes químicos presentes (Andrade *et al.*, 1998; Dung *et al.*, 1996; Leclercq *et al.*, 1997; Lognay *et al.*, 1996; Maia *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998; Pino *et al.*, 1998). Para *P. crassinervium* esta é a primeira vez que a composição química de seu óleo essencial foi determinada. Os resultados obtidos da análise qualitativa e quantitativa do óleo volátil de *P. crassinervium* são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição relativa dos constituintes do óleo volátil de *P. crassinervium*

Compostos	%	IK	Compostos	%	IK
Monoterpenos hidrocarbonados			Sesquiterpenos oxigenados		
limoneno	0,5	1017	bulnesol	2,4	1653
mirceno	0,2	978	α -cadinol	6,6	1640
α -pineno	3,0	923	τ -cadinol	1,5	1619
β -pineno	4,2	965	1-epi-cubenol	1,5	1610
			1-10-epi-cubenol	1,0	1607
Monoterpenos oxigenados			espatulenol	1,2	1561
linalol	1,6	1087	β -eudesmol	2,3	1635
			γ -eudesmol	1,9	1614
Sesquiterpenos hidrocarbonados			guaiol	7,1	1581
aromadendreno	1,4	1421	globulol	2,3	1568
δ -cadineno	3,8	1509	epi-globulol	0,7	1575
γ -cadineno	1,2	1500	α -muurolol	1,5	1630
β -cariofileno	9,9	1401	τ -muurolol+cubenol	3,6	1626
α -copaeno	0,9	1357	<i>E</i> -nerolidol	6,4	1548
β -elemeno	0,6	1373	óxido de cariofileno	2,3	1566
α -humuleno	0,9	1436	óxido de humuleno I	0,9	1599
germacreno D	10,1	1467	valerianol	0,8	1643
α -muuroleno	0,8	1485			
γ -muuroleno	3,9	1461	Outros		
viridifloreno+biciclogermacreno	4,4	1482	6-metil-5-hepten-2-ona	7,5	973
			TOTAL (%)	98,7	

O óleo de *P. crassinervium* apresentou 14,3% de monoterpenos e 85,7% de sesquiterpenos em sua composição. O principal monoterpeneo identificado foi β -pineno (4,2%). Como principais sesquiterpenos hidrocarbonados foram identificados o β -cariofileno (9,9%) e germacreno D (10,1%), sendo estes os constituintes principais do óleo. α -cadinol (6,6%) e guaicol (7,1%) foram observados como os principais sesquiterpenos oxigenados. No total foram identificados 36 compostos, que corresponderam a 98,7% da composição do óleo.

Enquanto que para *P. crassinervium* os sesquiterpenos são os principais constituintes do óleo volátil de suas folhas (85,7% de sua composição), para *Piper capense*, *Piper nigrum* e *Piper umbellatum* verificou-se a predominância de monoterpenos, 51,7%, 62,2% e 59,6%, respectivamente, nos óleos obtidos de suas partes aéreas. Apesar de estas três espécies apresentarem em comum uma alta percentagem de

monoterpenos na composição de seus óleos, observou-se variação dos constituintes principais. β -pineno (32,5%) e β -cariofileno (12,6%) foram os principais compostos do óleo volátil de *P. capense*. Os constituintes mais importantes no óleo de *P. nigrum* foram limoneno (18,8%), β -cariofileno (15,4%), sabineno (16,5%) e β -pineno (10,7%). O óleo de *P. umbellatum* foi caracterizado pela sua alta concentração de β -pineno (26,8%), α -pineno (17,6%) e *E*-nerolidol (12,4%) em sua composição (Martins *et al.*, 1998).

Os óleos voláteis obtidos das folhas e galhos de *Pothomorphe umbellata* e *Pothomorphe peltata*, outro gênero da família Piperaceae, também foram investigados quanto à composição de seus constituintes. Enquanto germacreno D foi identificado como o constituinte majoritário de *P. umbellata* (27,4% da composição do óleo), para *P. peltata* β -cariofileno, 39,0%, foi classificado como composto principal (Luz *et al.*, 1999).

Desta maneira verificou-se que a composição das substâncias presentes nos óleos voláteis varia de acordo com as espécies estudadas. A diversidade estrutural dos compostos acumulados pode estar relacionada com a facilidade de condensação das unidades isoprênicas e subsequentes dimerizações, ciclizações, rearranjos e oxidações (Limberger, 1998).

A utilização dos óleos voláteis das plantas aromáticas provém de longo tempo. Há mais de 2000 anos, na medicina chinesa, o uso destes óleos já esteve relacionado à suas propriedades bactericidas, sendo que atualmente são usados como aromatizantes, edulcorantes e odoríferos na indústria alimentícia e farmacêutica. As substâncias voláteis que compõem os óleos de plantas aromáticas também apresentam funções ecológicas como atrativos de insetos e animais polinizadores, além de atuarem como sistema de defesa frente a predadores (Limberger, 1998).

4.3.2 Estrutura química dos constituintes identificados no óleo volátil de *P. crassinervium*

aromadendreno

bulnesol

δ -cadineno γ -cadineno α -cadinol τ -cadinol β -cariofileno

1-epi-cubenol

1,10-epi-cubenol

β -elemeno

espatulenol

β -eudesmol

γ-eudesmol

germacrene D

guaiol

globulol

epi-globulol

α-humulene

limonene

linalol

6-metil-5-hepten-2-ona

mirceno

α-muuroleno

γ-muuroleno

α-murolol

β-murolol

cubenol

E-nerolidol

óxido de cariofileno

óxido de humuleno

α -pineno β -pineno

valerianol

viridifloreno

biciclogermacreno

4.4 Estudo de etapas biossintéticas

4.4.1 Doseamento da PAL em folhas intactas e plantas propagadas de *P. crassinervium*

A fenilalanina amônia-liase é uma das enzimas mais estudadas em relação ao metabolismo secundário em plantas, devido a sua rápida resposta a uma grande variedade de estímulos, em pequenos intervalos de tempo, além de ser relativamente estável, permitindo sua análise.

A PAL catalisa a eliminação da amônia, a partir da fenilalanina, para produzir o ácido trans-cinâmico (Figura 34) (Jones, 1984). A atividade desta enzima pode ser detectada medindo-se a formação do ácido cinâmico, seja por técnicas espectrofotométricas ou por cromatografia líquida de alta eficiência (Camm & Towers, 1977).

Figura 34 – Reação de desaminação da fenilalanina catalisada pela enzima PAL

O ácido cinâmico produzido é intermediário de uma grande variedade de produtos como alcalóides, flavonóides, lignanas e ligninas.

A determinação da atividade específica da enzima PAL para folhas intactas e os diversos tecidos (folhas, caules e raízes) de plântulas micropropagadas de *P. crassinervium* foi realizada segundo protocolo apresentado na página 26. A partir da curva padrão da albumina sérica bovina determinou-se a quantidade de proteínas totais para os tecidos analisados de *P. crassinervium* (Tabela 13).

