UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

JOAQUIM VOGT MARQUES

**Atividade biológica de amidas e
análogos de espécies de *Piper* e
estudos biossintéticos**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/02/2009

JOAQUIM VOGT MARQUES

**Atividade biológica de amidas e
análogos de espécies de *Piper* e
estudos biossintéticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
2009

*Dedico esse trabalho a minha família, aos
meus amigos e a querida Camila.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Massuo pelo apoio, incentivo orientação e principalmente pela amizade.

Aos meus pais Renato e Monica e ao meu irmão Francisco pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus avós João, Marília, Grácio (*in memoriam*) e Joanna Maria, e ao meu padrinho Antônio pela inspiração, amor e amizade.

À querida Camila, por todo amor, apoio e compreensão.

Ao Piero, Diogo e André, pela grande amizade.

Aos amigos e colegas do LQPN, Adalberto, Alberto, Aline, Anderson, Antonio, Camila, Clécio, Diego, Edgard, Felipe, Fernando Macabro, Giovana, Homero, Juliana, João Homero, João Lago, José Antonio Joaquim, Karina, Lucas, Lydia, Marcela, Marisi, Nidia, Renata Fogaça, Renata Silva, Tatiana por toda ajuda, ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos colegas do BIOCEL Tiago, Leonardo, Claudete, Vanildo, Fernanda, Júlia e Amanda.

Ao Prof. Norman G. Lewis pela oportunidade, apoio e, principalmente, pelo aprendizado durante o estágio na Washington State University.

Aos amigos da Washington State University.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo.

À FAPESP, pelos recursos financeiros.

Aos professores e técnicos do Instituto de Química pelo aprendizado e apoio.

À Profa. Dra. Eny I. S. Floh, pela orientação nos estudos de biotecnologia de plantas e por disponibilizar o Laboratório de Biologia Celular de Plântulas (BIOCEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários da SPG do IQ-USP, Cibeles, Milton, Emiliano e Marcelo pela atenção e apoio em todo o processo.

À Profa. Maria Claudia M. Young e a Maura Casari do Instituto de Botânica do

Estado de São Paulo pela realização do ensaio antifúngico e inibidor de acetilcolinesterase.

À Márcia Mendes, do Instituto Biológico pelo ensaio carrapaticida.

Ao Haroldo Oliveira pelos ensaios antimicrobianos.

À Prof^a Letícia Veras Costa Lotufo e José Delano Barreto Marinho Filho, pelos ensaios de citotoxicidade.

RESUMO

Marques, J. V. **Atividade biológica de amidas e análogos de espécies de *Piper* e estudos biossintéticos**. 2009. 375 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foram isoladas de *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis* seis amidas, incluindo a piperovatina, piperlonguminina, isopiperlonguminina e corcovadina, duas inéditas (scutifoliamida A e scutifoliamida B), além de duas aristolactamas (piperolactama C e stigmalactama). A partir de *P. tuberculatum* foram isoladas as amidas piplartina e pelitorina e os ésteres (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de etila (**11**) e 3,4,5-trimetoxidihidrocinaamato de etila (**12**), esse último obtido pela primeira vez de origem natural. Em função da atividade biológica apresentada pelas amidas isoladas, foram sintetizadas 5-fenil-pentadienamidas e 3-cinamamidas com diferentes substituintes nos anéis aromáticos e na porção amídica. Os extratos, produtos naturais isolados e sintéticos foram submetidos a ensaios de atividade antifúngica frente *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, antimicrobiana frente à *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, inibidora de acetilcolinesterase, carrapaticida frente à *Boophilus microplus* e citotóxica frente a linhagens tumorais humanas. Para a atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foi constatada maior atividade para as *N*-isobutil e *N*-pentilamidas sem substituintes no anel aromático. As *N*-isobutilamidas foram mais ativas como inibidores de acetilcolinesterase; contra *B. microplus* grande atividade foi apresentada por piperovatina, e os ensaios de citotoxicidade indicaram que o grupo 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-ona é fundamental para a atividade. As plântulas de *P. corcovadensis* apresentaram em sua composição predominantemente piperovatina e assim foram utilizadas para estudos com incorporação de acetato de sódio-[1-¹⁴C] e *L*-fenilalanina - [U-¹⁴C] na mesma. As plântulas e calos obtidos para *P. scutifolium* não apresentaram produção significativa de metabólitos secundários. O estudo do metabolismo fenilpropanoídico de *P. regnellii* resultou no isolamento parcial da enzima responsável pela conversão de conocarpano em eupomatenóide-6.

Palavras-chave: *Piper scutifolium*, *Piper corcovadensis*, amidas, análogos sintéticos, atividade biológica.

ABSTRACT

Marques, J. V. **Biological activity of amides and analogs from *Piper* species and synthetic analogs**. 2009. 375p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Six amides were isolated from *Piper scutifolium* and *P. corcovadensis* including piperovatine, piperlonguminine, isopiperlonguminine and corcovadine, the new scutifoliamide A and scutifoliamide B and also two aristolactams (piperolactam C and stigmalactam). From *P. tuberculatum* the amides piplartine and pellitorine and two esters, ethyl (*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamate (**11**) and ethyl 3,4,5-trimethoxydihydrocinnamate (**12**) were isolated, this last one obtained for the first time from natural sources. Due to the biological activity observed for the natural amides, 5-phenyl-pentadienamides and 3-cinnamamides having different substituents in the aromatic ring and amide moiety were synthesized. Extracts, isolated and synthetic compounds were assayed against *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*, inhibitory of acetylcholinesterase, against the tick *Boophilus microplus* and cytotoxic against human cell lines. A higher activity was observed against *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum* for *N*-isobutylamides and *N*-pentylamides having no substituents in the aromatic ring. *N*-isobutylamides were very active inhibitors of acetylcholinesterase; piperovatin was the most active against *B. microplus* and 5,6-dihydropyridin-2(1*H*)-one moiety was essential as the cytotoxicity is concerned. Plantlets of *P. corcovadensis* contained piperovatine as major compound and thus were used as model for incorporation of sodium acetate-[1-¹⁴C] and *L*-phenylalanine-[U-¹⁴C]. The production of secondary metabolites in plantlets and callus of *P. scutifolium* was not significant. The studies of phenylpropanoid metabolism in *P. regnellii* was addressed to partial purification and characterization of the enzyme involved in the conversion of conocarpan to eupomatenoid-6.

Key-words: *Piper scutifolium*, *Piper corcovadensis*, amides, synthetic analogs
biological activity.

Lista de Figuras

Figura 1.1 <i>Papaver somniferum</i> , ilustração de Franz Eugen Köhler (1883-1914).....	24
Figura 1.2 Morfina (A) e codeína (B)	25
Figura 1.3 Padrão de incorporação de glicose, acetato, piruvato, e eritrose marcados com ¹³ C (ligações e carbonos em negrito) do mevalonato (A) e via alternativa do fosfato de metileritritol (B) (Rohmer <i>et al.</i> , 1993; Mahmud, 2007).....	28
Figura 1.4 Diferentes níveis do metabolismo: genes, enzimas e metabólitos	31
Figura 1.5 . Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas, esquema adaptado de (Dixon, 2001b). Os principais genes clonados e enzimas estão em itálico. <i>TDC</i> , L-triptofano descarboxilase; <i>TyDC</i> , L-tirosina descarboxilase; <i>CYP80B1</i> , (<i>S</i>)- <i>N</i> -metilcoclaurine-3'-hidroxilase; <i>PAL</i> , L-fenilalanina amônia-liase; <i>C4H</i> , cinamato 4-hidroxilase; <i>4CL</i> , 4-cumarato CoA ligase; <i>CHS</i> , chalcona sintase; <i>CHR</i> , chalcona redutase; <i>CHI</i> , chalcona isomerase; <i>STS</i> , estilbeno sintase; <i>ACC</i> , acetil CoA carboxilase; <i>DXPS</i> , 1-deoxi-xilulose 5-fosfato sintase; <i>HMGR</i> , 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase; <i>SS</i> , sesquiterpeno sintase; <i>SqS</i> , esqualeno sintase; <i>SqE</i> , esqualeno epoxidase; <i>βAS</i> , β-amirina sintase; <i>2-HIS</i> , 2-hidroxiisoflavanona sintase; <i>IOMT</i> , isoflavona 4'- <i>O</i> -metiltransferase; <i>IFR</i> , isoflavona redutase.....	34
Figura 1.6 Taxol [®] , artemisinina, vimblastina e vincristina	40
Figura 1.7 Estruturas dos herbicidas leptospermona (A), sulcotriona (B) e mesotriona (C)	41
Figura 1.8 Monoterpenos de importância econômica	42
Figura 1.9 <i>Piper nigrum</i> , ilustração de feita por Franz Eugen Köhler (1883-1914)	43
Figura 1.10 Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i>	44
Figura 1.11 Morcego prestes a se alimentar de um fruto de <i>Piper aduncum</i> (Merlin D. Tuttle/Bat Conservation International).....	45
Figura 1.12 Relação de ordens e algumas famílias de Angiospermas suportadas por freqüências de jackknife ou bootstrap acima de 50% apresentadas por APG (APG, 2003)	47
Figura 1.13 Piperina	53
Figura 1.14 Abordagem tradicional para a obtenção de amidas.....	59
Figura 1.15 Abordagem utilizada tipicamente para introdução de insaturações	60
Figura 1.16 Abordagem utilizada por Rügheimer na primeira síntese da piperina e ainda utilizada para obtenção de análogos	60
Figura 1.17 Abordagem de Tsuboi e Takeda para síntese de piperina.....	61

Figura 1.18 Abordagem utilizada por Chandrasekhar para a síntese da piperina.....	61
Figura 1.19 Reação de Döebner.....	62
Figura 1.20 Arilação de Heck para a obtenção de cinamamidas	63
Figura 2.1 Piperovatina.....	65
Figura 2.2 Estrutura geral das amidas sintéticas	66
Figura 3.1 Casa de vegetação mantida no Instituto de Química da USP	69
Figura 3.2 Síntese de Dienamidas.....	73
Figura 3.3 Esquema de aparato utilizado na síntese em microondas.....	92
Figura 3.4 Divisões gerais de um fruto	128
Figura 3.5 Obtenção e repicagem de plântulas	129
Figura 3.6 Última etapa na biossíntese de eupomatenóide-6	132
Figura 3.7 Acoplamento oxidativo levando a formação de (±)-conocarpano	136
Figura 4.1 Piperovatina.....	138
Figura 4.2 Cromatograma de folhas de <i>P. corcovadensis</i>	139
Figura 4.3 Cromatograma de caule de <i>P. corcovadensis</i>	139
Figura 4.4 Cromatograma de raízes de <i>P. corcovadensis</i>	140
Figura 4.5 Isômeros de piperlonguminina isolados de <i>P. scutifolium</i>	141
Figura 4.6 Amidas acetiladas de <i>P. scutifolium</i>	143
Figura 4.7 Scutifoliamidas A e B.....	146
Figura 4.8 Piperolactama C e stigmalactama	148
Figura 4.9 Stigmalactama.....	149
Figura 4.10 Piperolactama C	151
Figura 4.11 Cromatograma das folhas de <i>P. scutifolium</i>	152
Figura 4.12 Cromatograma do caule de <i>P. scutifolium</i>	152
Figura 4.13 Cromatograma das raízes de <i>P. scutifolium</i>	153
Figura 4.14: Substâncias isoladas de <i>Piper tuberculatum</i>	154
Figura 4.15 Formação do ânion de fosfonocrotonato de dietila, estabilizado pelas estruturas de ressonância.....	160
Figura 4.16 Mecanismo proposto para olefinação, via A levando ao produto <i>cis</i> e via B levando ao produto <i>trans</i>	161
Figura 4.17 Íons acílio formados na fragmentação das dienamidas	164
Figura 4.18 Cinamamidas sintetizadas	168
Figura 4.19 Reação de Knoevenagel, variação de Döebner	169
Figura 4.20 Mecanismo de catalise orgânica com piperidina como catalisador.....	169
Figura 4.21 Fragmentação e íons acílio característicos de cada esqueleto.....	173

Figura 4.22 Fragmentação levando aos fragmentos característicos dos diferentes N-substituíntes	174
Figura 4.23 Proposta de fragmentação dos íons acílios	175
Figura 4.24 Placas utilizadas no ensaio antifúngico. 1-piperina; 2-piplartina; 3-piperovatina; 4-piperlonguminina; 5-12; 6-pelitorina; 7-1a; 8-1b; 9-1c; 10-2a ; 11-2b; 12-desconsiderar; 13-3b; 14-3c; 15-3d; 16-3e; 17 a 23- desconsiderar; 24-4a; 25-4c; 26-4d; 27-5a; 28-5b; 29-5c; 30-5d; 31-5e; 32-6a; 33-6b; 34-6c; 35-6d; 36-6e; 37-7a; 38-7c; 39-8a; 40-8b; 41-8c; 42-8d; 43-9a; 44-9b; 45-9c; 46-9d; 47-10a; 48-10b; 49-10c; 50-10d; 51-10e; e P-Nistatina.	182
Figura 4.25 Galantamina	188
Figura 4.26 Compostos avaliados para atividade inibidora de acetilcolinesterase.....	188
Figura 4.27 Ensaio anti-acetilcolinesterase preliminar, com 200 µg	189
Figura 4.28 Determinação do limite de detecção para os os compostos 1b, 2b, 3b, piperolactama C e piperina	189
Figura 4.29 <i>Boophilus microplus</i> e bovino infestado pelo parasita	191
Figura 4.30 Amitraz	193
Figura 4.31 Piperarborenina C.....	194
Figura 4.32 Plântulas de <i>P. corcovadensis</i> germinando e após repicagem.....	195
Figura 4.33 Cromatograma do extrato de plântulas de <i>P. corcovadensis</i>	196
Figura 4.34 Início de clorose em plântulas <i>in vitro</i>	196
Figura 4.35 Formação de calos de <i>P. scutifolium</i> a partir de pecíolos	197
Figura 4.36 Calos de <i>P. scutifolium</i> após repicagem	197
Figura 4.37 Organogênese e formação de pelos radiculares em explantes de raiz de <i>P. corcovadensis</i> sob tratamento A.....	198
Figura 4.38 Formação de calos e pelos radiculares em explantes de raiz de <i>P. corcovadensis</i> sob tratamento B.....	199
Figura 4.39 Incorporação de acetato de sódio-[1- ¹⁴ C]	201
Figura 4.40 Incorporação de L-fenilalanina-[U- ¹⁴ C].....	201
Figura 4.41 Transformação de conocarpano em eupomatenóide-6.....	203
Figura 4.42 SDS-PAGE ilustrando as diferentes etapas de purificação da enzima	205
Figura 4.43 Conversão de flavanonas em flavonas, catalizada por flavonas sintases..	206
Figura 4.44 Gráfico de cinética da formação de eupomatenóide-6 para (+) e (-)-conocarpano	208
Figura 7.1 Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de piperovatina	247
Figura 7.2 Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de piperovatina..	247

Figura 7.3 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de piperovatina.....	248
Figura 7.4 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de piperlonguminina	248
Figura 7.5 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de piperlonguminina	249
Figura 7.6 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de piperlonguminina	249
Figura 7.7 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de isopiperlonguminina.....	250
Figura 7.8 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de isopiperlonguminina.....	250
Figura 7.9 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de isopiperlonguminina	251
Figura 7.10 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da corcovadina	251
Figura 7.11 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da corcovadina	252
Figura 7.12 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da corcovadina	252
Figura 7.13 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de scutifoliamida A	253
Figura 7.14 Ampliação de espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de scutifoliamida A	253
Figura 7.15 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de scutifoliamida A	254
Figura 7.16 Espectro no IV de scutifoliamida A	254
Figura 7.17 Espectro de massas de scutifoliamida A	255
Figura 7.18 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de scutifoliamida B	255
Figura 7.19 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de scutifoliamida B	256
Figura 7.20 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de scutifoliamida B	256
Figura 7.21 Espectro no IV de scutifoliamida B	257
Figura 7.22 Espectro de massas de scutifoliamida B	257
Figura 7.23 Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de estigmactama	258
Figura 7.24 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de estigmactama.....	258
Figura 7.25 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de estigmactama.....	259
Figura 7.26 Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de estigmactama	259
Figura 7.27 Espectro de massas de stigmactama	260
Figura 7.28 Espectro no IV de stigmactama	260
Figura 7.29 Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de piperolactama C	261
Figura 7.30 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de piperolactama C.....	261