Tabela 13 – Teores de proteínas solúveis obtidos dos tecidos analisados de *P. crassinervium*

Tecidos analisados	Concentração de proteínas (µg/mL)	Atividade da PAL (pKat/mL)	Atividade específica da PAL (nKat/mg de proteína)
Folhas adultas	15,93	5,03	0,32
Folhas de plantas propagadas	2,46	0,68	0,28
Caules de plantas propagadas	1,10	1,15	1,05
Raízes de plantas propagadas	0,43	0,69	1,60

De acordo com os dados obtidos verificou-se que a atividade específica da enzima PAL variou de 0,28 a 1,60 nKat/mg de proteína para os diferentes tecidos de *P. crassinervium*. Para folhas intactas e propagadas a atividade mostrou-se bem próxima, embora as análises por CLAE (sistema S7) tenham revelado um maior acúmulo de metabólitos no tecido intacto. Comparando-se os dados obtidos dos extratos de folhas e caules propagados de *P. crassinervium* observou-se uma concentração elevada de substâncias nos caules, podendo indicar uma maior atividade da PAL nestes tecidos, embora um aumento na atividade desta enzima não esteja correlacionado diretamente com a produção de compostos fenilpropanoídicos específicos (Jones, 1984).

Folhas de *Piper regnellii*, uma outra espécie da família Piperaceae, avaliadas quanto à atividade da enzima PAL, apresentaram aproximadamente metade do valor encontrado para *P. crassinervium*, 0,18 nKat/mg de proteína (Sartorelli, 2000), enquanto que para culturas de células de *Picea abies* a atividade da enzima variou de 0,01 a 0,05 nKat/mg (Messner *et al.*, 1991) indicando que a variação da atividade enzimática depende do tecido e da espécie analisada.

4.4.2 Doseamento da chalcona sintase em folhas de *Piper crassinervium*

A estrutura básica dos flavonóides C6-C3-C6 é proveniente de uma biossíntese mista, que tem como precursores malonil-CoA e 4-cumaroil-CoA, ambos derivados de carboidratos (Mann, 1994). O malonil-CoA é sintetizado a partir da reação do acetil-CoA com dióxido de carbono, enquanto que a formação do 4-cumaroil-CoA envolve a via do chiquimato/arogenato, rota esta que origina os aminoácidos aromáticos tais como fenilalanina e tirosina em plantas superiores. A desaminação da fenilalanina, catalisada pela fenilalanina amônia-liase, fornece o ácido cinâmico, que é hidroxilado pela cinamato 4-hidroxilase para formação do ácido 4-cumárico, que pela ação da 4-cumarato:CoA ligase origina o 4-cumaroil-CoA (Hahlbrock & Grisebach, 1979; Heller, 1988).

O primeiro intermediário no caminho dos flavonóides, a 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (naringenina chalcona), é formado pela condensação de Claisen de *p*-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, através da ação da chalcona sintase. A transformação da chalcona pela ação da enzima chalcona isomerase fornece o primeiro flavonóide, a naringenina, classificada como flavanona (Figura 35) (Grisebach, 1985; Heller, 1988).

- a: Acetil-CoA carboxilase
b: PAL
c: cinamato 4-hidroxilase
d: 4-cumarato:CoA ligase
e: chalcona sintase
f: chalcona isomerase

Figura 35 – Biossíntese do flavonóide naringenina, segundo Heller (1988)

O estudo fitoquímico realizado com plantas intactas de *P. crassinervium* levou ao isolamento de duas flavanonas, que pertencem à classe dos flavonóides. Com o objetivo de correlacionar a presença dessas flavanonas com a atividade enzimática da chalcona sintase foi necessário a realização do doseamento desta enzima nas folhas de *P. crassinervium*.

A partir da análise prévia da naringenina para verificação do tempo de retenção (aproximadamente 5,2 min) por CLAE, confirmou-se pela injeção do extrato da incubação, a presença da chalcona sintase em folhas de *P. crassinervium*. Desta maneira concluiu-se que as flavanonas produzidas por folhas de *Piper* foram originadas pela ação desta enzima, presente nestes tecidos. Com base na curva padrão da naringenina e com os dados obtidos nos ensaios realizados com folhas, verificou-se a atividade específica da enzima CHS como sendo $1,25 \times 10^{-6}$ nkat/mg.

Na espécie *Daucus carota*, pétalas brancas e coloridas foram estudadas quanto à atividade da CHS, visto que esta espécie acumulava substâncias com o esqueleto básico do flavonóide. Enquanto que pétalas brancas não mostraram atividade frente a esta enzima, em flores coloridas a atividade enzimática da chalcona sintase variou entre 2×10^{-4} a 1×10^{-3} nKat/mg (Hinderer *et al.*, 1983).

4.5 Caracterização da curva de crescimento para culturas de células de *Piper crassinervium*

4.5.1 Densidade do inóculo

O crescimento da cultura de células está associado, entre outros fatores, com a concentração inicial de inóculo, que depende da espécie vegetal estudada. Para que ocorra a divisão celular, um número mínimo de células deve estar presente no meio. Para células de *P. crassinervium* foram selecionados 5 g de inóculo para 50 mL de meio, visto que com quantidades menores ou maiores que esta massa, não houve duplicação da densidade celular no intervalo de tempo selecionado. Em culturas de *Psychotria carthagenensis*, por exemplo, a quantidade de inóculo ideal variou de 0,7 a 1,5 g, em 25 mL de meio (Lopes *et al.*, 2000), enquanto que para células de *Piper cernuum*, 5 g de células frescas foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura (Costantin, 2001).

4.5.2 Determinação do peso fresco e seco em suspensões celulares de *P. crassinervium*

O aumento do número de células, volume ou massa celular em uma cultura caracteriza o seu crescimento, em um intervalo de tempo selecionado denominado ciclo de crescimento celular, que compreende algumas fases (Dodds & Roberts, 1995). Neste trabalho, a medida do crescimento celular foi realizada com base na obtenção da matéria fresca e seca, através da separação das células, do meio celular, por filtração à vácuo.

O crescimento das culturas de células de *P. crassinervium* em suspensão, determinado de acordo com as variações do peso fresco e seco (Figura 36), revelou uma curva com um ciclo de 26 dias. A fase *lag*, período anterior à divisão celular, foi observado durante os oito primeiros dias da curva, seguido de um aumento exponencial da massa celular por 18 dias. A fase estacionária, período em que as células não se dividem, constituiu-se de 8 dias e a decrescente, onde existe um esgotamento de nutrientes do meio e consequentemente a morte celular, perdurou por 22 dias.

Comparando-se as curvas de peso fresco e seco das suspensões celulares de *P. crassinervium*, verificou-se que o crescimento máximo da matéria fresca foi obtido 8 dias após a matéria seca atingir seu maior valor, de modo que esta diferença pode ser atribuída ao alongamento e aumento do volume celular, segundo Figueiredo (1992).

Com base nos dados obtidos da curva de crescimento para esta espécie de *Piper*, fez-se as subculturas das suspensões celulares em intervalos regulares de 22 a 25 dias, no período coincidente ao final da fase exponencial, com a finalidade de se manter o metabolismo celular constante. A subcultura tem por objetivo a manutenção da cultura de células, de modo que possam ser minimizadas as possíveis variações do metabolismo celular (Dodds & Roberts, 1995).

Considerando-se a matéria fresca na curva de crescimento, a fase *lag* para culturas de células de *Psychotria carthagenensis* durou por 5 dias, sendo que a quantidade de células aumentou 4 vezes em torno de 12 dias. Células de *Piper cernuum* tiveram a mesma duração da fase *lag*, com um aumento triplicado da densidade celular em torno de 21 dias (Costantin, 2001). Com base nos dados apresentados verificou-se que células de *P. crassinervium* apresentaram um maior período para atingir o valor máximo de células, que correspondeu a 34 dias .

Figura 36 - Curva de crescimento de suspensões celulares de *P. crassinervium*

4.5.3 Determinação dos valores de pH do meio de cultura

A obtenção do perfil de variação do pH durante a curva de crescimento de uma suspensão celular é bastante importante para auxiliar na justificativa dos eventos metabólicos, especialmente no que tange à questão da compartimentalização de metabólitos secundários.

Em geral, o emprego da cultura de células torna-se possível entre os valores de pH 4 a 7,5. As atividades metabólicas das culturas de células determinam o valor do pH, além da quantidade de citólise causada pela ação mecânica. Certos componentes presentes no meio de cultura (amônia, nitrato, fosfato) apresentam tanto a função de nutrientes como de tamponante destes sistemas celulares (Endress, 1994).

Embora o pH afete o crescimento celular, bem como a quantidade de substâncias produzidas, poucos estudos têm sido realizados sobre sua função na cultura de células (Stafford *et al.*, 1991).

As suspensões celulares de *P. crassinervium* tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da inoculação. Durante a fase *lag* este valor variou entre 6,2 e 6,5. Com o crescimento celular, entre os dias 9 e 26, observou-se que o pH oscilou entre 6,2 e 6,6, aumentando linearmente até 7,7 no final da fase decrescente (Figura 37). O aumento do pH nesta última fase da cultura de células de *P. crassinervium* pode estar associado ao acúmulo dos alcalóides sintetizados nesta fase do ciclo, que acabam por aumentar este valor.

Culturas de células de *Tabernaemontana elegans* (Apocynaceae) mostraram um decréscimo no valor do pH de 5,0 para 4,6 na fase *lag*, aumentando gradualmente até atingir o valor de 6,3 no decorrer da curva de crescimento (van der Heidjen, 1989). Para culturas de *Psychotria carthagenensis* o pH do meio aumentou de 6,3 para 7,0 em dez dias de cultura, após um decréscimo inicial ao pH 4,3 (Lopes *et al.*, 2000). Cultura de células de *Piper cernuum* também apresentou um decréscimo do pH na fase *lag*, de 5,3 para 4,9, permanecendo em 5,0 durante 13 dias. Nas fases finais da curva houve um aumento de 1,8 unidades de pH, sugerindo a excreção de aminas aromáticas sintetizadas por estas células neste período (Costantin, 2001).

Desta maneira pode-se concluir que a variação do pH em culturas de células de diversas espécies mostrou-se diferente, sugerindo que este parâmetro depende do meio de cultura assim como das espécies envolvidas.

Figura 37 – Variação do pH em função do crescimento celular

4.5.4 Determinação da atividade específica da PAL em células de *P. crassinerivum*

A determinação da atividade da PAL, para as células provenientes da curva de crescimento, foi realizada através do cálculo das razões da área do ácido cinâmico pelo padrão interno metilumbeliferona, a partir dos cromatogramas obtidos por CLAE (sistema S7).

A atividade específica da PAL foi calculada segundo a equação mostrada na página 27. O fator de conversão R para este ensaio com células foi de 0,009, obtido através da curva padrão do ácido cinâmico.

A partir da quantidade total de proteínas solúveis (Bradford, 1976) obtida para as células durante a curva de crescimento determinou-se a atividade específica da PAL (Figura 38), tendo como referência a curva padrão da albumina sérica bovina.

Figura 38 - Atividade específica da PAL e quantidade de proteínas totais em função do crescimento celular

A partir dos dados obtidos verificou-se que o perfil da curva da atividade enzimática foi semelhante ao da curva de crescimento de células de *P. crassinervium* (Figura 36), mostrando que o aumento linear da atividade específica da PAL esteve relacionado com a divisão celular que ocorreu na fase exponencial (entre os dias 16 e 34). O máximo valor alcançado foi observado no final da fase linear (27,86 nKat/mg proteína), que coincidiu com a concentração máxima de proteínas para estas células (0,92 mg/mL). Em aproximadamente 41 dias, início da fase decrescente, houve uma diminuição da atividade enzimática da PAL, atingindo seu menor valor, 9,09 nKat/mg proteína, no final da curva de crescimento.

Para células de *Piper cernuum* o máximo valor obtido para a atividade enzimática foi 1,60 nKat/mg de proteína, nos primeiros dias da fase exponencial, coincidindo com o início da divisão celular (Costantin, 2001).

4.6 Cultura de células de *Piper crassinervium*

4.6.1 Substâncias isoladas do extrato de células

O extrato obtido das células, provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*, foi caracterizado por CLAE (Figura 39) e por RMN de ^1H . Os sinais obtidos no espectro de hidrogênio, indicaram a presença de substâncias aromáticas. O extrato foi submetido à purificação, por CPP e CLAE, resultando no isolamento de quatro substâncias que foram determinadas como sendo alcalóides do tipo aristolactamas (6, 7, 8 e 9).

6

7

8

9

Figura 39 - Cromatograma obtido por CLAE do extrato de células provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*

4.6.2 Identificação das substâncias isoladas do extrato de células provenientes das suspensões celulares de *P. crassinervium*

As aristolactamas isoladas de células provenientes de suspensões celulares de *P. crassinervium* possuem o esqueleto básico mostrado abaixo (Figura 40), diferindo entre si nos grupos substituintes ligados.

Figura 40 - Esqueleto das aristolactamas isoladas

No espectro de RMN- ^1H da substância **6** (Figura 41, página 91) observou-se a presença de três grupos metoxílicos, singletos, em δ 4,0, 4,2 e 4,5 ppm, além dos sinais em δ 7,18 (s, H-9), δ 7,5 (H-6 e H-7, *m*), δ 7,8 (H-8, *m*) e δ 9,2 (H-5, *m*). Os sinais dos hidrogênios metoxílicos absorvendo em campo mais baixo indicaram que os mesmos estavam desprotegidos por uma carbonila ou que se encontraram fora do plano de conjugação do anel aromático. Este conjunto de dados possibilitou identificá-la como sendo a piperolactama C, uma aristolactama previamente isolada de *Piper acutisleginum* (Olsen *et al.*, 1993).