Figura 7.31 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de piperolactama C	262
Figura 7.32 Espectro de massas de piperolactama C	262
Figura 7.33 Espectro no IV de piperolactama C	263
Figura 7.34 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de piplartina	263
Figura 7.35 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de piplartina	264
Figura 7.36 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de pelitorina	264
Figura 7.37 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de pelitorina	265
Figura 7.38 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 11	265
Figura 7.39 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 11	266
Figura 7.40 Espectro no IV de 11	266
Figura 7.41 Espectro de massas de 11	267
Figura 7.42 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 12	267
Figura 7.43 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de 12	268
Figura 7.44 Espectro de RMN 2-D (HSQC, CDCl_3 , 300 MHz) de 12	268
Figura 7.45 Espectro no IV de 12	269
Figura 7.46 Espectro de massas de 12	269
Figura 8.1 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 1	270
Figura 8.2 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de 1	270
Figura 8.3 Espectro no IV de 1	271
Figura 8.4 Espectro de massas de 1	271
Figura 8.5 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 1a	272
Figura 8.6 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 1a	272
Figura 8.7 Espectro no IV de 1a	273
Figura 8.8 Espectro de 1a	273
Figura 8.9 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 1b	274
Figura 8.10 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 1b	274
Figura 8.11 Espectro no IV de 1b	275
Figura 8.12 Espectro de massas de 1b	275
Figura 8.13 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 1c	276
Figura 8.14 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 1c	276
Figura 8.15 Espectro no IV de 1c	277
Figura 8.16 Espectro de massas de 1c	277
Figura 8.17 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) de 2	278
Figura 8.18 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de 2	278

Figura 8.19 Espectro no IV de 2	279
Figura 8.20 Espectro de massas de 2	279
Figura 8.21 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 2a	280
Figura 8.22 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 2a	280
Figura 8.23 Espectro no IV de 2a	281
Figura 8.24 Espectro de massas de 2a	281
Figura 8.25 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 2b	282
Figura 8.26 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 2b	282
Figura 8.27 Espectro no IV de 2b	283
Figura 8.28 Espectro de massas de 2b	283
Figura 8.29 Espectro de RMN de ^1H (DMSO-D_6 , 300 MHz) de 3	284
Figura 8.30 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-D_6 , 75 MHz) de 3	284
Figura 8.31 Espectro no IV de 3	285
Figura 8.32 Espectro de massas de 3	285
Figura 8.33 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 3b	286
Figura 8.34 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 3b	286
Figura 8.35 Espectro no IV de 3b	287
Figura 8.36 Espectro de massas de 3b	287
Figura 8.37 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 3c.....	288
Figura 8.38 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 3c	288
Figura 8.39 Espectro no IV de 3c	289
Figura 8.40 Espectro de massas de 3c	289
Figura 8.41 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 3d	290
Figura 8.42 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 3d	290
Figura 8.43 Espectro no IV de 3d	291
Figura 8.44 Espectro de massas de 3d	291
Figura 8.45 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 3e	292
Figura 8.46 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 3e	292
Figura 8.47 Espectro no IV de 3e	293
Figura 8.48 Espectro de massas de 3e	293
Figura 8.49 Espectro de RMN de ^1H (DMSO-D_6 , 200 MHz) de 4	294
Figura 8.50 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-D_6 , 50 MHz) de 4	294
Figura 8.51 Espectro no IV de 4	295
Figura 8.52 Espectro de massas de 4	295
Figura 8.53 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 4a	296

Figura 8.54 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 4a	296
Figura 8.55 Espectro no IV de 4a	297
Figura 8.56 Espectro de massas de 4a	297
Figura 8.57 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 4c.....	298
Figura 8.58 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 4c	298
Figura 8.59 Espectro no IV de 4c	299
Figura 8.60 Espectro de massas de 4c	299
Figura 8.61 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 4d	300
Figura 8.62 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 4d	300
Figura 8.63 Espectro no IV de 4d	301
Figura 8.64 Espectro de massas de 4d	301
Figura 8.65 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 5a	302
Figura 8.66 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 5a.....	302
Figura 8.67 Espectro no IV de 5a	303
Figura 8.68 Espectro de massas de 5a	303
Figura 8.69 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 5b.....	304
Figura 8.70 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 5b	304
Figura 8.71 Espectro no IV de 5b	305
Figura 8.72 Espectro de massas de 5b	305
Figura 8.73 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 5c.....	306
Figura 8.74 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 5c.....	306
Figura 8.75 Espectro no IV de 5c	307
Figura 8.76 Espectro de massas de 5c	307
Figura 8.77 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 5d	308
Figura 8.78 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 5d	308
Figura 8.79 Espectro no IV de 5d	309
Figura 8.80 Espectro de massas de 5d	309
Figura 8.81 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 5e	310
Figura 8.82 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 5e	310
Figura 8.83 Espectro no IV de 5e	311
Figura 8.84 Espectro de massas de 5e	311
Figura 8.85 Espectro de RMN de ^1H (DMSO-D_6 , 200 MHz) de 6	312
Figura 8.86 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-D_6 , 50 MHz) de 6	312
Figura 8.87 Espectro no IV de 6	313
Figura 8.88 Espectro de massas de 6	313

Figura 8.89 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 6a	314
Figura 8.90 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 6a	314
Figura 8.91 Espectro no IV de 6a	315
Figura 8.92 Espectro de massas de 6a	315
Figura 8.93 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 6b	316
Figura 8.94 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 6b	316
Figura 8.95 Espectro no IV de 6b	317
Figura 8.96 Espectro de massas de 6b	317
Figura 8.97 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 6c.....	318
Figura 8.98 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 6c	318
Figura 8.99 Espectro no IV de 6c	319
Figura 8.100 Espectro de massas de 6c.....	319
Figura 8.101 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 6d	320
Figura 8.102 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 6d	320
Figura 8.103 Espectro no IV de 6d	321
Figura 8.104 Espectro de massas de 6d	321
Figura 8.105 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 6e	322
Figura 8.106 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 6e	322
Figura 8.107 Espectro no IV de 6e	323
Figura 8.108 Espectro de massas de 6e	323
Figura 8.109 Espectro de RMN de ^1H (DMSO-D_6 , 200 MHz) de 7	324
Figura 8.110 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-D_6 , 50 MHz) de 7	324
Figura 8.111 Espectro no IV de 7	325
Figura 8.112 Espectro de massas de 7	325
Figura 8.113 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 7a	326
Figura 8.114 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 7a	326
Figura 8.115 Espectro no IV de 7a	327
Figura 8.116 Espectro de massas de 7a	327
Figura 8.117 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 7c.....	328
Figura 8.118 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 7c	328
Figura 8.119 Espectro no IV de 7c	329
Figura 8.120 Espectro de massas de 7c.....	329
Figura 8.121 Espectro de RMN de ^1H (DMSO-D_6 , 200 MHz) de 8	330
Figura 8.122 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-D_6 , 50 MHz) de 8.....	330
Figura 8.123 Espectro no IV de 8	331

Figura 8.124 Espectro de massas de 8	331
Figura 8.125 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 8a	332
Figura 8.126 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 8a	332
Figura 8.127 Espectro no IV de 8a	333
Figura 8.128 Espectro de massas de 8a	333
Figura 8.129 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 8b	334
Figura 8.130 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 8b	334
Figura 8.131 Espectro no IV de 8b	335
Figura 8.132 Espectro de massas de 8b	335
Figura 8.133 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 8c.....	336
Figura 8.134 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 8c	336
Figura 8.135 Espectro no IV de 8c	337
Figura 8.136 Espectro de massas de 8c.....	337
Figura 8.137 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 8d	338
Figura 8.138 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 8d	338
Figura 8.139 Espectro no IV de 8d	339
Figura 8.140 Espectro de massas de 8d	339
Figura 8.141 Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-\text{D}_6$, 200 MHz) de 9	340
Figura 8.142 Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-\text{D}_6$, 50 MHz) de 9	340
Figura 8.143 Espectro no IV de 9	341
Figura 8.144 Espectro de massas de 9	341
Figura 8.145 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 9a	342
Figura 8.146 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 9a	342
Figura 8.147 Espectro no IV de 9a	343
Figura 8.148 Espectro de massas de 9a	343
Figura 8.149 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 9b	344
Figura 8.150 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 9b	344
Figura 8.151 Espectro no IV de 9b	345
Figura 8.152 Espectro de massas de 9b	345
Figura 8.153 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 9c	346
Figura 8.154 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 9c	346
Figura 8.155 Espectro no IV de 9c	347
Figura 8.156 Espectro de massas de 9c.....	347
Figura 8.157 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 9d	348
Figura 8.158 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 9d	348

Figura 8.159 Espectro no IV de 9d	349
Figura 8.160 Espectro de massas de 9d	349
Figura 8.161 Espectro de RMN ^1H (DMSO- D_6 , 200 MHz) de 10	350
Figura 8.162 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , 50 MHz) de 10	350
Figura 8.163 Espectro no IV de 10	351
Figura 8.164 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 10a	352
Figura 8.165 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 10a	352
Figura 8.166 Espectro no IV de 10a	353
Figura 8.167 Espectro de massas de 10a	353
Figura 8.168 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 10b	354
Figura 8.169 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 10b	354
Figura 8.170 Espectro no IV de 10b	355
Figura 8.171 Espectro de massas de 10b	355
Figura 8.172 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 10d	356
Figura 8.173 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 10d	356
Figura 8.174 Espectro no IV de 10d	357
Figura 8.175 Espectro de massas de 10d	357
Figura 8.176 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 10e	358
Figura 8.177 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 10e	358
Figura 8.178 Espectro no IV de 10e	359
Figura 8.179 Espectro de massas de 10e	359

Lista de Tabelas

Tabela 1-1 Alguns compostos isolados de espécies de <i>Piper</i>	50
Tabela 1-2 Amidas de origem vegetal e atividade biológica	54
Tabela 3-1 Composição de reguladores utilizados para obtenção de calos	130
Tabela 4-1 Dados de RMN de piperovatina obtidos em comparação com dados da literatura.....	138
Tabela 4-2 Dados de RMN de piperlonguminina em comparação com os da literatura.....	142
Tabela 4-3 Dados de RMN de isopiperlonguminina obtidos em comparação com os da literatura.....	142
Tabela 4-4 Dados de RMN obtidos para corcovadina	144
Tabela 4-5 Dados da amidas inéditas Scutifoliamida A e B.....	147
Tabela 4-6 Dados de RMN obtidos para Stigmactama em comparação com literatura	150
Tabela 4-7 Dados RMN de ^1H e ^{13}C de piperolactama C	151
Tabela 4-8 Dados obtidos para piplartina	155
Tabela 4-9 Dados obtidos para pelitorina	155
Tabela 4-10 Dados de RMN de 11	157
Tabela 4-11 Dados obtidos para 12.....	158
Tabela 4-12 Rendimentos na síntese de dienamidas	162
Tabela 4-13 Bandas no IV das dienamidas obtidas.....	163
Tabela 4-14 Rendimentos na síntese de cinamamidas	170
Tabela 4-15 Bandas no IV característicos das cinamamidas obtidas	172
Tabela 4-16 Resultado da bioautografia: * = atividade fraca; ** = atividade média; *** = atividade forte e - = não detectado.....	183
Tabela 4-17: Ensaios Antimicrobianos contra patógenos humanos	186
Tabela 4-18 Resultado do ensaio contra larvas de <i>Boophilus microplus</i>	192
Tabela 4-19 Etapas de purificação de eupomatenóide-6-sintase	204
Tabela 4-20 Condições de otimização das condições reacionais.....	206

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	clorofórmio deuterado
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilssulfóxido
DMSO-D_6	dimetilssulfóxido deuterado
DO	densidade ótica
HSQC	coerência heteronuclear de um quantum
HMBC	coerência heteronuclear de múltiplas ligações
Hz	Hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento em Hz
m/z	razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica em Da
$[M^+]$	íon molecular
MeOH	metanol
mult	multiplicidade
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PKS	policetídeo sintase
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
SDS	dodecil sulfato de sódio
t.a.	temperatura ambiente
δ	deslocamento químico
s	simpleto
sl	simpleto largo
d	duplete
dl	duplete largo
t	triplete
m	multiplete
dd	duplete duplo
td	triplete duplo

SUMÁRIO

1	Introdução	23
1.1	Química de produtos naturais	23
1.1.1	Breve história.....	23
1.1.2	Aspectos evolutivos e ecofisiológicos.....	35
1.1.3	Importância econômica.....	39
1.2	O gênero <i>Piper</i>	43
1.2.1	História natural.....	43
1.2.2	Fitoquímica	49
1.3	Amidas de <i>Piper</i>	53
1.3.1	Ocorrência e atividade biológica.....	53
1.3.2	Estratégias sintéticas.....	59
2	Objetivos	65
3	Materiais e métodos	67
3.1	Generalidades metodológicas.....	67
3.2	Material vegetal	69
3.3	Extração e purificação dos metabólitos secundários.....	70
3.3.1	Extratos	70
3.3.2	Purificação dos compostos de <i>Piper scutifolium</i>	71
3.4	Metodologia sintética.....	73
3.4.1	Síntese de dienamidas	73

3.4.2	Síntese de cinamamidas	92
3.5	Atividade biológica	123
3.5.1	Ensaio antimicrobianos	123
3.5.2	Ensaio para inibidores de acetilcolinesterase	125
3.5.3	Ensaio larvídica contra carrapatos <i>Boophilus microplus</i>	126
3.5.4	Ensaio de citotoxicidade	126
3.6	Estabelecimento de plântulas e cultura de tecido <i>in vitro</i>	128
3.7	Incorporação de precursores marcados.....	130
3.8	Extração, purificação e caracterização de eupomatenóide-6-sintase de <i>Piper regnellii</i>	132
3.8.1	Objetivos	132
3.8.2	Extração de proteína total.....	132
3.8.3	Purificação da proteína.....	133
3.8.4	Síntese e purificação do (+) e (-)-conocarpano	136
4	Resultados e discussão	137
4.1	Metabólitos secundários de <i>Piper scutifolium</i> , <i>P. corcovadensis</i> e <i>P. tuberculatum</i>	137
4.1.1	<i>Piper scutifolium</i> e <i>P. corcovadensis</i>	137
4.1.2	<i>Piper tuberculatum</i>	154
4.2	Síntese de Dienamidas	159
4.3	Síntese de cinamamidas	167
4.4	Atividade Biológica	181

4.4.1	Ensaio contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> ..	181
4.4.2	Antimicrobiano contra <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	186
4.4.3	Inibição de acetilcolinesterase	188
4.4.4	Carrapaticida	191
4.4.5	Citotoxicidade.....	194
4.5	Plântulas e cultura de células <i>in vitro</i>	195
4.5.1	Aspectos gerais	195
4.5.2	Biossíntese de piperovatina, estudo de incorporação de <i>L</i> -fenilalanina-[U- ¹⁴ C] e de ácido acético-[1- ¹⁴ C].....	200
4.6	Purificação e caracterização de eupomatenóide-6-sintase	203
5	Conclusão e considerações finais	211
6	Bibliografia.....	215
7	APÊNDICE-A: Espectros de produtos naturais	247
8	APÊNDICE-B: Espectros dos compostos sintetizados.....	270
8.1	Dienamidas	270
8.2	Cinamamidas	302
9	Súmula curricular	360

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

1.1.1 BREVE HISTÓRIA

A química de produtos naturais, área na qual a presente tese se insere, tem sido um dos campos de maior importância para o desenvolvimento da química orgânica moderna. Seu objeto de estudo engloba todos os aspectos que envolvem esses produtos naturais produzidos por todos (ou a grande maioria) os seres vivos, e são comumente denominados de metabólitos secundários (Schreiber, 2005).