Os dados obtidos no espectro de RMN- ^{13}C confirmaram a estrutura de **6** (Tabela 14). O espectro de massas apresentou o pico correspondente ao íon molecular em m/z 309, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$.

Tabela 14 – Dados de RMN- ^1H e de ^{13}C observados para a substância **6**

Posição	^1H , δ	^{13}C , δ
1	-----	167,2
2	-----	157,3
3	-----	154,3
4	-----	146,4
4a	-----	116,5
4b	-----	126,6
5	9,19 (<i>m</i>)	126,6
6	7,52-7,58 (<i>m</i>)	125,9
7	7,52-7,58 (<i>m</i>)	126,8
8	7,82 (<i>m</i>)	128,7
8a	-----	133,3
9	7,18 (<i>s</i>)	106,1
10	-----	135,5
MeO-2	4,52 (<i>s</i>)	63,0
MeO-3	4,20(<i>s</i>)	61,6
MeO-4	4,00 (<i>s</i>)	60,9

O alcalóide **7** possui o mesmo esqueleto de **6**, além de apresentar os três grupos metoxilas nas mesmas posições. O que diferiu estas duas substâncias foi a presença de um grupo metila ligado ao nitrogênio, na estrutura de **7**, que pôde ser observado no espectro de RMN-¹H (Figura 42, página 92), através do sinal em δ 3,48, e δ 26,4 no espectro de RMN-¹³C (Figura 43, página 93, Tabela 16). O íon molecular em m/z 323 mostrou-se condizente com a fórmula molecular C₁₉H₁₇NO₄.

Estruturas que apresentam este tipo de esqueleto têm sido descritas na literatura como aristolactamas. O primeiro alcalóide natural substituído com o grupo metila no nitrogênio, 4-hidroxi-3-metoxi-*N*-metilaristolactama, foi isolado em 1992, de partes aéreas de *Piper ribesioides* (Ruangrunsi *et al.*, 1992).

Até o momento não se tem descrita a ocorrência da substância 2,3,4-trimetoxi-*N*-metil-aristolactama (**7**) como produto natural ou sintético, tratando-se portanto de uma substância inédita.

Tabela 15 - Dados de RMN-¹H e de ¹³C para a substância 7

Posição	¹ H, δ	¹³ C, δ
1	-----	165,7
2	-----	156,8
3	-----	154,0
4	-----	146,4
4a	-----	116,1
4b	-----	126,6
5	9,18 (<i>m</i>)	126,5
6	7,54 (<i>m</i>)	125,7
7	7,54 (<i>m</i>)	127,0
8	7,85 (<i>m</i>)	128,7
8a	-----	133,4
9	7,00(<i>s</i>)	104,5
10	-----	136,6
MeO-2	4,54 (<i>s</i>)	63,0
MeO-3	4,18 (<i>s</i>)	61,6
MeO-4	3,99 (<i>s</i>)	60,8
Me-N	3,49 (<i>s</i>)	26,4

7

Através dos sinais observados no espectro de RMN-¹H para os alcalóides 8 e 9 (impuros), verificou-se que se tratavam de aristolactamas, por apresentarem os deslocamentos químicos parecidos com as substâncias 6 e 7. As substâncias 8 e 9 tiveram suas fórmulas moleculares determinadas como sendo C₁₇H₁₃NO₄ e C₁₆H₁₃NO₄, respectivamente, de acordo com os picos relativos aos íons moleculares em *m/z* 295 e 279 (Figuras 46 e 48, páginas 96 e 98).

No espectro de RMN-¹H da substância 8 (Figura 45, página 95) observou-se os deslocamentos de δ 4,5 e 4,1 para as metoxilas nas posições 2 e 4 respectivamente, enquanto para a aristolactama 9 (Figura 47, página 97), observou-se apenas uma metoxila em δ 4,1, posição 2, vizinha a um grupo hidroxila, na posição 3, o que explica este valor

menor de deslocamento. Este alcalóide 9 também apresenta um grupo metila ligado ao nitrogênio, observado pelo deslocamento em δ 3,5 aproximadamente (Tabela 16).

Tabela 16 - Dados de RMN- ^1H para as substância 8 e 9

Posição	^1H , δ (8)	^1H , δ (9)
1	-----	-----
2	-----	-----
3	-----	-----
4	-----	7,82 (s)
4a	-----	-----
4b	-----	-----
5	9,19 (m)	9,24 (m)
6 / 7	7,55 (m)	7,56 (m)
8	7,84 (m)	7,81 (m)
8a	-----	-----
9	7,19 (s)	7,07 (s)
10	-----	-----
MeO-2	4,54 (s)	4,13 (s)
MeO-3	-----	-----
MeO-4	4,07 (s)	-----
Me-N	-----	3,49 (s)

8

9

Espécies de *Piper* produzem uma grande variedade de produtos naturais, sendo que muitos destes apresentam propriedades medicinais. Os alcalóides são raros, mas foram descritos entre as substâncias isoladas neste gênero (Olsen *et al.*, 1993). As aristolactamas pertencem a um pequeno grupo de alcalóides, encontrados principalmente na família Aristolochiaceae, sendo responsáveis pela origem do nome desta classe de compostos, mas também têm sido relatadas a partir de espécies pertencentes às famílias Annonaceae, Menispermaceae e Monimiaceae (Desai *et al.*, 1990).

O interesse por esta sub-classe de alcalóides é devido à diversidade de atividades biológicas, mas cabe ressaltar a potente atividade inseticida apresentada pelas aristolactamas. A relação estrutural entre o ácido aristolóquico (Figura 49), um nitrocomposto bastante tóxico (Chen & Zhu, 1987), as aristolactamas e os alcalóides dioxoaporfínicos e isoquinolínicos têm motivado diversos estudos biossintéticos.

Figura 49 - Estrutura do ácido aristolóquico

O isolamento de alcalóides dioxoaporfínicos de diferentes espécies vegetais sugeriu que estes podem ser originados pela oxidação de alcalóides aporfínicos e funcionam como intermediários na biossíntese de aristolactamas. A conversão da pontevidrina nas aristolactamas ocorre *in vitro* e pode estar relacionada com o rearranjo do ácido benzílico seguido da perda do carbono (Figura 50) (Chen & Zhu, 1987).

Figura 50 - Formação de aristolactamas a partir de alcalóides dioxoaporfínicos *in vitro* (Chen & Zhu, 1987)

Plantas intactas e culturas de células de *P. crassinervium* mostraram um acúmulo diferente de metabólitos em seus tecidos. Enquanto folhas de plantas acumularam flavanonas e hidroquinonas preniladas, nas suspensões celulares desta espécie foram observadas somente aristolactamas. O estudo de tecidos diferenciados e não-diferenciados de *Piper cernuum*, indicou também diferentes composições. De folhas de plantas foram isolados fenilpropanóides, ácido 3,4-dimetoxi-di-hidrocinâmico e cubebina, sendo que as suspensões celulares acumularam tiramina e dopamina. Do ponto de vista biossintético as substâncias acumuladas seguiram diferentes rotas metabólicas. Os fenilpropanóides foram formados através da conversão da fenilalanina a ácido cinâmico pela PAL, e as substâncias acumuladas nas células foram originadas pela descarboxilação da tirosina, catalisada pela tirosina descarboxilase (Costantin, 2001).

A comparação destas duas espécies de *Piper* sugeriu que as aristolactamas poderiam ser formadas a partir de rotas metabólicas mais avançadas, a partir da dopamina, e que em *P. crassinervium* estariam presentes as enzimas responsáveis por essa formação. Observa-se na Figura 51 uma proposição de biossíntese para as aristolactamas isoladas.

Figura 51 - Proposta de biossíntese para as aristolactamas isoladas de suspensões celulares de *P. crassinervium*

Figura 41 – Espectro de RMN ^1H de **6** (500 MHz, CDCl_3)

Current Data Parameters
NAME Protons
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 11.18
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 13C
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 0
SWH 6218.905 Hz
FIDRES 0.094893 Hz
AQ 5.2691445 sec
RG 322.5
DN 80.400 usec
DE 4.75 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
P1 9.40 usec
DE 4.75 usec
SF01 500.1326407 MHz
NUC1 1H
PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300138 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

10 NMR plot parameters
CX 22.00 cm
F1P 11.000 ppm
F1 5501.43 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -250.07 Hz
PPMCM 0.52273 ppm/cm
HZCM 261.43158 Hz/cm

Figura 42 – Espectro de RMN ^1H de 7 (500 MHz, CDCl_3)

Figura 43 – Espectro de RMN – ¹³C de 7 (125 MHz, CDCl₃)

Figura 44 – Espectro de massas de 7

Figura 45 – Espectro de RMN ^1H de 8 (500 MHz, CDCl_3)

Figura 46 - Espectro de massas de 8

Figura 47— Espectro de RMN ^1H de **9** (500 MHz, CDCl_3)

Figura 48 – Espectro de massas de 9

4.7 Quantificação das substâncias isoladas do extrato de células

A partir do estabelecimento de uma nova curva celular, nos mesmos parâmetros da descrita anteriormente, foram quantificados os dois alcalóides, **6** e **7**, presentes tanto no meio como nas células das suspensões celulares.

Após determinação da matéria fresca e seca, as células e os meios celulares correspondentes aos intervalos da curva foram analisados por CLAE (sistema S7), com o objetivo de se obter as áreas relativas de cada alcalóide em relação ao padrão interno, para posterior quantificação. Como referência utilizou-se a curva padrão dos alcalóides isolados.

A equação abaixo mostra como foi determinada a quantidade de cada alcalóide, tanto para as células como para o meio proveniente das suspensões celulares de *Piper crassinervium*.

$$\text{Quantidade do alcalóide} = (R \text{ áreas} \times \text{quantidade p.i.}) / R'$$

Onde,

R áreas = razão entre a área do alcalóide / área do padrão interno

quantidade do p.i. = 1 mg

R' = inclinação da reta (proveniente da curva padrão de cada alcalóide)

para o alcalóide **6**, R = 0,00319

para o alcalóide **7**, R = 0,0045

A quantidade encontrada de cada alcalóide foi multiplicada por dois, pois as amostras analisadas por CLAE tinham um volume final de 2 mL. Estes valores, em miligramas, foram relacionados à quantidade de células secas, em gramas, e com base nestes resultados foram determinadas as quantidades de cada alcalóide por grama de células secas (Figura 52). Para os meios provenientes das suspensões celulares, partiu-se do mesmo cálculo, mas a quantidade do alcalóide foi relacionada com 50 mL de meio, volume este usado para a preparação das suspensões celulares na curva de crescimento (Figura 53).

Figura 52 – Quantificação dos alcalóides 6 e 7 nas células

Figura 53 – Quantificação dos alcalóides 6 e 7 no meio

A análise dos principais constituintes produzidos pelas células de *P. crassinervium* indicou a produção dos alcalóides **6** e **7**, metabólitos não isolados da planta diferenciada. Nas células a concentração observada para o alcalóide **6** variou entre 1,21 e 55,89 mg/g de células secas enquanto que para o meio de 0 a 0,60 mg/mL de meio. Para o alcalóide **7**, presente em maior quantidade nas suspensões celulares, verificou-se a variação de 38,78 a 123,91 mg/ g de células secas e para o meio celular entre 0,12 e 1,01 mg/mL de meio. A variação da concentração dos alcalóides **6** e **7** não mostrou relação com a atividade da PAL (Figura 38, página 82). Enquanto a atividade específica da enzima PAL aumentou linearmente até o quinto dia da curva, final da fase exponencial, para os alcalóides pôde-se perceber um perfil totalmente diferente. No valor máximo da atividade enzimática existia uma quantidade elevada do alcalóide **7** (100,97 mg), e uma pequena quantidade da substância **6** (7,44 mg). Quando a enzima atingiu seu menor valor, fase decrescente da curva de crescimento, obteve-se a quantidade máxima do alcalóide **7** (123,91 mg) e somente 1,92 mg do alcalóide **6**. A correlação negativa entre a atividade da PAL e os alcalóides sintetizados pode estar associada às rotas biossintéticas, indicando que as substâncias acumuladas nas suspensões celulares de *P. crassinervium* são originadas a partir da tirosina, conforme a biossíntese proposta na Figura 51 (página 90).

4.8 Experimentos com fenilalanina, luz UV e extrato de levedura

Após cada intervalo de tempo estabelecido para análise das células e dos meios provenientes das suspensões celulares (24, 48 e 66 h), foram obtidas as quantidades de células frescas e secas, conforme descrito anteriormente. Tanto as células como os meios provenientes destes experimentos, foram analisados por CLAE (sistema S7), juntamente com o padrão interno. Com base nesses resultados foram calculadas as quantidades de cada alcalóide acumuladas nas células e nos meios, para cada experimento, tendo-se como referência um controle. Para este cálculo utilizou-se a mesma equação da quantificação dos alcalóides e os mesmos valores de R para a inclinação da reta de cada substância (página 99). As figuras apresentadas a seguir (54-65) mostram os resultados destes experimentos de eliciação.

Figura 54 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com fenilalanina (células)

Figura 55 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com fenilalanina (meio)

Figura 56 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com luz UV (células)

Figura 57 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com luz UV (meio)

Figura 58 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com levedura (células)

Figura 59 – Quantificação do alcalóide 6 no experimento com levedura (meio)

Figura 60 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com fenilalanina (células)

Figura 61 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com fenilalanina (meio)

Figura 62 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com luz UV (células)

Figura 63 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com luz UV (meio)

Figura 64 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com levedura (células)

Figura 65 – Quantificação do alcalóide 7 no experimento com levedura (meio)

Os resultados de indução da biossíntese e acúmulo/excreção de metabólitos secundários em suspensões celulares de *P. crassinervium* foram baseados na utilização de luz UV, adição de *L*-fenilalanina e extrato de levedura .