Relatos do uso das plantas e extratos vegetais para diversos fins são encontrados em todas as culturas, desde tempos remotos. Um exemplo historicamente importante é o caso de *Papaver somniferum* (papoula), conhecida por suas propriedades pelos assírios e sumérios, que a chamavam de *hul gil* (planta da alegria), desde 5000 a.C., (Pinto *et al.*, 2002; Theis e Lerda, 2003). A história da papoula, planta que produz a morfina e a codeína (Figura 1.2), ilustra claramente o desenvolvimento da química de produtos naturais. Se em uma etapa inicial envolve o uso de substâncias naturais pelo homem, na forma da planta *in natura* ou extratos de origem natural, desenvolve-se com a purificação dos "princípios ativos" e a determinação de suas estruturas (apenas de plantas são conhecida hoje mais de 200 mil estruturas). Numa etapa subsequente, a síntese de compostos de estrutura complexa, se realizada inicialmente para comprovar as estruturas propostas, hoje possibilita estudos da relação estrutura-atividade biológica. Um aspecto de grande importância é a compreensão de como esses compostos são biossintetizados nos diferentes seres vivos a partir de precursores mais simples como CO₂, H₂O e N₂. Igualmente importante é a compreensão de quais funções tais compostos teriam

assumido nos seres que os produzem e em sua relação ao meio em que vivem (Bentley, 1999; Dixon, 2001b; Cseke *et al.*, 2006; Hartmann, 2007).

Figura 1.1 *Papaver somniferum*, ilustração de Franz Eugen Köhler (1883-1914)

O surgimento da química de produtos naturais como ciência nos moldes atuais ocorreu no início do século XIX, associada ao nascimento da química orgânica em si, cujo marco foi o isolamento do primeiro produto de origem natural, a morfina (Figura 1.2 A), realizado por Friedrich Wilhelm Sertürner em 1806 (Sertürner, 1806). Esse foi um acontecimento marcante, sendo a primeira demonstração de que a atividade de uma planta poderia ser isolada e atribuída a uma substância, o princípio ativo.

Figura 1.2 Morfina (A) e codeína (B)

Outro passo crucial foi a ruptura do paradigma de que os compostos orgânicos possuíam ou necessitavam de uma “força vital” para que fossem obtidos e que, portanto, não poderiam ser obtidos artificialmente, mas apenas produzidos por seres vivos. A síntese da uréia, a partir do cianato de amônio, realizada por Wöhler em 1828, e aclamado inicialmente como a primeira demonstração de isomerismo, culminou por derrubar o vitalismo (Campaigne, 1955; Hartman, 1957; Cseke *et al.*, 2006). No caso da morfina, após ser isolada, sua estrutura complexa foi determinada apenas depois de 117 anos, em 1923, e a primeira síntese total foi realizada apenas em 1950.

Atualmente, a via biossintética que conduz à morfina, codeína e a outros alcalóides derivados benzilisoquinolínicos relacionados é uma das mais conhecidas em nível de substratos, enzimas e genes (Benyhe, 1994; Hartmann, 2007; Facchini e De Luca, 2008). Tal avanço no conhecimento das vias do metabolismo secundário é resultante da impressionante evolução de técnicas químicas, físicas e bioquímicas que permitem acessar esses processos nos níveis genético, enzimático e dos próprios metabólitos (Kutchan e Dixon, 2005; Zhong e Yue, 2005; Lange, 2006; Hartmann, 2007; Mahmud, 2007; Petersen, 2007; Sato *et al.*, 2007; Sekhon, 2008).

Uma das ferramentas fundamentais no estudo do metabolismo secundário foi

a utilização de precursores marcados isotopicamente, radioativos e estáveis. Na década de 30 já eram utilizados ^2H e ^{15}N em estudos revolucionários do metabolismo primário realizados por pesquisadores da Columbia University (Schoenheimer e Rittenberg, 1935; Bentley, 1985, 1999). No âmbito dos metabólitos secundários, o uso dessas técnicas explodiu partir da década de 50, principalmente devido à maior disponibilidade comercial de diversos produtos marcados com ^{14}C e ^3H . Isso permitiu avaliar sistematicamente propostas biossintéticas de diversos produtos naturais que eram resultantes da imaginação e especulação baseada em associações estruturais, e levou ao descobrimento e elucidação de vias metabólicas totalmente novas (Robinson, 1955; Battersby, 1996; Pinto *et al.*, 2002; Mahmud, 2007). Existiria uma melhor maneira de propor vias biossintéticas que não aquela baseada em mecanismos de reações orgânicas? Os testes de hipóteses têm sido feitos através do uso de isótopos radioativos como ^3H e ^{14}C e estáveis como ^2H , ^{18}O , ^{15}N e ^{13}C e possibilitaram definir precursores, seqüências de reações e mesmo mecanismos reacionais. As principais reações iônicas clássicas como S_{N} , adições à carbonila (aldol, Claisen e relacionadas), oxidorreduções; reações radicalares (acoplamento oxidativo e relacionados) e pericíclicas ([2+2] e [4+2] além de rearranjos sigmatrópicos) demonstram de forma clara a universalidade dos mecanismos da química orgânica (Thomas, 2004; McMurry e Begley, 2005; Cseke *et al.*, 2006).

Estudos relativos à biossíntese de isoprenóides constituem-se num ótimo exemplo da grande importância e impacto dessas técnicas. Nesses experimentos, que utilizaram de forma primorosa os marcadores isotópicos, foi descoberta uma rota metabólica totalmente nova, a via MEP (fosfato de metil eritriol) ou DOXP (fosfato de desoxixilulose). Trata-se de uma via alternativa à via do mevalonato,

conhecida desde a década de 60 em diversos organismos e tida como a única forma dos organismos produzirem essa classe de compostos (Eisenreich *et al.*, 2004; Mahmud, 2007). Experimentos baseados no uso de compostos contendo isótopos ^{13}C foram utilizados para observar o destino de cada carbono ao longo da biossíntese a partir de açúcares, acetato e piruvato (Figura 1.3) e notou-se, principalmente a partir da década de oitenta, a existência de problemas com o modelo biossintético proposto anteriormente. Os problemas eram a baixa ou nula incorporação dos precursores propostos e, principalmente, a incorporação dos isótopos em posições diferentes das esperadas pelo modelo, o que exigia uma reformulação dos mecanismos que levariam a formação dos compostos (Bard e Downing, 1981; Pandian *et al.*, 1981; Eisenreich *et al.*, 2004). Finalmente, Rohmer e colaboradores descobriram, inicialmente em eubactérias, uma via inteiramente nova que, posteriormente, foi observada em diversos organismos fotossintetizantes, como planta, algas e diatomáceas. Foi possível determinar completamente a nova via para formação de isoprenóides, com descrição de mecanismos e mesmo em termos de compartimentalização celular da mesma. (Rohmer *et al.*, 1993; Rohmer *et al.*, 1996; Schwender *et al.*, 1996; Arigoni *et al.*, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1997a; Lichtenthaler *et al.*, 1997b; Rohmer, 1999; Kuzuyama e Seto, 2003; Mahmud, 2007).

A enzimologia do metabolismo secundário, um nível organizacional acima dos metabólitos em si, é também uma área de extrema importância que se desenvolveu principalmente a partir da década 50, permitindo melhorar a produção de compostos de interesse ou melhorar o desenvolvimento de plantas. Porém, muito mais do que um incremento da produção, uma questão fundamental que se apresentava estava relacionada à compreensão dos fatores que afetam a seleção e evolução de uma determinada via biossintética e sua arquitetura. Apesar dos sucessos na purificação

de enzimas, como no caso da tirosina e fenilalanina amônia-liases em 1961 (Koukol e Conn, 1961; Neish, 1961), o estudo de enzimas do metabolismo secundário era considerado tarefa difícil devido a baixa concentração que estava associada à presença de taninos e compostos fenólicos com ação desnaturante sobre as mesmas (Pirie, 1959; Stahmann, 1963). Esses problemas foram em grande parte resolvidos com a introdução de resinas como polivinilpirrolidona (PVPP), que são capazes de remover de forma significativa os compostos fenólicos (Loomis e Battaile, 1966; Gray, 1978).

Figura 1.3 Padrão de incorporação de glicose, acetato, piruvato, e eritrose marcados com ^{13}C (ligações e carbonos em negrito) do mevalonato (A) e via alternativa do fosfato de metileritritol (B) (Rohmer *et al.*, 1993; Mahmud, 2007).

As técnicas de purificação das enzimas também foram aperfeiçoadas, permitindo a purificação de enzimas e os estudos para o reconhecimento dos substratos e possíveis co-fatores da reação. O processo de purificação das enzimas requer, frequentemente, um elevado número de etapas antes de resultar na

obtenção de uma enzima ou complexo enzimático responsável pela catálise da reação. Após esse processo, as mesmas são seqüenciadas e os genes correspondentes clonados. A clonagem é importante, pois com a expressão heteróloga torna-se possível obter a enzima em quantidade e pureza adequados para uma caracterização mais profunda de seu mecanismo, parâmetros cinéticos e estrutura (Esquema 1.1) (Cseke *et al.*, 2006)..

Esquema 1.1 Abordagem bioquímica para estudos biossintéticos

Além das técnicas mencionadas, outra ferramenta que tem contribuído de forma significativa para o estudo do metabolismo secundário são as culturas *in vitro*. Os sistemas *in vitro* fornecem um sistema mais simples, no qual o material celular é mais homogêneo e diversas variáveis podem ser controladas quando comparados com plantas diferenciadas, principalmente *in natura*. Outra vantagem associada ao potencial econômico é que, nos casos em que há a produção dos metabólitos de interesse, é possível ampliar facilmente a escala de produção (Chou, 1999; Verpoorte *et al.*, 2002; van der Heijden *et al.*, 2004; Basaran e Rodriguez-Cerezo,

2008; McCoy e O'Connor, 2008; Smetanska, 2008). Por outro lado, o uso dessa ferramenta possui algumas desvantagens: em alguns casos há uma baixa ou nula produtividade dos metabólitos secundários de interesse e há também as dificuldades intrínsecas à obtenção e manutenção das culturas que necessitam de condições estéreis e cuidados permanentes (Zenk, 1991; Verpoorte *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*, 2006; Smetanska, 2008).

Entretanto, em muitos casos, o uso dessa ferramenta mostrou-se muito promissor em estudos de bissíntese, e bons exemplos de sucesso são os trabalhos desenvolvidos por Zenk e colaboradores nos estudos de alcalóides benzilisoquinolínicos (que incluem a morfina e análogos) a partir do final da década de 70, com culturas de células de espécies de *Berberis* (Zenk *et al.*, 1985; Zenk, 1991). Esse e outros exemplos mostraram o potencial do uso de culturas celulares como ferramenta para a investigação de vias biossintéticas e também mostraram ser possível utilizá-las para a produção de compostos de interesse ou até mesmo para a obtenção das enzimas em si. Para a produção de metabólitos secundários é necessário que o composto tenha um alto valor para compensar os gastos, e uma estrutura complexa, cuja obtenção não seria viável por uma abordagem sintética.

Apesar de poucos os exemplos de produção comercial de substâncias utilizando cultura de células vegetais, pode-se citar a shikonina, um composto com atividade anti-HIV, antitumoral e antiinflamatória de *Lithospermum erythrorhizon* (primeiro composto produzido comercialmente a partir de culturas de células de plantas); o antitumoral paclitaxel (Taxol[®]), de *Taxus* spp; a escopolamina, anticolinérgico de *Duboisia* spp; protoberberinas de *Coptis japonica*, utilizadas como antibióticos e anti-inflamatórios, entre outros (Verpoorte *et al.*, 2002; Zhong e Yue, 2005; Basaran e Rodriguez-Cerezo, 2008; Kolewe *et al.*, 2008; McCoy e O'Connor,

2008; Smetanska, 2008).

Figura 1.4 Diferentes níveis do metabolismo: genes, enzimas e metabólitos

Os avanços da genômica vêm contribuindo para os estudos biossintéticos e aqueles que investigam a evolução e função do metabolismo. Esse passo abre portas para o estudo em outro nível organizacional, partindo do nível das micromoléculas, para as enzimas que as biossintetizam chegando finalmente ao nível dos genes que codificam as enzimas (Figura 1.4). Esse campo de estudos, na fronteira entre a biologia e a química, vem sendo desenvolvido rapidamente e o estudo do metabolismo secundário se voltou para a análise e manipulação do material genético dos organismos. Essas técnicas têm como grandes vantagens a estabilidade do ADN, quando comparado com as enzimas em si, e a facilidade de manipulação desse material com ferramentas bioquímicas eficazes e precisas. É possível trabalhar com quantidades muito pequenas de material, através do uso da reação em cadeia de polimerase (ou na sigla em inglês PCR), manipular esse material utilizando diferentes enzimas para alterar e determinar suas sequências e cloná-las em sistemas celulares para diversos fins.

Os estudos com genes do metabolismo secundário utilizam predominantemente duas abordagens. A primeira é a busca de sequências no ADN determinadas a partir da sequências das proteínas. Dessa forma utiliza-se a proteína

com sequência conhecida para propor as correspondentes sequências esperadas de ADN, o que é possível uma vez que são conhecidos os possíveis códons (trincas de bases nucleicas) para cada aminoácido. Utiliza-se então essa sequência deduzida para, utilizando o PCR, obter o gene correspondente e a sequência real.

O desenvolvimento de bancos de genes como o National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foi crucial para permitir a busca por enzimas pela outra via, diretamente no ADN. Essa técnica *in silico* é baseada na busca por homologia, ou semelhança. Com acesso às sequências de genes conhecidos é possível observar as regiões comuns a diferentes genes de uma determinada família. Assim a busca por PCR é baseada nos traços comuns, ou regiões conservadas, nessas famílias de genes.

Independente do caminho escolhido para se seqüenciar os genes, as sequências de bases obtidas por a amplificação de ADN por PCR são então inseridas em outros organismos como *Escherichia coli* para que esses produzam as enzimas, o que é chamado de expressão heteróloga. Dessa forma é possível obter quantidades maiores e com maior pureza da enzima para que sua atividade enzimática seja confirmada e estudos estruturais e mecanísticos mais profundos sejam realizados (Fridman e Pichersky, 2005; Cseke *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2008).

Assim, testemunha-se atualmente um período de compreensão do metabolismo, inclusive do secundário, sem precedentes (Figura 1.5). O conhecimento abrange todos os níveis do metabolismo secundário e nos permite uma visão mais completa dos organismos. Além disso, há uma revolução de escala, com técnicas modernas de sequenciamento em larga escala gerando um grande volume de dados. Diversas espécies tiveram o seu genoma completamente seqüenciado, inclusive de algumas espécies vegetais (como *Arabidopsis thaliana*

(Arabidopsis Genome Initiative, 2000), *Oryza sativa* (Sequencing Project International Rice, 2005) e, prestes a ter o sequenciamento completo, o *Eucalyptus* (Grattapaglia e Kirst, 2008). Com genomas inteiros disponíveis e inovações tecnológicas como “microarrays” ou chips de ADN, muitas questões passaram a ser abordadas de forma completamente diferente. Após o grande sucesso da genômica, os outros níveis do metabolismo estão sendo investigados na mesma escala “ômica”, a metabolômica (investigação do maior número possível de micromoléculas simultaneamente) e a proteômica (investigação do maior número de proteínas simultaneamente) (Dixon, 2001a; Fridman e Pichersky, 2005; Wong *et al.*, 2008).

Ao invés de buscar genes, enzimas ou metabólitos isoladamente, os organismos são analisados como um todo, com milhares, se não todos, os genes ou enzimas sendo investigados simultaneamente com o auxílio fundamental da bioinformática, que utiliza a informática moderna para analisar e compreender esse incrível volume de informações (Fridman e Pichersky, 2005; Cseke *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Sekhon, 2008). Segundo Richard Dixon:

“Genomics has fundamentally altered the way in which we view plant biology. The pre-genomics reductionist view (“I work on this pathway”) is being superceded by a new ability to take a global view of cellular processes” (Dixon, 2001a).