A utilização de *L*-fenilalanina foi baseada no fato desta ser o aminoácido precursor dos alcalóides. Para os experimentos, os perfis dos gráficos para as células e para os meios de cultura indicaram um aumento da concentração destas substâncias com a adição de fenilalanina, quando comparados com o controle. Um pequeno aumento de concentração desses alcalóides nas células foi observado 44h após a adição, enquanto que no meio de cultura observou-se um aumento somente 66 h após a adição (Figuras 54, 55, 60 e 61).

O objetivo do experimento com luz UV foi o de induzir a formação de flavonóides, considerando que esses estão presentes nas folhas intactas de *Piper* e que os mesmos possuem determinadas etapas, como a mediada pela PAL, ativadas pela luz. A análise destes experimentos por CLAE, mostrou o mesmo perfil do extrato de células e do meio, provenientes das suspensões celulares, analisados previamente. Dessa maneira pôde-se concluir que a luz UV não induziu a formação de novos compostos ou mesmo dos flavonóides, que agiriam como substâncias de defesa ou seriam formados devido às condições de estresse do cultivo *in vitro*. Através destes resultados foi possível observar um aumento da concentração dos alcalóides, em todos os intervalos de tempo, para os experimentos com o meio celular, enquanto que para as células o aumento da quantidade dos alcalóides 6 e 7 apenas foi observado nos intervalos de 48 e 66 horas (Figuras 56, 57, 62 e 63).

A luz, independente do seu tipo, é um dos estímulos para indução da atividade da PAL, atuando assim na regulação do metabolismo e nos processos de diferenciação das plantas (Moreno *et al.*, 1994). A atividade da PAL foi determinada em culturas de suspensões celulares de pinheiro (*Picea abies*), pré-cultivadas à luz visível (células verdes) ou no escuro (células brancas). Estas suspensões foram irradiadas com luz UV (302 nm) por dez, quinze e vinte minutos. Observou-se que a atividade da PAL foi induzida no período subsequente à irradiação. O tratamento durante vinte minutos resultou em um aumento da atividade de cerca de trinta vezes. Contudo, a indução foi observada somente para células brancas (crescidas no escuro). As diferenças nas respostas do tratamento das células com luz UV podem estar relacionadas à presença nas células verdes de substâncias protetoras contra luz UV, tais como flavonóides que haviam sido detectados em estudos preliminares (Messner *et al.*, 1991).

Suspensões celulares de salsa também mostraram uma dependência da atividade da enzima PAL com a luz UV, resultando na formação de flavonóides (Jones, 1984), assim como suspensões celulares de *Catharanthus roseus* que apresentaram um aumento da atividade desta enzima quando tratadas com luz UV (Moreno *et al.*, 1994).

Experimentos com eliciadores geralmente levam à formação de substâncias ainda não presentes nas suspensões celulares, através de modificações em seu metabolismo, em resposta a um ataque externo, no caso, por fungos (Moreno *et al.*, 1994).

Plantas do gênero *Cinchona* (Rubiaceae) são fontes de importantes alcalóides terapêuticos, como quinina e quinidina. Além destes compostos, substâncias do tipo antraquinonas têm sido isoladas sendo que, em *Cinchona* exercem a função de fitoalexinas, além de seu acúmulo em partes infectadas por patógenos estar relacionado com a redução do conteúdo de alcalóides. Suspensões celulares de *Cinchona robusta*, em condições normais de cultura, foram estudadas e verificou-se que estas não acumulavam antraquinonas. A adição de 0,8 mg do eliciador por mL de suspensão celular produziu altos níveis das antraquinonas, com alta viabilidade das células. O eliciador foi adicionado em culturas de 0, 2, 4, 6 e 8 dias. O acúmulo máximo de antraquinonas nas células (cerca de 12 $\mu\text{mol/g}$ células secas) foi alcançado em 72 horas. Nestas culturas menos do que 2% do conteúdo total das antraquinonas foi encontrado no meio celular (Schripsema *et al.*, 1999).

Com o objetivo de avaliar o acúmulo de novas substâncias em culturas de *P. crassinervium* fez-se a incubação das suspensões celulares com o extrato de levedura (100 μL de uma solução 10 mg/mL). Para as células o aumento só foi observado para o alcalóide 6, num intervalo de 48 horas. Para os meios, houve um aumento em todos os intervalos de tempo do experimento para o alcalóide 6, enquanto que para o 7, apenas no intervalo de 48h (Figuras 58, 59, 64 e 65).

A fim de se verificar estes dados, seria necessário uma curva, para dosar a quantidade máxima e mínima do eliciador que causa uma resposta, e analisar como este afeta, por exemplo, a atividade da PAL. Tratando-se de um experimento novo em culturas de células de *P. crassinervium*, muito estudo ainda é necessário para o estabelecimento de melhores condições. Desses dados pode-se afirmar, no entanto, que as células ensaiadas conseguem suportar a quantidade usada do eliciador, fornecendo apenas uma leve resposta, que não levou a formação de um novo composto.

4.9 Bioautografia

As substâncias isoladas neste trabalho foram testadas, pela técnica da bioautografia, frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, a fim de se avaliar a atividade antifúngica destas substâncias. A Figura 65 mostra a cromatoplaça com as substâncias aplicadas, além dos extratos brutos que também foram submetidos ao teste. As frações relacionadas nesta cromatoplaça foram provenientes do fracionamento de folhas de *P. crassinervium* (página 21).

- 1 Extr. folha
- 2 Fração 5-6
- 3 Fração 9-12
- 4 Fração 17-18
- 5 Fração 23
- 6 Fração 24-27
- 7 Fração 30
- 8 Fração 34-36
- 9 Fração 37-38
- 10 Fração 42-45
- 11 Fração 46
- 12 Fração 50

- 13 Aristolactama 6
- 14 Aristolactama 7
- 15 Aristol. 8 e 9
- 16 Extr. folha prop.
- 17 Extr. caule prop.
- 18 Folha pr. 19-21
- 19 Talo prop. b4
- 20 Hidroquinona3
- 21 Hidroquinona4
- 22 Hidroquinona5
- 23 Flavanona2
- 24 Flavanona1

Figura 66 – Cromatoplaça das substâncias puras e frações do extrato de folhas de *P. crassinervium*

As substâncias que se mostraram ativas, **1**, **2**, **3**, **5** e 19-21b (fração proveniente de folha propagada) foram novamente bioautografadas, só que em quantidades menores, no caso, 50 e 10 μg , conforme mostra a Figura 67 .

Figura 67 – Cromatoplaça das substâncias purificadas

Baseado neste último ensaio, foram aplicados em uma cromatoplaça 10; 5; 2,5 e 1 μg destas substâncias consideradas ativas (substâncias mostradas na Figura 67) e do óleo volátil de *P. crassinervium*, juntamente com o padrão nistatina, 1 μg , a fim de se estabelecer a quantidade mínima de cada substância ativa frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*. A Tabela 17 mostra os resultados obtidos.

Tabela 17 – Limite mínimo de detecção em μg das substâncias ativas

Substância	Limite mínimo de detecção (μg)
Flavanona 1	5 μg
Flavanona 2	1 μg
Hidroquinona 3	5 μg
Hidroquinona 5	10 μg
19-21b	5 μg
óleo volátil	5 μg
nistatina (padrão)	1 μg

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que plantas de campo e cultura de células de *P. crassinervium* biossintetizam e acumulam diferentes metabólitos secundários.

Dos extratos das folhas foram isoladas duas flavanonas e três hidroquinonas, sendo que esta é a primeira descrição do isolamento de hidroquinonas em espécies de Piperaceae. As suspensões celulares não produziram flavonóide nem outro metabólito relacionado, porém foram isolados quatro alcalóides do tipo aristolactamas. O alcalóide *N*-metilado **7** é um novo produto natural.

A fim de se avaliar tal perfil, ensaios de injúria mecânica em folhas de campo, ou mesmo experimentos com eliciadores devem ser realizados, com o objetivo de induzir a formação de aristolactamas em folhas intactas. Mesmo sendo considerados compostos de proteção, os flavonóides não foram sintetizados pelas culturas de células tratadas com luz UV. Sabe-se que a flavanona sakuranetina (substância **2** isolada neste trabalho) apresenta-se como fitoalexina em culturas de folhas de arroz e somente foi sintetizada após tratamento destas folhas com luz UV (Kodama *et al.*, 1992). Além dessa função, esta flavanona apresenta uma alta atividade antifúngica o que está de acordo com a flavanona **2** isolada neste trabalho, que mostrou-se ativa contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*.

Comparando-se diferentes espécies de *Piper*, no caso *Piper crassinervium* e *Piper cernuum*, verificou-se que elas acumularam diferentes substâncias nos tecidos diferenciados e não-diferenciados, sendo que nas folhas intactas estes metabólitos seriam provenientes da desaminação da fenilalanina enquanto que nas suspensões celulares eles seriam formados a partir da descarboxilação da tirosina.

Os dados obtidos sugeriram que para *P. crassinervium* enzimas específicas para formação das aristolactamas estariam presentes nos tecidos celulares, visto que estes alcalóides seriam formados a partir da dopamina, enquanto que para *Piper cernuum* os únicos metabólitos isolados das suspensões foram tiramina e dopamina.

Tratando-se de um trabalho novo para *P. crassinervium*, muitos estudos terão que ser desenvolvidos com o objetivo de avaliar as enzimas presentes nestas suspensões celulares. Considerando-se que este trabalho constitui-se no primeiro estudo químico,

biológico e biossintético de *P. crasssinervium*, os resultados obtidos são de fundamental importância por revelar as diferentes rotas biossintéticas operantes, especialmente quando se compara plantas diferenciadas e suspensões celulares.

6. Referências bibliográficas

- Alécio, A.C., Bolzani, V.S., Young, M.C.M, Kato, M.J., Furlan, M. (1998) Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 637.
- Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B., Santos, A.S., Maia, J.G.S. (1998) Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. *J. Essent. Oil Res.*, **10**, 465.
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, Wm.H. (1985) Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, **228**, 1154.
- Bohlmann, F., Wolfgang, K., Grenz, M., Robinson, H., King, R.M. (1981) Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, **20**, 1907.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
- Camm. E.L. e Towers, G.H.N. (1977) Phenylalanine ammonia liase. *Progr. Chem.*, **4**, 169.
- Chen, Zhong-Liang and Zhu, Da-Yuan (1987) Aristolochia alkaloids. *The Alkaloids*, **31**, 29.
- Cotelle, N., Moreau, S., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Henichart, J.P. (1991) Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radical Biology & Medicine*, **11**, 63.
- Cooman, L., Everaert, E.S.W., Faché, P., Castele, K.V., Sumere, C.F.V. (1993) Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, **6**, 1419.
- Costantin, M.B. (2001) Análise química de folhas e caracterização de suspensões celulares de *Piper cernuum*. Comunicação pessoal.
- De Rosa, S., De Giulio, A., Iodice, C. (1994) Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. *J. Nat. Prod.*, **57**, 1711.
- Desai, S.J., Chaturvedi, R., Mulchandani, N.B. (1990) Piperolactam D, a new aristolactam from indian *Piper* species. *J. Nat. Prod.*, **53**, 496.
- Dewick, P.M. (1997) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, England.

- Dodds, J. H. e Roberts, L. W. (1995) *Experiments in Plant Tissue Culture*, 3^a ed. Cambridge.
- Dougall, D.K. (1988) Tissue Culture and the Study of Secondary (Natural) Products. In *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol 7, Secondary Plant Products*. Stumpf, P.K. e Conn, E.E. (Eds), Academic Press, New York.
- Duh, C.Y., Wu, Y.C., Wang, S.K. (1990) Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. *Phytochemistry*, **29**, 2689.
- Dung, N.X., Thanh, L., Khoi, T.T. (1996) Compositional analysis of the leaf, stem and rizhome oils of *Piper lolot* C. DC. from Vietnam. *J.Essent. Oil Res.*, **8**, 649.
- Endress, R. (1994) *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, New York.
- Ferreira, S.H., Barata, L.E.S., Salles, S.L.M., Queiróz, S.R.R., Heluy Neto, N.E., Corazza, R., Farias, R.C. (1998) *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Figueiredo, A.C.S. (1992) *Produção de metabólitos secundários in vivo e in vitro*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Fromanteau, D.L.G., Gastmans, J.P., Vestri, S.A., Emerenciano, V.P., Borges, J.H.G. (1993) A constraints generator in structural determination by microcomputer. *Computers and Chemistry*, **17**, 369.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean roots cell. *Exp. Cell Res.*, **50**, 151.
- Grisebach, H. (1985) In *The Biochemistry of Plant Phenolics*. Ann. Proc. Phytochem. Soc. of Europe, 25, Van Sumere, C.F. e Lea, P. (Eds), Oxford University Press, Clarendon, 183.
- Hahlbrock, K. e Grisebach (1979) Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 105.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, University Press, New York.
- Hamburger, M. e Hostettmann, K. (1991) Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864.
- Harborne, J.B. e Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481.