Chega-se a uma nova era em que o objetivo passou a ser a análise de organismos como um todo, uma visão holística (Hall, 2006), com a observação de vias metabólicas inteiras, como elas respondem a diferentes condições simultaneamente e da maneira pela qual as alterações genéticas modificam o metabolismo dos organismos como um todo, com resultados antes inimagináveis.

Figura 1.5 . Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas, esquema adaptado de (Dixon, 2001b). Os principais genes clonados e enzimas estão em itálico. *TDC*, *L*-triptofano descarboxilase; *TyDC*, *L*-tirosina descarboxilase; *CYP80B1*, *(S)*-*N*-metilcoclaurine-3'-hidroxilase; *PAL*, *L*-fenilalanina amônia-liase; *C4H*, cinamato 4-hidroxilase; *4CL*, 4-cumarato CoA ligase; *CHS*, chalcona sintase; *CHR*, chalcona redutase; *CHI*, chalcona isomerase; *STS*, estilbeno sintase; *ACC*, acetil CoA carboxilase; *DXPS*, 1-deoxi-xilulose 5-fosfato sintase; *HMGR*, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase; *SS*, sesquiterpeno sintase; *SqS*, squaleno sintase; *SqE*, squaleno epoxidase; *βAS*, *β*-amirina sintase; *2-HIS*, 2-hidroxiisoflavanona sintase; *IOMT*, isoflavona 4'-*O*-metiltransferase; *IFR*, isoflavona redutase.

1.1.2 ASPECTOS EVOLUTIVOS E ECOFISIOLÓGICOS

Uma das primeiras definições de produtos naturais foi dada por um dos pais da fisiologia vegetal, Julius Sachs, como “sub-produtos do metabolismo, formados pelo mesmo mas que não são utilizados na formação de novas células” (Sachs, 1874), e pode ser utilizado até hoje, apenas com a substituição de “sub-produto” por “metabólito secundário”. Esse nome, dado em contraposição ao metabolismo primário (essencial para o funcionamento dos organismos), ainda é utilizado atualmente, apesar da idéia de que essas substâncias sejam apenas restos metabólicos, produtos de destoxificação, de degradação ou de reserva ter sido abandonada (Swain, 1977; Haslam, 1985).

Com o aprimoramento recente de técnicas analíticas e bioquímicas aplicadas ao estudo de produtos naturais, o conhecimento a respeito não apenas da composição, mas também das funções de metabólitos secundários vem crescendo exponencialmente e uma das conseqüências é a compreensão cada vez maior de seu papel para os organismos e ecossistemas. Em face ao conhecimento acumulado até o presente, a noção de que os metabólitos secundários sejam sub-produtos, restos metabólicos ou até mesmo secundários não poderia permanecer incólume, uma vez que é comprovada a grande importância desses compostos para o desenvolvimento saudável, para o sucesso dos diversos organismos que os produzem e sendo em muitos casos a sua forma de interagir com o meio (Jones *et al.*, 1991; Dyer *et al.*, 2003; Theis e Lerda, 2003; Wink, 2003; Wink e Mohamed, 2003; Dyer *et al.*, 2004a; Dyer e Palmer, 2004; Boudet, 2007; Hartmann, 2007; Kato e Furlan, 2007; Beghyn *et al.*, 2008; Jenke-Kodama *et al.*, 2008; Sekhon, 2008).

É natural pensar, com base no modelo de seleção natural e evolução, aceito

hoje como principal processo para o surgimento das espécies com suas peculiaridades, que os metabólitos secundários devem proporcionar vantagens evolutivas, uma relação custo/benefício positiva que justifique a sua seleção e manutenção ao longo do processo evolutivo. Diversos estudos têm sido realizados a fim de se determinar a função e evolução dos metabólitos secundários dentro do contexto das complexas relações ecológicas, pressões bióticas e abióticas que moldam os diferentes organismos. Os metabólitos secundários podem conferir aos organismos que os produzem vantagens em termos de sua sobrevivência e reprodução, vantagens essas que devem compensar o custo energético inevitável de tais processos (Fraenkel, 1959; Williams *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1991; Wink, 2003)

As plantas são organismos que não se movem, não podem “fugir” de predadores, e também não possuem sistema imunológico para lidar com fungos, bactérias e vírus e assim desenvolveram um arsenal químico que atua como fagoinibidor, fungicida ou bactericida, por exemplo. Além de atuar como mecanismo de defesa, esses compostos atuam como aleloquímicos, afetando outras espécies, atraindo polinizadores e dispersores de sementes, promovendo desenvolvimento de microorganismos benéficos e também afetando outras plantas como inibidores da germinação ou mesmo fitotóxicas (Swain, 1977; Chou, 1999; Bourgaud *et al.*, 2001; Vyvyan, 2002; Scott *et al.*, 2003; Soumyanath *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2007a; Dholwani *et al.*, 2008; Felipe *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

Os mecanismos para atividade compostos podem ser considerados de três tipos fundamentais: 1) compostos que após se dissolverem e atravessarem a membrana celular se ligam à receptores intracelulares; 2) compostos que se ligam e alteram o funcionamento de proteínas que formam poros e canais; e 3) compostos

que se ligam a receptores extracelulares e desencadeiam uma cascata de sinais intracelulares (Jarvis, 2000). O processo evolutivo funcionaria então como uma modelagem molecular natural que selecionaria compostos que tem características estruturais correspondentes a esse modo de ação, muitas vezes como agonistas ou antagonistas a ligantes endógenos, *e.g.* diversos alcalóides que mimetizam neurotransmissores naturais (Wink *et al.*, 1998; Theis e Lerdau, 2003; Wink, 2003; Wink e Mohamed, 2003).

Esse modelo evolutivo que poderia ser chamado de “corrida armamentista” merece, entretanto, discussão mais profunda. Esperar-se-ia que o processo evolutivo resultasse em um número reduzido de compostos extremamente ativos, mas ao invés disso, o que se observa é um grande número de metabólitos secundários que em sua grande maioria possui atividade moderada ou baixa e baixa especificidade em termos de toxicidade. Tal fato pode ser explicado se for considerado que os organismos que possuem um “*pool*” de compostos, mesmo aqueles que não possuem atividade, poderiam em poucas etapas evolutivas resultar em novos compostos de maior complexidade e com maior probabilidade de possuírem algum grau de atividade (Jones *et al.*, 1991). Assim sendo, manter esse “*pool*”, dado o balanço de custo/benefício, seria uma vantagem considerável em comparação com um organismo hipotético que produz poucos compostos bioativos. Entretanto, ante a adaptação do predador, teria menos chances de desenvolver novos compostos ativos.

Partindo desse modelo pode-se também entender a grande ramificação e a organização em rede de vias metabólicas como a fenilpropanoídica (Weisshaar e Jenkins, 1998; Noel *et al.*, 2005). Organizada dessa forma pequenas modificações em enzimas do metabolismo secundário podem levar a enzimas que modificam todo

um grupo de metabólitos estruturalmente semelhantes levando a um grande número de compostos novos com um baixo custo. Além disso, esse tipo de organização é mais robusto de várias formas. No caso de perda da função original de um gene, por exemplo, com mais de uma rota possível para o mesmo produto os metabólitos ainda seriam produzidos e haveria um grande número de possíveis novos substratos para a nova enzima. Do mesmo modo o surgimento de um novo composto tem maior potencial, pois ele pode servir de substrato para enzimas preexistentes e gerar uma nova família de compostos (Jones *et al.*, 1991; Pichersky e Gang, 2000; Jenke-Kodama *et al.*, 2008).

Como parte do processo evolutivo das espécies, os metabólitos secundários são também estudados dentro da disciplina da quimiotaxonomia. Essa disciplina, que existe há 200 anos (Candolle, 1804; Abbott, 1896), utiliza-os como caracteres complementares aos morfológicos tradicionalmente utilizados (Hegnauer e Hegnauer, 1962; Harborne e Turner, 1984; Waterman e Gray, 1987). Apesar de sua importância em alguns casos, é observada a ocorrência de metabólitos iguais ou similares em espécies que são distantes do ponto de vista filogenético enquanto em outros casos há espécies muito próximas, mas que possuem perfis metabólicos divergentes. Esses fatos podem ser resultantes de evolução convergente em que as espécies culminam por elaborar os mesmos produtos paralelamente, sem necessariamente serem filogeneticamente relacionadas, ou da expressão diferencial das vias metabólicas (Wink e Witte, 1983). Recentes avanços na utilização da filogenia molecular tem se constituído numa oportunidade de reavaliar e discutir as similaridades e diferenças entre perfis metabólitos de determinadas espécies.

1.1.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

As plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade por diversas populações e com os mais diversos fins. Estima-se que cerca de 100.000 produtos naturais tenham sido descritos (Dixon, 2001b) e, sendo evolutivamente selecionados para interagir com alvos biológicos, devem ser considerados uma peça chave na busca de novos medicamentos e agroquímicos. Duas frentes utilizam mais amplamente produtos naturais: a farmacologia e a agroquímica. Ambas lidam com a incessante necessidade de inovação devido ao surgimento de resistência nos organismos alvo, o que torna necessário uma constante renovação dos compostos utilizados e, de preferência a descoberta de modos de ação e características estruturais completamente diferentes. Para isso, são necessários estudos bioorgânicos que envolvem elucidação estrutural, biossíntese, função biológica e estudos quanto a relação estrutura-atividade (Kiyota, 2006).

O mercado farmacêutico é, sem dúvida, grande usuário de produtos naturais. Cerca de 25% das substâncias utilizadas como medicamentos têm sua origem nas plantas; na verdade estima-se que cerca de 44% de todas as drogas tem como base produtos naturais, (Hostettmann e Marston, 2007). Bons exemplos são os alcalóides morfina e codeína, já citados, a vimblastina e a vincristina (Figura 1.6), isolados de *Catharanthus roseus* utilizados no combate ao câncer; o alcalóide paclitaxel (Taxol®) (Figura 1.6), isolado 1996 de *Taxus baccata*, também utilizado no combate ao câncer, como inibidor de microtubulina, um mecanismo desconhecido até sua descoberta e que abriu todo um novo leque de possibilidades no combate ao câncer; e o sesquiterpeno artemisinina (Figura 1.6), isolado de *Artemisia annua*, utilizado no tratamento da malária (Phillipson, 2007).

Figura 1.6 Taxol[®], artemisinina, vimblastina e vincristina

Os produtos naturais constituem-se ainda nas bases para o desenvolvimento de pesticidas, aromatizantes e corantes que juntos, contribuem de forma significativa para a economia global. No caso de agroquímicos de origem vegetal, o grande potencial está associado ao desenvolvimento de inseticidas. Muito em função da diversidade de fatores associados às pressões evolutivas, as plantas possuem um amplo leque de compostos que apresentam atividade inseticida (Blagbrough *et al.*, 1992; Adedire, 2002; Scott *et al.*, 2005; Gragasin *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007; Simas *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008). Apesar da produção de extratos vegetais para uso em larga escala ser competitivamente problemática (Rice *et al.*, 1998), os produtos de origem natural são frequentemente biodegradáveis e menos agressivos que defensivos sintéticos muitas vezes persistentes. Possuem, portanto, grande potencial de crescimento no mercado de produtos orgânicos e ecológicos (Medeiros

e Gonçalves, 2007). Um bom exemplo é o óleo da árvore de neem (*Azadirachta indica*) que possui importante inseticida e vem sendo amplamente utilizado, inclusive no Brasil (Ahmed e Grainge, 1986; Schmutterer, 1990).

Os produtos naturais com atividade biológica, envolvidos como mediadores de muitas interações entre organismos são denominados aleloquímicos (Harborne, 2001). Assim, a ecologia química vem contribuindo para a descoberta de compostos que possuem grande potencial para o mercado de agroquímicos, principalmente herbicidas. Um exemplo é a leptospermona (Figura 1.7), composto isolado de *Leptospermum scoparium*, e que inspirou alguns herbicidas amplamente utilizados como sulcotriona e mesotriona (Figura 1.7) (Vyvyan, 2002; Bonnet *et al.*, 2008).

Figura 1.7 Estruturas dos herbicidas leptospermona (A), sulcotriona (B) e mesotriona (C)

Por último, destacam-se os óleos essenciais que são sem dúvida um dos produtos mais antigos de origem vegetal com importância econômica, utilizados como flavorizantes e aromatizantes. Espécies vegetais produzem uma vasta gama de monoterpenos que são amplamente utilizados devido a seus aromas característicos. Na Figura 1.8 temos alguns exemplos monoterpenos amplamente utilizados: o mentol é isolado de diversas espécies de menta e que lhes confere o aroma característico; a cânfora é o principal componente do óleo de alecrim; o linalol é o principal componente do óleo de pau rosa *Aniba* spp que é utilizado no famoso

perfume Channel nº 5; o eucaliptol é o principal componente do óleo de eucalipto; lavandulol é o principal componente do óleo de lavanda e o safranal é o principal responsável pelo odor do açafrão.

Figura 1.8 Monoterpenos de importância econômica

1.2 O GÊNERO *PIPER*

1.2.1 HISTÓRIA NATURAL

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, da ordem Piperales, do grupo super-ordinal Magnoliides. A ordem Piperales é considerada uma das mais primitivas famílias de Angiospermas, pertencendo ao conjunto chamado de angiospermas basais (Taylor e Hickey, 1992). Morfologicamente as espécies de *Piper* são relativamente uniformes, com folhas simples e alternadas e apresentando caules divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram-se com mais facilidade, semelhantes aos nodos observados em bambus ou na cana de açúcar (Dyer e Palmer, 2004). Também são características suas inflorescências que geram espigas ou infrutescências, como pode ser observado em *P. nigrum* (Figura 1.9), provavelmente o membro mais conhecido do gênero.

Figura 1.9 *Piper nigrum*, ilustração de feita por Franz Eugen Köhler (1883-1914)

Suas espécies são geralmente arbustivas e herbáceas, porém ocorrem em diversas formas, sendo observadas também pequenas árvores ou vinhas. As espécies ocorrem comumente em vales e região de sub-bosques quentes e úmidos, comumente sendo seu elemento dominante (Jaramillo e Manos, 2001; Dyer e Palmer, 2004).

O gênero *Piper* possui cerca de 2000 espécies identificadas (Wanke *et al.*, 2007), o que o faz o maior das angiospermas basais, distribuídas por ambos os hemisférios nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1.10) (Sengupta e Ray, 1987; Parmar *et al.*, 1997; Jaramillo e Manos, 2001).

Figura 1.10 Distribuição geográfica do gênero *Piper*

Ecologicamente o gênero *Piper* é de grande importância. Diversos insetos são intimamente relacionados a espécies de *Piper*, o que já levou a diversos estudos de relação planta-inseto, em que foram observados predação, seqüestro e biotransformação de metabólitos secundários, relações de competição e predação bem como mutualísticas com vantagens para ambos (de Figueiredo e Sazima, 2000; Fischer *et al.*, 2002; Dyer *et al.*, 2003; Novotny *et al.*, 2003; Dyer e Palmer, 2004; Ramos *et al.*, 2008; Vanin *et al.*, 2008). Além de suas relações com insetos, aves e

morcegos se alimentam de seus frutos sendo considerados fundamentais para a dispersão de suas sementes (Figura 1.11) (Fleming, 1981; Palmeirim *et al.*, 1989; Bizerril e Raw, 1998; Zanon e Reis, 2007).

Figura 1.11 Morcego prestes a se alimentar de um fruto de *Piper aduncum* (Merlin D. Tuttle/Bat Conservation International)

Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina tradicional de diversas partes do mundo. Os casos mais conhecidos incluem *Piper nigrum*, a famosa pimenta do reino, utilizada amplamente nas culturas chinesa e indiana para diversos fins; *P. longum* e *P. methysticum* por suas propriedades medicinais, que incluem a utilização como medicamento para dores de estômago, ansiolíticos (*P. methysticum*) (Whitton *et al.*, 2003) e até para o tratamento de reumatismo e artrite (*P. futokadsura*) (Konishi *et al.*, 2005). O LQPN do IQ-USP tem investigado a presença de substâncias antifúngicas em diversas espécies de Piperaceae. Os dados obtidos até o presente incluem amidas antifúngicas em *P. hispidum* (Alecio *et*

al., 1998) *P. tuberculatum* (Navickiene *et al.*, 2000) e *P. arboreum* (da Silva *et al.*, 2002), ácidos benzóicos prenilados em *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999), flavanonas e hidroquinonas de *P. crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003), cromenos de *Peperomia serpens* (Kitamura *et al.*, 2006) e piperolídeos de *P. malacophyllum* (Lago *et al.*, 2005).

Essas espécies são muitas vezes chamadas de “paleoervas”, teriam surgido no início do desenvolvimento das Angiospermas como se pode observar na mais atual classificação filogenética de angiospermas apresentada pelo grupo The Angiosperm Phylogeny Group (APG), que realizou um levantamento e atualização da classificação de espécies de angiospermas utilizando informações obtidas com seqüenciamento e análise de determinadas regiões do ADN de diversas espécies. Nessa classificação a ordem Piperales encontra-se no clado magnoliidee e esse, somado à ordem Chloranthaceae e todas as monocotiledôneas formam um grupo monofilético, também chamado de não-eudicotiledônea (Soltis *et al.*, 2000). Esse grupo seria o grupo basal, do qual teriam surgido as eudicotiledôneas.

Figura 1.12 Relação de ordens e algumas famílias de Angiospermas suportadas por frequências de jackknife ou bootstrap acima de 50% apresentadas por APG (APG, 2003)

Os trabalhos desenvolvidos ao longo desse doutoramento foram espécies nativas da América do Sul, mais especificamente duas endêmicas à mata Atlântica, *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis*, e uma da mata Atlântica e Amazônia, a *P. tuberculatum*. As duas primeiras são também conhecidas como falso jaborandi, e são utilizadas na região da costa norte paulista e sul fluminense principalmente no combate a dor de dentes. De fato, a espécie *P. scutifolium* começou a ser estudada após ser apresentada como erva utilizada por um “mateiro” de Ubatuba, no litoral norte paulista. A espécie é utilizada para o tratamento de dores de dente, devido ao seu potente efeito de adormecimento da boca, quando suas raízes são mascadas. O material vegetal analisado preliminarmente, raízes secas, foi obtido após um período de cerca de 2 anos e, após novos contatos com membros da comunidade local que fazem uso tradicional dessa espécie, iniciou-se o estudo.

1.2.2 FITOQUÍMICA

O gênero *Piper* é um dos mais estudados fitoquimicamente, o que é compreensível em função de sua grande abundância nas regiões tropicais e seu amplo uso em culturas tradicionais, para os mais diversos fins, principalmente por suas propriedades medicinais, que incluem a utilização como medicamento para dores de estômago, ansiolíticos (*P. methysticum*) (Whitton *et al.*, 2003), contra picadas de cobra (*P. amalago*, *P. auritum* e *P. peltatum*) (Coe e Anderson, 2005) e para o tratamento de reumatismo e artrite (*P. futokadsura*) (Konishi *et al.*, 2005), entre outros.

O potencial dessas espécies pode ser constatado pela enorme variedade de compostos bioativos isolados de suas espécies. Nesse âmbito, destacam-se os compostos que possuem atividade antifúngica, principalmente amidas (Alecio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2007) e ácidos benzóicos prenilados (Baldoqui *et al.*, 1999). Também são descritas amidas inseticidas (Batista-Pereira *et al.*, 2006; Barbieri Jr *et al.*, 2007; Navickiene *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2008) e antitumorais (Bezerra *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2008a; Bezerra *et al.*, 2008d; Matsuda *et al.*, 2008), lignanas tetraidrofurânicas e cromenos com atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (Martins *et al.*, 2003; Batista Jr *et al.*, 2008), e outras atividades (Chen *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Srinivasan, 2007; Xia *et al.*, 2007; Bezerra *et al.*, 2008b; Matsuda *et al.*, 2008; Tabopda *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008)

Apesar de poucas espécies terem importância comercial e apenas 10 % de suas espécies terem sido investigadas fitoquimicamente (Dyer e Palmer, 2004), das espécies de *Piper* foram isoladas um número muito grande de compostos com grande diversidade estrutural, incluindo representantes de alcalóides, amidas,

propenilfenóis, lignanas, neolignanas, pironas, chalconas, flavonas, flavanonas entre outros (Sengupta e Ray, 1987; Parmar *et al.*, 1997; Parmar *et al.*, 1998; Dyer e Palmer, 2004; Kato e Furlan, 2007) (Tabela 1-1 e Tabela 1-2).

Tabela 1-1 Alguns compostos isolados de espécies de *Piper*

Alcalóides	Atividade biológica	Ocorrência	Referências
<p>Piperolactama C</p>	Citotóxica	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. arborens</i> <i>P. argyrophyllum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i> var. <i>tonkinense</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. scutifolium</i> <i>P. taiwanense</i> <i>P. umbellatum</i>	(Olsen <i>et al.</i> , 1993; Singh <i>et al.</i> , 1996; Chen <i>et al.</i> , 2004; Xiao e Pan, 2004; Tsai <i>et al.</i> , 2005; Chaves <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et al.</i> , 2007; Ee <i>et al.</i> , 2008; Tabopda <i>et al.</i> , 2008)
<p>Stigmatalactama</p>	Citotóxica	<i>P. boehmeriaefolium</i>	(Xiao <i>et al.</i> , 2005)
<p>Cefaradiona A</p>	Citotóxica Danificação de ADN	<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. lolot</i> <i>P. caninum</i>	(Gupta <i>et al.</i> , 1999; Ma <i>et al.</i> , 2004b; Li <i>et al.</i> , 2007)
<p>5,6-dihidropiridin-2(1H)-ona</p>		<i>P. arborescens</i> <i>P. sintenense</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2003; Tsai <i>et al.</i> , 2005)
<p>Dímero de Piplartina A</p>	Citotóxica	<i>P. arborescens</i> <i>P. rugosum</i> <i>P. tuberculatum</i>	(Filho <i>et al.</i> , 1981; Duh <i>et al.</i> , 1990b; Maxwell e Rampersad, 1991; Lee <i>et al.</i> , 2004)
Fenilpropanóides	Atividade biológica	Ocorrência	Referências
<p>Dilapiol</p>	Inseticida Antimicrobiano	<i>P. aduncum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. hispidinervum</i> <i>P. regnellii</i>	(Orjala <i>et al.</i> , 1993a; Benevides <i>et al.</i> , 1999; Estrela <i>et al.</i> , 2006; Rafael <i>et al.</i> , 2008; Guerrini <i>et al.</i> , 2009)
<p>Elemicina</p>	Antimicrobiana	<i>P. banksii</i> <i>P. futokadsura</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>P. marginatum</i>	(Loder e Nearn, 1972; Ramos <i>et al.</i> , 1986; Ekundayo <i>et al.</i> , 1988; Mundina <i>et al.</i> , 2001; Jirovetz <i>et al.</i> , 2002;

Safrol	Antimicrobiana Antioxidante	<i>P. nigrum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. aduncum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. betle</i> <i>P. guineese</i>	Konishi <i>et al.</i> , 2005) (Oyedeji <i>et al.</i> , 2005; McBurnett <i>et al.</i> , 2007; Mohottalage <i>et al.</i> , 2007; Andrade <i>et al.</i> , 2008; Guerrini <i>et al.</i> , 2009)
Lignanas e Neolignanas	Atividade biológica	Ocorrência	Referências
Sesamina	Antioxidante Reno-protetora Antileishmania	<i>P. cubeba</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. refractorum</i>	(Banerji e Dhara, 1974; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007)
(-)-Grandisina	Tripanomicida	<i>P. solmsianum</i>	(Ma <i>et al.</i> , 1991; Martins <i>et al.</i> , 2000; Martins <i>et al.</i> , 2003)
(-) cubebina	Antifúngica Anti-histamínica Anti-inflamatória Tripanomicida	<i>P. cernuum</i> <i>P. clusii</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. trichostachyon</i>	(Koul <i>et al.</i> , 1983; Koul <i>et al.</i> , 1988b; Coimbra <i>et al.</i> , 2004; Danelutte <i>et al.</i> , 2005; De Souza <i>et al.</i> , 2005; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Hirata <i>et al.</i> , 2008)
Fargesina	-	<i>P. brachystachyum</i> <i>P. longum</i> <i>P. mullesua</i>	(Koul <i>et al.</i> , 1988a; Srivastava <i>et al.</i> , 1999)
Conocarpano	Tripanomicida Antifúngica	<i>P. decurrens</i> <i>P. fulvescens</i> <i>P. pallescens</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solsianum</i>	(De Moreira <i>et al.</i> , 1995; Chauret <i>et al.</i> , 1996; Freixa <i>et al.</i> , 2001; Pessini <i>et al.</i> , 2005; Luize <i>et al.</i> , 2006; Campos <i>et al.</i> , 2007)
Eupomatenóide-6	Tripanomicida Antifúngica	<i>P. decurrens</i> <i>P. fulvescens</i> <i>P. pallescens</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solsianum</i>	(De Moreira <i>et al.</i> , 1995; Chauret <i>et al.</i> , 1996; Freixa <i>et al.</i> , 2001; Pessini <i>et al.</i> , 2005; Luize <i>et al.</i> , 2006; Campos <i>et al.</i> , 2007)
Futoquinol	Anti-inflamatória	<i>P. futokadsura</i> <i>P. kadsura</i> <i>P. schimidtii</i>	(Strickler <i>et al.</i> , 1989; Chen <i>et al.</i> , 1993; Tyagi <i>et al.</i> , 1993; Lin <i>et al.</i> , 2006)
Kavapironas e piperolídeos	Atividade biológica	Ocorrência	Referências

<p>Cavaína</p>	<p>Ansiolítica Antitrombótica Atenuação da contratilidade vascular Leishmanicida</p>	<p><i>P. methysticum</i> <i>P. rusbyi</i></p>	<p>(Gleitz <i>et al.</i>, 1997; Smith <i>et al.</i>, 2001; Martin <i>et al.</i>, 2002; Whitton <i>et al.</i>, 2003; Flores <i>et al.</i>, 2007b)</p>
<p>Metisticina</p>	<p>Hepatotóxica Herbicida Antifúngica Ansiolítica</p>	<p><i>P. methysticum</i></p>	<p>(Smith <i>et al.</i>, 2001; Xuan <i>et al.</i>, 2006; Fu <i>et al.</i>, 2008)</p>
<p>Piperolídeo</p>	<p>Antibacteriano</p>	<p><i>P. sanctus</i></p>	<p>(Mata <i>et al.</i>, 2004)</p>
<p>Cromenos</p>
<p>2,2-dimetil-8-(3-metilbut-2-enil)croman-6-carboxilato de metila</p>	<p>Tripanomicida Antifúngica</p>	<p><i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. aduncum</i></p>	<p>(Morandim <i>et al.</i>, 2005; Batista Jr <i>et al.</i>, 2008)</p>
<p>2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de metila</p>	<p>Antifúngica</p>	<p><i>P. mollicomum</i> <i>P. lhotzkyanum</i></p>	<p>(Lago <i>et al.</i>, 2007)</p>
<p>Flavonas e Flavanonas</p>
<p>Pinostrobin</p>	<p>Inseticida</p>	<p><i>P. guanacastensis</i> <i>P. hostmannianum</i> var. <i>berbicense</i> <i>P. methysticum</i></p>	<p>(Pereda-Miranda <i>et al.</i>, 1997; Portet <i>et al.</i>, 2008; Xuan <i>et al.</i>, 2008)</p>
<p>2',6'-diidróxi-4'-metoxichalcona</p>	<p>Antifúngica Leishmanicida</p>	<p><i>P. aduncum</i> <i>P. mollicomum</i> <i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. marginatum</i></p>	<p>(Lago <i>et al.</i>, 2007; Reigada <i>et al.</i>, 2007)</p>

*Amidas são contempladas em mais profundidade na Tabela 1-2

1.3 AMIDAS DE *PIPER*

1.3.1 OCORRÊNCIA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Apesar de o gênero *Piper* apresentar uma composição fitoquímica muito diversificada, as amidas são provavelmente a classe de compostos mais característica de suas espécies. A mais conhecida, piperina (Figura 1.13), foi a primeira amida a ser isolada, de *P. nigrum* (Parmar *et al.*, 1997). Essa espécie, a pimenta do reino, é a mais conhecida devido a sua grande importância econômica, sendo a piperina responsável pelo sabor pungente característico e responsável por seu uso como condimento.

Figura 1.13 Piperina

Além de piperina muitas outras amidas foram isoladas de espécies de *Piper*, e vêm mostrando um considerável potencial no que diz respeito à atividade biológica (Greger, 1984; Alecio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2002). Constituem-se, portanto, em um bom foco para pesquisas dentro da química de produtos naturais. Diversas espécies de Piperaceae, cultivadas nos viveiros do LQPN do Instituto de Química da USP, apresentam em sua composição diversas amidas, em especial as espécies *P. tuberculatum*, *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis*. As espécies produtoras de amidas podem ser identificadas em campo pelo gosto marcante e, em alguns casos, uma potente atividade anestésica local (da Silva *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Felipe *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2007).

Esses compostos possuem ocorrência ampla e são inúmeros os casos em que compostos dessa classe possuem atividade biológica. Constata-se que amidas com diversas características estruturais foram isoladas de espécies de *Piper* sendo a classe de compostos mais característicos do gênero, o que pode ser atestado, em muitos casos, mesmo pelo nome dado a muitas delas (Tabela 1-2).