- Heide, L., Nishioka, N., Fukui, H., Tabata, M. (1989) Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry*, **28**, 23.
- Heller, W. e Forkmann, G. (1988) in *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980*. Harborne, J.B. (Ed.) Chapman & Hall, New York, 399.
- Hinderer, W., Noé, W., Seitz, H.U. (1983) Differentiation of metabolic pathways in the umbel of *Daucus carota*. *Phytochemistry*, **22**, 2417.
- Homans, A.L. e Fuchs, A. (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromat.* **51**, 325.
- Jensen, S., Hansen, J., Boll, P.M. (1993) Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry*, **49**, 387.
- Joly, A. B. (1985). *Introdução à Taxonomia vegetal*, Ed. Nacional, São Paulo.
- Jones, D.H. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, **23**, 1349.
- Katayama, T., Davin, L.B., Chu, A., Lewis, N.G. (1992) Novel benzylic reductions in lignans biogenesis in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, **33**, 581.
- Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H. (1976) *Química Farmacêutica*, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T., Kiyosawa, S. (1992) Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, **31**, 3807.
- Kutney, J.P. (1997) Plant cell culture combined with chemistry-routes to clinically important compounds. *Pure and Applied Chemistry*, **69**, 431.
- Leclercq, P.A., Van Genderen, M.H.P., Thanh, L., Khien, P., Dung, N.X. (1997) Composition of the essential oil from the aerial parts of *Piper pierreii* C. DC. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, **9**, 721.
- Limberger, R.P. (1998) *Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero Mikania (Asteraceae) e da subtribo Myrtinae (Myrtaceae) de ocorrência no Rio Grande do Sul*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lobo, A.M. (1976) Biossíntese de Produtos Naturais – Metabolismo Secundário. In *Métodos de Estudo Biossintético*, Lobo, A.M. (Ed), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 15.

- Lognay, G.C., Bouxin, P., Marlier, M., Haubruge, E., Gaspar, C., Rodriguez, A. (1996) Composition of the essential oil of *Piper acutifolium* Ruiz. and Pav. from Peru. *J. Essent. Oil Res.*, **8**, 689.
- Lopes, S.O., Moreno, P.R.H., Henriques, A.T. (2000) Growth characteristics and chemical analysis of *Psycotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 259.
- Luz, A.I.R., Silva, J.D., Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Silva, M.H.L., Maia, J.G.S. (1999) Volatile Constituents of Brazilian Piperaceae, Part 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. *J. Essent. Oil Res.*, **13**, 479.
- Mabberley, D.J. (1997) *The Plant-book. A Portable Dictionary of the Higher Plants*. Cambridge Univ. Press., New York.
- McCormick, S., Robson, K., Bohm, B. (1986) Flavonoids of *Wyethia angustifolia* and *W. helenioides*. *Phytochemistry*, **25**, 1723.
- Maia, J.G.S., Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L., Luz, A.I.R., Bastos, C.N. (1998) Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour Fragrance J.*, **13**, 269.
- Mann, J. (1994) *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Oxford University Press Inc., New York, 53-61.
- Martins, A.P., Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Cañiguera, S., Casanova, J., Da Cunha, A.P., Adzet, T. (1998) Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*. **49**, 2019.
- Matos, F.J.A. (1988) *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Edições UFC, Fortaleza, 13.
- Matsui, K. e Munakata, K. (1976) Four new neolignans from *Piper futokadzwa*. *Tetrahedron Lett.*, 4371.
- Messner, B., Boll, M., Berndt, J. (1991) L-Phenylalanine ammonia-lyase in suspension culture cells of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell*, **27**, 267.
- Mihopoulos, N., Vagias, C., Chinou, I., Roussakis, C., Scoullou, M., Harvala, C., Roussis, V. (1999) Antibacterial and Cytotoxic Natural and Synthesized Hydroquinones from sponge *Ircinia spinosula*. *Z. Naturforsch.*, **54c**, 417.
- Montanari, C.A. e Bolzani, V.S. (2001) Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, **24**, 105.

- Moreno, P.R.H., Heijden, R., Verpoorte, R. (1994) Induction of the secondary metabolism in *Catharanthus roseus* cell suspension culture in response to UV irradiation and the addition of a benzoic acid derivative. *Heterocycles*, **39**, 457.
- Orjala, J., Erdelmeier, C.A.J., Wright, A.D., Tali, T. Sticher, O. (1993) *Planta Medica*, **59**, 546.
- Olsen, C.E., Tyagi, **Om D.**, Boll, P.M., Hussaini, F.A., Parmar, V.S., Sharma, N.K., Taneja, P., Jain, S.C. (1993) An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revisions of the structures of piperolactam B and D. *Phytochemistry* **33**, 518.
- 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.
- Pino, J.A., Rosado, A., Rodriguez, M., Garcia, D. (1998) Composition of leaf oil of *P. auritum* H.B.K. grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, **10**, 333.
- Reynolds, G.W. e Rodriguez, E. (1981) Prenylated hydroquinones: contact allergens from trichomes of *Phacelia minor* and *P. parryi*. *Phytochemistry*, **20**, 1365.
- Ruangrunsi, N., Prathanturarug, S., Lange, G., Organ, M. (1992) An *N*-methyl aristolactam and an oxygenated cyclohesane derivative from *Piper rebesioides*. *Phytochemistry* **31**, 2397.
- Sartorelli, P. (2000) Biossíntese de neolignanas benzofurânicas em *Piper regnellii*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química Fundamental do IQ-USP.
- Schripsema, J., Ramos-Valdivia, A., Verpoorte, R. (1999) Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry*, **51**, 55.
- Sengupta, S. e Rao, A.B. (1987) The chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia*. **LVIII**, 147.
- Singh, Y.N. (1992) Kava: an overview. *J. Ethnopharmacology*, **37**, 13.
- Singh, S.K., Prasad, A.K., Olsen, C.E., Jha, A., Jain, S.C., Parmar, V.S., Wengel, J. (1996) Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry* **43**, 1355.
- Smith, R.M., (1983) Kava lactones in *Piper methysticum* from Fuji. *Phytochemistry*, **22**, 1055.

- Smollny, T., Wicherst, H., Kalenberg, S., Shahsavari, A., Petersen, M., Alfermann, A.W. (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry*, **48**, 975.
- Stafford, A. e Warren, G. (1991) Plant Cell and Tissue Culture. In *Natural Products and Metabolites from Plants and Plant Tissue Cultures*. Stafford, A. (Ed.), University Press, 124-162. .
- Stockigt, J. e Zenk, M.H. (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Z. Naturforsch*, **30c**, 352.
- Sun, N.J. , Antoun. M., Chang, C., Cassady, J.M. (1987) New cytotoxic aristolactams from *Paparistolochia-flos-avis*. *J. Nat. Prod.*, **50**, 843.
- van der Heidjen, R. (1989) Indole alkaloids in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana* species. Leiden Universiteit (Tese de Doutoramento).
- Walton, N. J. (1992) A fine chemical harvest. *Chemistry in Britain*, 525.
- Williams, D.E., Allen, T.M., Soest, R.V., Behrisch, H.W., Andersen, R.J. (2001) Glánvillic acids A and B and methyl capucinoate A, new metabolites isolated from the Caribbean sponges *Plakortis halichondrioides* and *Plakinastrella onkodes*. *J. Nat. Prod.*, **64**, 281.
- Wu, Q., Wang, S., Tu, G., Feng, Y., Yang, J. (1997) Alkaloids from *Piper puberullum*. *Phytochemistry*, **44**, 727.
- Yuncker, T.G. (1972) The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, **2**, 19.
- Zenk, M.H. (1991) Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861.
- Zuurbier, K.W.M., Fung, S., Scheffer, J.J.C, Verpoorte, R. (1993) Assay of chalcone synthase activity by high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry*, **34**, 1225.