Tabela 1-2 Amidas de origem vegetal e atividade biológica

Composto	Atividade	Origem	Referência
<p>Piperina</p>	Inseticida, Estimulante de Proliferação de Melanócitos Antitumoral Tripanomicida Antimicrobiana Imunomodulatória Antiinflamatória	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. album</i> <i>P. argyrophylum</i> <i>P. attenuatum</i> <i>P. aurantiacum</i> <i>P. betle</i> <i>P. callosum</i> <i>P. chaba</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hancei</i> <i>P. khasiana</i> <i>P. longum</i> <i>P. macropodium</i> <i>P. nepalense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. novae hollandiae</i> <i>P. nudibaccatum</i> <i>P. peepuloides</i> <i>P. ponesheense</i> <i>P. puberullum</i> <i>P. puberulilimum</i> <i>P. pubicatum</i> <i>P. refractorum</i> <i>P. semiimmersum</i> <i>P. spirei</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. tuberculatum</i> Jack	(Gupta <i>et al.</i> , 1972; Banerji e Dhara, 1974; Patra e Ghosh, 1974; Addae-Mensah <i>et al.</i> , 1977; Jong-Woong <i>et al.</i> , 1992; Narui <i>et al.</i> , 1995; Parmar <i>et al.</i> , 1997; Wu <i>et al.</i> , 1997; Lee <i>et al.</i> , 2001; Stöhr <i>et al.</i> , 2001; Scott <i>et al.</i> , 2002; Wei <i>et al.</i> , 2002; Zhou <i>et al.</i> , 2002; Ribeiro <i>et al.</i> , 2004; Sunila e Kuttan, 2004; Lee <i>et al.</i> , 2005; Bezerra <i>et al.</i> , 2006; Jensen <i>et al.</i> , 2006; Lin <i>et al.</i> , 2007b; Bezerra <i>et al.</i> , 2008a; Matsuda <i>et al.</i> , 2008)
<p>Piperovatina</p>	Inseticida Piscicida Anti-inflamatória Anestésica Bactericida Carrapaticida	<i>P. alatabaccum</i> <i>P. callosum</i> <i>P. laetispicum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. piscatorum</i> <i>P. scutifolium</i> <i>Ottonia frutescens</i> <i>Ottonia martiana</i> <i>Ottonia propinqua</i>	(Costa e Mors, 1981; Pring, 1982; Makapugay <i>et al.</i> , 1983; McFerren e Rodriguez, 1998; Antunes <i>et al.</i> , 2001; McFerren <i>et al.</i> , 2002; Zhou <i>et al.</i> , 2002; Cunico <i>et al.</i> , 2004; Facundo <i>et al.</i> , 2004; Facundo <i>et al.</i> , 2005; Cunico <i>et al.</i> , 2006; Jensen <i>et al.</i> , 2006; Fang <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2008)

<p>n=0: piperetina n=2: retrofractamida A n=3: retrofractamida D (norpiperetina) n=4: retrofractamida C (piperetina) n=6: guineensina n=8: brachistamida-B n=9: brachistamida-D</p>	Inseticida	<i>P. austrosinense</i> <i>P. brachystachyum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. refractorum</i>	(Okogun e Ekong, 1974; Banerji <i>et al.</i> , 1985; Banerji e Das, 1989; Strunz e Finlay, 1994; Parmar <i>et al.</i> , 1997; Lin <i>et al.</i> , 2007a)
<p>Sarmentosina</p>	Antituberculose Antiplasmodial Larvicida	<i>P. nigrum</i> <i>P. sarmentosum</i> <i>P. sintenense</i>	(Kiuchi <i>et al.</i> , 1988; Chen <i>et al.</i> , 2002; Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2004)
<p>(2E,4E,6E)-7-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-1-(pirrolidin-1-il)hepta-2,4,6-trien-1-ona</p>	Antituberculose Antiplasmodial	<i>P. sarmentosum</i> <i>P. trichostachyon</i>	(Singh <i>et al.</i> , 1974; Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2004)
<p>Piplartina</p>	Antitumoral	<i>P. arborens</i> <i>P. divaricatum</i> <i>P. sylvaticum</i>	(Banerji e Dhara, 1974; Tsai <i>et al.</i> , 2005; Bezerra <i>et al.</i> , 2008d)
<p>N-(3-fenilpropanoil)pirrol</p>		<i>P. sarmentosum</i>	(Likhitwitayawuid <i>et al.</i> , 1987)
<p>Pelitorina</p>	Inseticida Controle de colesterol (inibidor da enzima ACAT) Antituberculose	<i>P. chaba</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. lolot</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. tuberculatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. sarmentosum</i>	(Okogun <i>et al.</i> , 1977; Bari <i>et al.</i> , 1990; Connolly <i>et al.</i> , 1995; Das <i>et al.</i> , 1998; Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2004; Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2007; Navickiene <i>et al.</i> , 2007; Rho <i>et al.</i> , 2007)
<p>N-feruloiltiramina</p>	Antiagregatório de plaquetas	<i>P. argyrophylum</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. lolot</i> <i>P. nigrum</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1980; Singh <i>et al.</i> , 1996; Friedrich <i>et al.</i> , 2005; Li <i>et al.</i> , 2007)
<p>Taiwanamida C</p>	Anti-agregação de plaquetas	<i>P. taiwanense</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2004)

<p>Aduncamida</p>	Citotóxica Antibacteriana	<i>P. aduncum</i>	(Orjala <i>et al.</i> , 1993b)
<p>2-(etilamino)-4,5-dihidroxibenzamida</p>	Antioxidante Antimicrobiano	<i>P. nigrum</i>	(Pradhan <i>et al.</i> , 1999; Chatterjee <i>et al.</i> , 2007)
<p>Corcovadina</p>	Antifúngica	<i>Ottonia corcovadensis</i> <i>P. scutifolium</i>	(Costa e Mors, 1981; Marques <i>et al.</i> , 2007)
<p>Piperlonguminina</p>	Antifúngica Antitumoral Anti-inflamatória Anti-oxidase Inseticida Bactericida	<i>Ottonia corcovadensis</i> <i>P. amalago</i> <i>P. divaricatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hancei</i> <i>P. laetispicum</i> <i>P. longum</i> <i>P. nepalense</i> <i>P. scutifolium</i> <i>P. tuberculatum</i>	(Chatterjee e Dutta, 1967; Gupta <i>et al.</i> , 1972; Okogun e Ekong, 1974; Costa e Mors, 1981; Bernard <i>et al.</i> , 1995; Narui <i>et al.</i> , 1995; Parmar <i>et al.</i> , 1998; Reddy <i>et al.</i> , 2001; Srinivasa Reddy <i>et al.</i> , 2001; Stöhr <i>et al.</i> , 2001; Morikawa <i>et al.</i> , 2004; Fang <i>et al.</i> , 2007; Marques <i>et al.</i> , 2007; Navickiene <i>et al.</i> , 2007; Bezerra <i>et al.</i> , 2008c; Bezerra <i>et al.</i> , 2008d; Silva <i>et al.</i> , 2008)
<p>1-(3,4-Dimetoxi-α,β-diidrocinamoil)pirrol</p>	-	<i>P. brachystachyum</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 1998)

As amidas isoladas de *Piper* possuem algumas características estruturais em comum. Constata-se uma grande ocorrência de amidas isobutílicas, sendo que em muitos casos esses compostos apresentam também potente atividade biológica contra insetos, fungos, entre outras (Addae-Mensah *et al.*, 1977; Inatani, 1981; Crombie *et al.*, 1987; Banerji e Das, 1989; Horsham *et al.*, 1989; Gbewonyo e Candy, 1992; Bernard *et al.*, 1995; Stohr *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2003; Siddiqui *et al.*, 2003; Navickiene *et al.*, 2007).

Cinamamidas apresentam também um amplo leque de atividades biológicas

relatadas na literatura, mostrando-se relacionada com diversos processos biológicos. Como em outros casos a seleção dessa classe de compostos nas diversas espécies poderia ser associada a sua capacidade de afetar processos biológicos. Relatos mostram que elas possuem atividades relacionadas a diversas enzimas, como antagonistas de receptores relacionados a processos inflamatórios (Greenspan *et al.*, 1999; Debnath *et al.*, 2003), inibidores de α -glucosidase (Phuwapraisirisan *et al.*, 2008), inibidores de β -cetoacil-ACP redutases e de 17 β -hidroxiesteróide desidrogenases (Greger *et al.*, 1992; Gobec *et al.*, 2004; Kristan *et al.*, 2006). Também é descrita atividade alelopática, com efeito sobre a germinação e crescimento de outras plantas (Cutillo *et al.*, 2003; DellaGreca *et al.*, 2006), anti-oxidante (Kang *et al.*, 2008), antimicrobiana (Greger *et al.*, 1992; da Silva *et al.*, 2002; Narasimhan *et al.*, 2004) e até com atividade de cisão de ADN (Ma *et al.*, 2004a).

As observações feitas até agora suportam a visão de metabólitos secundários como produtos da evolução que age produzindo uma vasta gama de compostos “promíscuos”, que podem interagir com diversas enzimas ou alvos bioquímicos em potencial. Os metabólitos secundários seriam, dessa forma, positivos do ponto de vista custo/benefício e assim recrutados (Pichersky e Gang, 2000; Wink, 2003; Hartmann, 2007; Macías *et al.*, 2007).

Todos esses aspectos devem ser considerados quando se buscam novas drogas ou agroquímicos. Devido à baixa especificidade na maioria dos casos, produtos naturais são indicados como ponto de partida na busca de compostos bioativos para, com base nesses, desenvolver compostos de maior especificidade e potência para os fins desejados (Wink, 2003). Assim, muitos são os exemplos de fármacos e agroquímicos que são baseados em compostos de origem natural e

também de estudos que buscam exemplos na natureza para novos e eficazes compostos sintéticos.

1.3.2 ESTRATÉGIAS SINTÉTICAS

Em função da variedade de atividades biológicas, muitos estudos foram realizados visando à síntese de amidas insaturadas análogas a amidas naturais de espécies de *Piper*. Muitos desses estudos, como o presente, foram realizados visando a síntese de compostos para avaliação de sua atividade biológica. Como muitas amidas apresentaram atividade inseticida, em diversos casos os estudos realizados visavam a avaliação de atividade biológica inseticida (Crombie *et al.*, 1987; Strunz e Finlay, 1994; Strunz e Finlay, 1996; Abarbri *et al.*, 1998; de Paula *et al.*, 2000; De Araújo Jr *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2004; Venkatasamy *et al.*, 2004; Batista-Pereira *et al.*, 2006; Barbieri Jr *et al.*, 2007).

A síntese de amidas envolve tipicamente reações de baixa complexidade e já amplamente estudadas. A formação da amida normalmente é obtida pela reação de aminas com cloretos de acila formados a partir dos ácidos de interesse (Figura 1.14). Etapas sintéticas de maior complexidade são necessárias na síntese de amidas análogas àquelas isoladas de espécies de *Piper* geralmente estão relacionadas à formação da cadeia lateral e a introdução de insaturações. Geralmente, para tal fim, são utilizadas reações do tipo Wittig, envolvendo fosfonatos ou sais de fosfônio (Figura 1.15)(Dyer *et al.*, 2004b).

Figura 1.14 Abordagem tradicional para a obtenção de amidas

Figura 1.15 Abordagem utilizada tipicamente para introdução de insaturações

A piperina, devido ao seu valor comercial e às diversas atividades biológicas descritas, foi alvo de diversos estudos sintéticos visando não apenas a sua obtenção como a de análogos é um bom exemplo de abordagens para a síntese dessa classe de compostos. O primeiro a sintetizar a piperina foi Rügheimer (Rügheimer, 1882), que realizou a condensação do cloreto de acila do ácido pipérico (obtido a partir da hidrólise da piperina) com piperidina, a fim de confirmar sua estrutura. Essa abordagem também é utilizada em alguns casos (de Paula *et al.*, 2000)

Figura 1.16 Abordagem utilizada por Rügheimer na primeira síntese da piperina e ainda utilizada para obtenção de análogos

A síntese da piperina a partir do piperonal foi realizada em 1979 (Tsuboi e Takeda, 1979) utilizando um procedimento em 3 etapas passando por um rearranjo sigmatrópico [3,3], formando a piperina e a isochavicina (seu isômero *E-Z*) em uma

proporção de 2:1 (Figura 1.17) (Tsuboi e Takeda, 1979).

Figura 1.17 Abordagem de Tsuboi e Takeda para síntese de piperina

Outra abordagem interessante utilizada por Chandrasekhar foi a reação de tosilidrazonas com reagente de Grignard adequado, gerando a piperina em 3 etapas e com bom rendimento (Figura 1.18) (Chandrasekhar *et al.*, 2000).

Figura 1.18 Abordagem utilizada por Chandrasekhar para a síntese da piperina

Como mencionado, a abordagem mais utilizada e que leva a produtos com

alto rendimento e estereoquímica específica utiliza como material de partida o aldeído de interesse e utiliza a reação Wittig ou a modificação de Homer-Wadsworth-Emmons. É seguida de uma reação de saponificação do éster obtido e, por fim, há a formação da amida pela reação do cloreto de acila com aminas de interesse. Essa abordagem já foi utilizada em diversos estudos com ótimos resultados (Olsen e Spessard, 1981; Strunz e Finlay, 1994; De Araújo Jr *et al.*, 1999; Koul *et al.*, 2000; Banerji *et al.*, 2002; Seung *et al.*, 2005).

As amidas derivadas do ácido cinâmico, com apenas uma insaturação, também apresentam um amplo leque de atividades biológicas, como já foi discutido, e isso motivou alguns estudos visando à síntese de análogos (Buzzetti *et al.*, 1993; Watkins *et al.*, 1996; Hou e Xu, 2001; Narasimhan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Kristan *et al.*, 2006; Michalet *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Pathan e Patil, 2008).

Para o caso de amidas com maior simplicidade estrutural, as abordagens sintéticas são igualmente mais simples e envolvem a reação de Knoevenagel, Döebner (Figura 1.19) ou Wittig (Figura 1.15) para formação da insaturação, seguida de metodologias tradicionais para formação da amida (Cowles *et al.*, 1990; Abdou *et al.*, 1992; Kryshthal *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 1998; Durantini, 1999; Schobert *et al.*, 2001; Gupta e Wakhloob, 2007).

Figura 1.19 Reação de Döebner

No caso da reação de Döebner, técnicas utilizando microondas têm sido utilizadas com rendimentos altos e tempo de reação extremamente reduzidos (Mitra *et al.*, 1999; Karchgaudhuri *et al.*, 2002; Mogilaiah e Reddy, 2004).

A arilação de Heck é outra abordagem descrita para a obtenção desses

compostos, podendo levar diretamente ao produto desejado. O catalisador de alto valor paládio, entretanto, não pode ser recuperado e reutilizado o que é uma desvantagem considerável (Cai *et al.*, 2006).

Figura 1.20 Arilação de Heck para a obtenção de cinamamidas

2 OBJETIVOS

O projeto desenvolvido no Laboratório de Química de produtos Naturais do Instituto de Química foi motivado pela apresentação de uma planta utilizada tradicionalmente pelos moradores no litoral norte paulista e sul fluminense. Devido à potente atividade anestésica local observada para essa foram definidos objetivos iniciais que se expandiram em objetivos mais amplos ao longo do desenvolvimento do projeto.

Inicialmente, foram definidos como objetivos a determinação dos principais metabólitos secundários das diferentes partes das espécies estudadas. Uma vez que os estudos fitoquímicos iniciais resultaram no isolamento do principal componente, responsável pela atividade observada, a piperovatina (Figura 2.1) e de outras amidas insaturadas, decidiu-se analisar a questão por duas abordagens diferentes.

Figura 2.1 Piperovatina

Por um lado decidiu-se realizar estudos relativos à produção desses compostos em plântulas *in vitro* e *ex-vitro*, bem como em culturas de tecido. Dessa forma objetivou-se a produção dos compostos em diferentes condições e realizando-se estudos básicos de morfogênese e cultivo *in vitro*. Praticamente nada se sabe sobre tais aspectos de espécies endêmicas e selvagens de ocorrência na Mata Atlântica.

Esse cultivo *in vitro* também permitiria a realização de estudos biossintéticos com a incorporação de possíveis precursores marcados para determinar a origem biossintética dos compostos.

Paralelamente, inserida nos estudos de bioprospecção de substâncias bioativas realizado pelo grupo, iniciou-se a síntese de amidas análogas às isoladas das espécies estudadas. A prioridade nesse estudo foi a síntese de substâncias que poderiam ser obtidas de forma eficiente e rápida e que fossem inéditas ou ainda não avaliadas nos ensaios iniciais. Dessa forma, decidiu-se sintetizar amidas com uma ou duas insaturações, com diferentes substituintes tanto no anel aromático como na função amida (Figura 2.2).

Figura 2.2 Estrutura geral das amidas sintéticas

Assim, teve-se como objetivo avaliar os compostos sintetizados e os naturais isolados das espécies vegetais em estudo, a fim de se determinar possíveis relações estrutura/atividade e de se avaliar compostos com potencial para desenvolvimento posterior.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 GENERALIDADES METODOLÓGICAS

Os solventes utilizados nas extrações e nas eluições das colunas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados segundo os procedimentos usuais (Vogel, 1988). Para as análises cromatográficas em CLAE, CG e CE foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck e Tedia S/A). A água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para os ensaios biológicos e síntese dos compostos foram utilizados reagentes de grau P.A. Os solventes utilizados foram devidamente secos por refluxo sobre um agente secante, destilados e armazenados sobre peneira molecular e atmosfera de nitrogênio, de acordo com os procedimentos descritos por (Armarego e Chai, 2003)

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizados sílica gel do tipo 60, partículas 63-200 μm e para cromatografia sob pressão ou “flash”, sílica gel 60 com partículas de 40-63 μm . As placas de CCDP foram confeccionadas utilizando-se sílica 60GF₂₅₄ (5-40 μm) (Merck®). Estas placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel (65 g) em água destilada (aproximadamente 120 mL) sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador “Quickfit”, regulado pra produzir camadas de 1,00 mm de espessura. Para CCDA, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®), sobre suporte de alumínio.

As colunas de Sephadex® -LH20 (G. E.) foram empacotadas com ao menos 12 horas de antecedência em metanol e esse foi também o único eluente utilizado para essa técnica cromatográfica (Cardellina, 1983).

As placas de CCDA foram reveladas com aspersão de solução de sulfato cérico a 2% em ácido sulfúrico (2 mol L^{-1}) e solução de vanilina (5,1g de vanilina, 50mL de ácido sulfúrico concentrado e 800 mL de etanol) sobre as mesmas, após terem sido observadas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm) e, em placas preparativas, através de visualização no ultravioleta (254 e 365 nm).

As fases orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotatório.

As análises em CLAE foram obtidas em um sistema Shimadzu composto por duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector ultravioleta modelo SPD-M10A Diode Array, controlados por um módulo de comunicação SCL-10A e tratados pelo programa de computador CLASS-VP versão 6.10. Utilizou-se uma coluna Phenomenex[®] de fase reversa C-18 Luna 5 μ (250x4,6 mm). Determinou-se o melhor gradiente para o conjunto das amostras, constituído por uma mistura binária de acetonitrila e uma solução de ácido acético 3%. O sistema consistia em um início a 45% de acetonitrila, mantido por 28 minutos, seguido de um gradiente de 12 minutos até acetonitrila 100%, retornando a 45% de acetonitrila aos 50 minutos a fim de se iniciar novas corridas. Todas as frações analisadas foram solubilizadas em MeOH, e em seguida filtradas em filtro Millex[®], 0,45 μ ou, nos casos de extratos brutos as amostras foram ainda submetidos a filtração em coluna Sep-Pak[®], utilizado a fim de eliminar componentes apolares da amostra, de pouco interesse nos estudos e que poderiam contaminar a coluna e diminuir sua vida útil.

Os espectros no infravermelho foram obtidos por meio de pastilhas de KBr, solução ou filme, em espectrômetro BOMEN MB100. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker AC200, Bruker DPX300, Bruker DRX500 operando a 200, 300 e 500 MHz, respectivamente. As

amostras foram solubilizadas em solventes deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram medidos a 70 eV em um aparelho de CGEM SHIMADZU modelo GCMS-QP5050A, equipado com coluna capilar DB5 (30 m x 0,25mm. d. i., 0.25 μ m).

3.2 MATERIAL VEGETAL

O material de *Piper scutifolium* utilizado tanto para a obtenção de extratos bem como as sementes utilizadas para o estabelecimento de cultura de plântulas foi obtido em coleta realizada no Morro do Corcovado em Ubatuba, Litoral Norte do estado de São Paulo. O Material de *Piper corcovadensis* foi coletado no bosque do CUASO, no Campus da USP em São Paulo. Ambas as espécies tiveram folhas, caules e raízes colhidas para as análises e foi possível também realizar a coleta de sementes das mesmas utilizadas para o estabelecimento de culturas *in vitro* das mesmas.

Figura 3.1 Casa de vegetação mantida no Instituto de Química da USP

Folhas de *Piper tuberculatum* foram coletadas na casa de vegetação mantida pelo LQPN no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, capital (Figura 3.1).

As espécies vegetais foram identificadas pela Dr. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e exsiccatas foram depositadas com códigos K-281 (*P. scutifolium*), K-589 (*P. corcovadensis*) e K-169 (*P. tuberculatum*) no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

O material de *Piper regnellii* utilizado nos estudos enzimológicos do metabolismo fenilpropanoídico realizados no estágio desenvolvido nos Estados Unidos da América foi obtido de espécimens mantidos nas estufas da Washington State University.

3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.3.1 EXTRATOS

Foram realizadas diversas extrações das espécies *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis*, uma vez que muitas vezes se fez necessário obter mais material para purificar compostos que foram obtidos inicialmente em quantidade insuficiente para os devidos fins (determinação estrutural e avaliação de atividade biológica). As extrações realizadas posteriormente seguiram as proporções e metodologia aqui descritas.

O material vegetal de *P. scutifolium*, (cerca de 300 gramas de folhas, 300 gramas de caule e 150 gramas de raiz) foi seco em estufa a 60°C por 48 horas, em seguida moído e extraído a exaustão com diclorometano:metanol 1:1 (V/V), rendendo cerca de 10 gramas de extrato de folhas, sete gramas de extrato de caule

e cerca de três gramas de extrato de raiz.

O extrato de *P. corcovadensis* foi obtido a partir de aproximadamente 20 g de folhas secas em estufa a 60°C por 48 horas em seguida moídas. Estas foram moídas e extraídas exaustivamente com uma mistura de clorofórmio e metanol 1:1 (V/V). O extrato foi então filtrado e concentrado sob pressão reduzida rendendo cerca de 2 gramas de extrato.

O extrato de *P. tuberculatum* foi obtido a partir de 6,3 Kg de folhas secas por 24 horas em estufa a 60 °C. As folhas foram então moídas e extraídas com 5 x 25 L de etanol. O extrato foi então filtrado e seco em evaporador rotativo sob pressão reduzida rendendo 150 g de extrato. O extrato foi então ressuscendido em metanol e, após adição de 10% de água o extrato foi filtrado em uma coluna com 1 kg de celite a fim de se reduzir a quantidade de clorofila e substâncias de baixa polaridade do extrato, que foi novamente rotaevaporado rendendo 90 g de extrato “limpo”.

O extrato de *P. nigrum*, realizado para obtenção de piperina como padrão, foi obtido a partir de 370 g de frutos secos adquiridos no mercado local. Os frutos foram moídos e extraídos com 3 x 900 mL de uma mistura metanol:diclorometano (2:1). Os extratos foram então filtrados, juntos e secos em rotaevaporador sob pressão reduzida rendendo 27 g de extrato.

3.3.2 PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE *PIPER SCUTIFOLIUM*

Cerca de cinco gramas de material proveniente das folhas de *P. scutifolium* foram submetidos à cromatografia líquida preparativa Flash (cromatografia líquida sob pressão ou vácuo). Essa foi realizada em um funil de placa sinterizada, contendo 175 g de Sílica 60H (0,040mm-0,063mm) (Merck) compactada a seco sob

vácuo, com gradiente de polaridade crescente, utilizando misturas de hexanos, acetato de etila e metanol (variando de hexano 100%, misturas de hexano e acetato de etila com polaridade crescente, acetato de etila 100% , metanol:acetato de etila 1:1 e finalmente MeOH 100%). As frações assim obtidas foram subseqüentemente refracionadas utilizando-se CC preparativa, eluída novamente com hexano e acetato de etila, com gradiente de polaridade crescente, de 100% de hexano a 100% metanol. Das subfrações assim obtidas foram sucessivamente purificados os compostos majoritários enriquecidos, utilizando-se cromatografia de camada delgada com placas de sílica

Das subfrações obtidas a partir das CC preparativas foram então purificadas substâncias utilizando-se placas preparativas eluídas com hexano e acetato de etila em diferentes proporções ou misturas de diclorometano com etanol, ou misturas de hexano, diclorometano e acetato de etila, após otimização em cada caso. Apenas a fração 6 da coluna realizada para a repurificação da fração 6 da primeira coluna, por apresentar massa muito elevada para a purificação por placas preparativas, foi repurificada utilizando-se CC preparativa. Porém, utilizou-se clorofórmio com concentrações crescentes de éter etílico, seguido de metanol como solvente.

As frações, uma vez concluída a eluição nas placas preparativas foram extraídas utilizando-se acetato de etila, e filtradas em um funil de placa sinterizada. A sílica contendo as amostras sendo sempre levada ao sonicador após a adição do solvente por 10 segundos, antes de se realizar a filtração.

3.4 METODOLOGIA SINTÉTICA

3.4.1 SÍNTESE DE DIENAMIDAS

A metodologia utilizada para a síntese das 5-fenil-penta-2-4-dienamidas foi baseada na reação Wadsworth-Emmons utilizando n-BuLi, de acordo com método descrito por Strunz e Finlay (Strunz e Finlay, 1994). A formação das duplas conjugadas com configuração *trans* foi realizada pela reação do trietil-4-fosfonocrotonato com o aldeído de escolha. A seguir faz-se a hidrólise do éster formado, levando ao ácido correspondente, que é subsequenteamente convertido no cloreto de acila pela reação com cloreto de oxalila e, finalmente, a formação da amida pela reação com diferentes aminas (de Paula *et al.*, 2000) (Figura 3.2).

Figura 3.2 Síntese de Dienamidas

Na primeira etapa, a um balão bi-tubulado de tamanho adequado, sob atmosfera inerte de N_2 seco, foram adicionados tetrahidrofurano (THF) anidro e trietil 4-fosfonocrotonato (1 equivalente), deixados sob agitação magnética. Em seguida, resfriou-se a mistura reacional a -78°C com banho de acetona e gelo seco e

adicionou-se lentamente o n-BuLi (1 eq.). Após 15 minutos foi adicionado lentamente o aldeído (1 eq.) dissolvido em THF anidro (5 mL). Após permanecer sob agitação a -78°C por aproximadamente 15 minutos, a mistura reacional foi deixada até atingir a temperatura ambiente e, após 45 minutos, a reação foi interrompida com a adição de uma solução 1% de NH_4Cl . O “work-up” da reação consistiu em 3 extrações com éter etílico e a fase orgânica foi então reunida e seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

O produto bruto da olefinação mostrou-se com pureza suficiente para que a próxima etapa da síntese fosse realizada sem haver necessidade de outras etapas de purificação. Esse produto bruto foi então solubilizado em acetona, em um balão simples, seguido pela adição de uma solução 1 M de hidróxido de lítio (em excesso), deixando-se sob refluxo por aproximadamente 2 horas. O solvente da mistura reacional foi então rota-evaporada e ao resíduo foi adicionada uma solução saturada de NaHCO_3 . A solução resultante foi então lavada 3 vezes com éter etílico. A fração aquosa foi acidificada utilizando-se HCl concentrado até atingir um pH de aproximadamente 3, quando ocorre a precipitação do ácido formado. A solução acidificada foi finalmente extraída com éter etílico 3 vezes, a fase orgânica reunida, seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão. O produto cristalino obtido foi então recristalizado em etanol a quente.

Os compostos derivados da piperina, contendo o grupo metilenodioxí foram obtidos conforme a reação descrita na literatura (de Paula *et al.*, 2000). Para a obtenção do ácido pipérico, 1g de piperina (disponível no laboratório) foi solubilizado em 300 mL de uma solução etanólica 1 M de LiOH . A mistura reacional foi levada a refluxo por 36 horas, com acompanhamento da reação por CCDA. Após o consumo da piperina a reação foi interrompida com adição de uma solução 2M de HCl até o

pH ficar levemente ácido, havendo a precipitação do produto formado. O ácido pipérico assim obtido foi purificado por recristalização em etanol a quente.

A última etapa da síntese consistiu na formação do cloreto de ácido correspondente e foi realizada dissolvendo-se o ácido em DCM seco em um balão simples com atmosfera de N_2 seco, sob agitação magnética a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (banho de gelo). Em seguida, adicionou-se o cloreto de oxalila (3 equivalentes) lentamente e, após aproximadamente 5 horas reagindo (de acordo com o acompanhamento por CCDA), a mistura reacional foi rota-evaporada até a secura, a fim de se eliminar o solvente e o de cloreto de oxalila residual. O produto foi então ressolubilizado em DCM, dividida em balões, de acordo com o número de amidas a serem sintetizadas, e em seguida foram adicionadas as aminas de interesse (3 equivalentes), recém destiladas, aos respectivos balões. A reação foi deixada reagir “overnight” até o consumo dos reagentes e foi interrompida com adição de solução saturada de NH_4Cl . O “work-up” foi feito extraíndo-se a mistura 3 vezes com éter etílico, a fase orgânica foi reunida, seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada sob pressão. Os produtos então obtidos foram purificados utilizando-se CC ou CCD (para produtos com menos de 100 mg) utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila.

[1]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3058, 2822, 1679, 1629, 1418, 1264, 1142, 1003, 939, 887, 756, 688, 543 e 504. (Figura 8.3)

IE-EM (m/z (int. rel.)): 174 (26; M^+), 157 (13), 144 (100), 115 (7), 102(9), 87 (5), 77 (13), 64 (11), 51 (18) e 39 (7). (Figura 8.4)

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6,0 (d, 1H, $J = 15,3$; H2); 6,89 (dd, 1H; $J = 9,2$ 15,1; H4); 6,99 (d, 1H ; $J = 15,1$; H5); 7,28-7,40 (m, 3H; H8, H9 e H10) 7,48 (dd, 2H, $J = 8,05$ e 1,4; H7 e H11); e 7,55 (ddd, 1H; $J_{2,3} = 15,3$, 9,1 e 1,28, H3). (Figura 8.1)

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 8.2): δ 120,20 (C2); 125,98 (C4); 127,35 (C7 e C11); 128,86 (C8 e C10); 129,32 (C9); 135,86 (C6); 141,62 (C5); 146,93 (C3) e 172,34 (C1).

[1a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.7): 3349, 2976, 2934, 1711, 1634, 1450, 1268, 1216, 1127, 1098, 1073, 1001, 755 e 700.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.8): 157 (12), 129 (16), 128 (43), 127 (22), 115 (15), 103 (11), 102 (17), 100 (10), 91 (9), 78 (12), 77 (45), 74 (11), 72 (32), 63 (13), 56 (24), 51 (36), 50 (13), 42 (100) e 39 (23).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 8.5): δ 1,17 (t, 3H; $J = 6,9$; H2'a); 1,23 (t, 3H; $J = 6,9$; H2'b); 3,42 (q, 2H, $J = 6,9$; H1'a); 3,47 (q, 2H, $J = 6,9$; H1'b); 6,41 (d, 1H, $J = 14,5$; H2); 6,80-7,00 (m; 2H; H4 e H9); 7,24-7,56 (m, 6H; H7, H8, H10, H11, H5 e H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 8.6): δ 13,22 (C2'a); 14,99 (C2'b); 40,97 (C1'a); e 42,20 (C1'b); 121,3 (C2)*; 126,35 (C4)*; 126,98, (C7 e C11); 128,56 (C9); 128,72 (C8 e C10); 136,47 (C6); 138,70 (C5)*; 142,37 (C3)*; e 165,78 (C1). * sinais podem estar trocados.

[1b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.11): 3292, 2961, 2868, 1646, 1612, 1546, 1446, 1346, 1263, 1160, 989, 879, 775, 691, 677 e 508.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.12): 229 (34; M^+), 172 (13), 158 (12), 157 (100), 130 (12), 129 (35), 128 (98), 101 (11), 96 (42), 77 (16), 51 (15), 43 (21), 41 (24) e 39 (13).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 8.9): δ 0,94 (d, 6H, $J = 6,8$; H_3'); 1,82 (hept, 1H, $J = 6,8$; H_2'); 3,19 (t, 2H; $J = 6,6$; H_1'); 5,7 (sl, 1H; NH); 5,98 (d, 1H, $J = 14,9$; H_2); 6,83-6,88 (m; 2H; H_4 e H_9); 7,24-7,50 (m, 6H; H_7 , H_8 , H_{10} , H_{11} , H_5 e H_3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 8.10): δ 20,12 (C_3'); 28,59 (C_2'); 47,00 (C_1'); 124,07 (C_2)*; 126,34 (C_4)*; 126,95, (C_7 e C_{11}); 128,63 (C_9); 128,71 (C_8 e C_{10}); 136,31 (C_9); 139,05 (C_5)*; 140,82 (C_3)*; e 166,09 (C_1). * sinais podem estar trocados.

[1c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3287, 3081, 2958, 2927, 2855, 1644, 1615, 1547, 1443, 1345, 1262, 1146, 998, 879, 754, 691, 676, 506 481 e 457. (Figura 8.15)

IE-EM (m/z (int. rel.)): 243 (28; M^+), 186 (17), 172 (12), 158 (13), 157 (90), 130 (23), 129 (58), 128 (100), 127 (45), 115 (16), 102 (15), 96 (41), 91 (11), 77 (22), 64 (22), 55 (10), 51 (17), 43 (20), 41 (35) e 39 (18). (Figura 8.16)

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.13): δ 0,90 (t, 3H; $J=6,6$ Hz; $\text{H5}'$); 1,25-1,36 (m, 4H; $\text{H3}'$ e $\text{H4}'$); 1,55 (m, 2H; $\text{H2}'$); 3,29 (m, 2H; $\text{H1}'$); 5,77 (sl, 1H; NH); 5,98 (d, 1H, $J=14,9$; H2); 6,80-6,89 (m; 2H; H4 e H5); 7,24-7,50 (m, 6H; H3 , H7 , H8 , H9 , H10 e H11).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.15): δ 13,9 ($\text{C5}'$), 22,3 ($\text{C4}'$); 29,0 ($\text{C3}'$); 29,2 ($\text{C2}'$); 39,6 ($\text{C1}'$); 124,3 (C4); 126,3 (C2); 126,9, (C7 e C11); 128,5 (C9); 128,6 (C8 e C10); 136,2 (C6); 138,8 (C5); 140,4 (C3); e 166,1 (C1).

[2]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) .(Figura 8.19): 3025, 3007, 1687, 1612, 1579, 1426, 1331, 1309, 1257, 1158, 1044, 995, 873, 774, 679, 572 e 542

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.20): 204,25 (65; M^+), 159 (98), 144 (100), 127 (40), 115 (75), 102(9), 89 (12), 77 (14), 63 (20), 51 (17) e 39 (19).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 8.17): δ 3,84 (s, 3H; 3'- OCH_3); 5,99 (d, 1H, $J = 15,2$; H2); 6,85 - 6,95 (m, 2H ; H9 e H4); 6,93 (d, 1H, $J = 15$; H5); 6,99 (t, 1H, $J = 2,5$; H7); 7,07 (d, 1H, $J = 7,76$; H11); 7,28 (dd, $J = J = 7,9$; H10) e 7,53 (ddd, $J = 15,2$ $J = 7,5$ e $J = 2,3$, 1H, H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 8.18): δ : 55,30 (O-CH_3); 112,33 ($\text{C4}'$); 115,09 ($\text{C2}'$); 120,08 ($\text{C6}'$)*; 120,39 (C2)*; 126,21 (C4); 129,82 ($\text{C5}'$); 137,17 ($\text{C1}'$); 141,54 (C5); 146,87 (C3); 159,88 ($\text{C3}'$) e 172,34 (C1). * sinais podem estar trocados.

[2a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.23): 3405, 2974, 2937, 2916, 1632, 1605, 1484, 1462, 1264, 1044, 784 e 687.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.24): 135 (5), 100 (10), 72 (55), 57 (30), 55 (18), 44 (66), 43 (100), 42 (64) e 41 (72).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.21): δ 1,13 (t, 3H; $J = 7,4$ Hz; H2'a); 1,23 (t, 3H; $J = 7,4$ Hz; H2'b); 3,40 (t, 2H; $J = 7,4$; H1'a); 3,52 (t, 2H; $J = 7,4$; H1'b); 3,74 (s, 3H, O-CH₃); 6,33 (d, 1H, $J = 15$; H2); 6,69 - 6,84 (m, 3H; H9, H5 e H4); 6,89 (s, 1H; H7); 6,97 (d, 1H, $J = 7,9$; H11); 7,18 (t, 1 H, $J = 7,9$; H10) e 7,38 (dd, 1H, $J = 15$ e $J = 9$; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.22): δ 13,2 (C2'a); 14,9 (C2'b); 41,0(C1'a); 42,2(C1'b); 55,2 (O-CH₃); 111,9 (C7), 114,4 (C9); 119,6 (C11); 121,0 (C2); 127,2 (C5); 129,7 (C10); 137,8 (C6); 138,7 (CH4); 142,4 (C3); 159,8 (C8) e 165,8 (C1).

[2b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.27): 3308, 2950, 2930, 1644, 1609, 1578, 1543, 1432, 1341, 1268, 1257, 1161, 1052, 990, 863, 772, 683, 665 e 572.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.28): 259 (4, M⁺), 187 (35), 160 (11), 158 (71), 145 (12), 144 (52), 129 (10), 128 (22), 127 (32), 116 (26), 115 (88), 102 (10), 89 (16), 77 (11), 64 (10), 63 (19), 57 (26), 56 (17), 51 (12), 43 (100), 41 (90) e 39 (41).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) (Figura 8.25): δ 0,94 (d, 6H, J = 6,6; H_{3'}); 1,83 (m, 1H, J = 6,6; H_{2'}); 3,19 (t, 2H; J = 6,6; H_{1'}); 3,81 (s, 3H; 3'-OCH₃); 5,99 (d, 1H, J = 14,5; H₂); 6,75 - 6,90 (m, 3H ; H₉, H₅ e H₄); 6,95 (dd, 1H, J = 2,0; H₇); 7,03 (d, 1H, J = 7,9; H₁₁); 7,24 (t, 1H, J = 7,9; H₁₀) e 7,53 (m, 1H, H₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (Figura 8.26): δ : 20,10 (C_{3'}), 28,6 (C_{2'}), 46,97 (C_{1'}), 55,21 (O-CH₃); 112,09 (C₉); 114,34 (C₇); 119,6 (C₁₁)*; 124,21 (C₂)*; 126,63 (C₄); 129,67 (C₁₀); 137,70 (C₆); 138,89,54 (C₅); 140,67 (C₃); 159,80 (C₈) e 166,04 (C₁).

* sinais podem estar trocados.

[3]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.31): 3440, 3026, 1681, 1614, 1595, 1572, 1510, 1421, 1312, 1270, 1255, 1179, 1142, 1023, 1005, 849, 818, 701 e 523.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.32): 204,25 (65; M^+), 159 (100), 144 (91), 127 (20), 128 (20) 115 (63), 102(9), 89 (15), 77 (15), 63 (20), 51 (17) e 39 (18).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-D_6) (Figura 8.29): δ 3,83 (s, 3H, O-CH₃); 5,94 (d, 1H, $J = 15,3$; H2); 6,77 (dd, 1H; $J=10,7$ e $15,3$; H4); 6,89 (d; 2H; $J= 8,8$; H8 e H10) ; 6,90 (d, 1H; $J = 15,3$; H5); 7,42 (d, 2H; $J=8,8$; H7 e H11) e 7,51 (dd, 1H, ; $J = 15,3$ e $10,7$; H3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6) (Figura 8.30): δ 55,36 (O-CH₃); 114,49 (C8 e C10); 120,95 (C2); 124,46 (C4); 127,49 (C6); 128,87 (C7 e C11); 139,86 (C5); 144,90 (C3); 160,15 (C9) e 167,79 (C1).

[3b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.35): 3295, 2959, 2933, 2870, 1644, 1600, 1551, 1510, 1463, 1453, 1443, 1351, 1264, 1252, 1176, 1031, 988, 842, 822, 810, 677 e 526.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.36): 259 (19; M^+), 187 (35), 160 (11), 158 (71), 145 (12), 144 (52), 129 (10), 128 (22), 127 (33), 116 (26), 115 (88), 102 (10), 96 (34), 89 (16), 77 (11), 64 (10), 63 (18), 57 (26), 56 (17), 55 (22), 51 (12), 43 (100), 41 (90) e 39 (41).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 8.33): δ 0,94 (d, 6H, $J = 6,6$; H_3'); 1,82 (m, 1H, $J = 6,6$; H_2'); 3,19 (t, 2H; $J = 6,6$; H_1'); 3,82 (s; 3H; OMe); 5,7 (sl, 1H; NH); 5,94 (d, 1H, $J = 14,5$; H_2); 6,86 (d; 2H; $J = 8,8$; H_8 e H_{10}); 7,38 (d, 2H; $J = 8,8$; H_7 e H_{11}); 6,64-6,89 (m; 2H; H_4 e H_5); 7,26-7,39 (m; 1H; H_3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 8.34): δ 20,12 (C_3'); 28,60 (C_2'); 46,97 (C_1'); 55,29 (OMe); 114,17 (C_8 e C_{10}); 122,83 (C_2)*; 124,26 (C_4)*; 129,14 (C_6); 128,35 (C_7 e C_{11}); 138,75 (C_5)*; 141,21 (C_3)*; 160,07 (C_9) e 166,29 (C_1).

*= sinais podem estar trocados

[3c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.39): 3302, 2957, 2932, 2865, 1658, 1644, 1598, 1535, 1509, 1262, 1252, 1175, 1143, 1030, 1002, 992, 842, 818, 588 e 525.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.40): 273 (16; M^+), 202 (12), 187 (43), 160 (12), 159 (18), 147 (20), 145 (13), 144 (50), 129 (13), 128 (30), 127 (23), 121 (18), 116 (40), 115 (100), 96 (27), 92 (10), 63 (16), 55 (19), 51 (13), 43 (49), 41 (89) e 39 (44).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.37): δ 0,90 (t, 3H; $J=6,6$ Hz; $\text{H5}'$); 1,25-1,36 (m, 4H; $\text{H3}'$ e $\text{H4}'$); 1,54 (t, 2H; $J=6,6$ Hz $\text{H2}'$); 3,34 (q, 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H1}'$); 3,80 (s, 3H; OMe); 5,91 (sl, 1H; NH); 5,94 (d, 1H, $J=14,9$; H2); 6,63-6,89 (m; 2H; H4 e H5); 6,83 (d, 2H; $J=8,8$; H8 e H10); 7,24-7,50 (m, 1H; H3); 7,35 (d, 2H; $J=8,8$; H7 e H9).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.38): δ 13,9 ($\text{C5}'$), 22,3 ($\text{C4}'$); 29,1 ($\text{C3}'$); 29,3 ($\text{C2}'$); 39,7 ($\text{C1}'$); 55,2 (OMe); 114,1 (C48 e C10); 122,9 (C2); 124,3 (C4); 128,3 (C7 e C11); 129,1 (C6); 138,7 (C5); 141,0 (C3); 160,0 (C9) e 166,3 (C1).

[3d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.43): 3391, 2958, 2932, 2872, 1713, 1638, 1603, 1512, 1464, 1443, 1427, 1253, 1175, 1128, 1111, 1032, 1000, 838 e 527.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.44): 187 (2), 144 (2), 135 (8), 115 (12), 77 (4), 57 (32), 56 (6), 44 (23), 43 (22), 42 (35), 41 (100) e 39 (20).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.41): δ 0,93 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H4'a); 0,96 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H4'b); 1,25-1,36 (m, 4H; H3'a e b); 1,48-1,64 (m, 4H; H2'a e b); 3,32 (t, 2H; $J=7,4$ Hz; H1'a); 3,40 (t, 2H; $J=7,4$ Hz; H1'b); 3,80 (s, 3H; OMe); 6,35 (d, 1H, $J=14,5$; H2); 6,63-6,89 (m; 2H; H4 e H5); 6,87 (d, 2H; $J=8,8$; H8 e H10); 7,39 (d, 2H; $J=8,8$; H7 e H9) e 7,43-7,51 (m, 1H; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.42): δ 13,7 (C4'a), 13,8 (C4'b); 20,0 (C3'a); 20,1 (C3'b); 30,0 (C2'a); 31,8 (C2'b); 46,4 (C1'a); 47,8 (C1'b); 55,1 (OMe); 114,0 (C8 e C10); 119,7 (C2); 124,9 (C4); 128,2 (C7 e C11); 129,1 (C6); 138,2 (C3); 142,6 (C5); 159,9 (C9) e 166,1 (C1).

[3e]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.47): 3046, 2933, 2922, 2847, 1634, 1603, 1589, 1511, 1435, 1262, 1255, 1157, 1027, 1007, 838 e 530.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.48): 271 (44, M^+), 188 (21), 187 (100), 160 (15), 159 (22), 145 (13), 144 (38), 137 (16), 129 (11), 128 (24), 127 (23), 116 (26), 115 (63), 89 (11), 84 (33), 55 (17), 42 (24), 41 (33) e 39 (16).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.45): δ 1,61 (sl, 6H, H_2' , H_3' e H_4'); 3,52 (sl, 2H, H_1'); 3,61 (sl, 2H, H_5'); 3,80 (s, 3H; OMe); 6,43 (d, 1H, $J = 14,5$; H_2); 6,70-6,80 (m; 2H; H_4 e H_5); 6,87 (d, 2H; $J = 8,4$; H_8 e H_{10}); 7,38 (d, 2H; $J = 8,4$; H_7 e H_9) e 7,29-7,51 (m, 1H; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.46): δ 24,5 (C_3'), 25,4 (C_2'); 26,5 (C_4'); 43,1 (C_1'); 46,7 (C_5'); 55,1 (OMe); 114,0 (C_8 e C_{10}); 119,5 (C_2); 124,8 (C_4); 128,2 (C_7 e C_{11}); 129,1 (C_6); 138,0 (C_3); 142,6 (C_5); 159,8 (C_9) e 165,3 (C_1).

[4]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.51): 3444, 29117, 2539, 1671, 1618, 1598, 1502, 1490, 1446, 1420, 1310, 1255, 1036, 994, 922, 854, 807, 789 e 527.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.52): 173 (7), 143 (11), 115 (100), 89 (16), 77 (17), 65 (15), 63 (42), 62 (20), 51 (30), 50 (22), 45 (53), 43 (11), 40 (12), 39 (40) e 38 (14).

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.49): δ 5,92 (d, 1H, $J = 15,4$; H2); 6,06 (s, 2H, OCH_2O); 6,90-7,07 (m, 4H; H4, H5, H10 e H11); 7.17-7.40 (m; 2H; H3 e H7) e 12,2 (sl, 1H; OH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.50): δ 101,6 (OCH_2O), 105,9 (C7), 108,8 (C10), 121,4 (C2), 123,4 (C11), 125,1 (C4), 130,7 (C6), 140,1 (C5), 144,9 (C3), 148,2 e 148,4 (C8 e C9) e 167,9 (CO).

[4a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.55): 3392, 2975, 2933, 2901, 1632, 1503, 1489, 1445, 1252, 1127, 1038, 930 e 806.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.56): 273 (9, M^+), 201 (34), 173 (15), 171 (12), 143 (17), 116 (20), 115 (100), 100 (16), 89 (29), 72 (41), 65 (18), 63 (28), 62 (11), 58 (30), 57 (18), 56 (25), 55 (26), 51 (16), 44 (48), 43 (38), 42 (70), 41 (12) e 39 (26).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.53): δ 1,12 (t, 6H; $J = 7,0$ Hz; $\text{H1}'$); 3,40 (q, 4H; $J = 7,0$; 5,90 (s, 2H, OCH_2O); $\text{H2}'$); 6,28 (d, 1H, $J = 14,5$; H2); 6,66-6,71 (m, 3H; H4 , H5 e H11); 6,82 (dd, 1H; $J = 1,3$ e $7,9$; H10); 6,91 (s, 1H; H7); 7,39 (ddd; 1H; $J = 14,6$, $6,4$ e $3,6$).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.54): δ 13,2 ($\text{C2}'\text{a}$); 14,9 ($\text{C2}'\text{b}$); 40,8,0($\text{C1}'\text{a}$); 42,1($\text{C1}'\text{b}$); 101,1 (OCH_2O), 105,5 (C7), 108,3 (C10), 120,04 (C2), 122,4 (C11), 125,2 (C4), 130,8 (C6), 138,3 (C3), 142,4 (C5), 148,0 (C8 e C9) e 165,7 (CO).

[4c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): (Figura 8.59) 3287, 2951, 2926, 2867, 1642, 1604, 1539, 1500, 1447, 1370, 1260, 1187, 1148, 1102, 1038, 988, 926, 859, 810, 791, 733, 717, 661 e 415.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.60): 287 (13, M^+), 201 (27), 174 (16), 173 (48), 172 (17), 171 (12), 143 (24), 116 (18), 115 (100), 100 (22), 65 (10), 63 (17), 55 (13), 51 (11), 44 (11), 43 (32), 41 (48) e 39 (16).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.57): δ 0,89 (t, 3H; $J=6,1$ Hz; H_5'); 1,25-1,36 (m, 4H; H_3' e H_4'); 1,54 (t, 2H; $J=6,6$ Hz H_2'); 3,34 (q, 2H; $J=6,6$ Hz; H_1'); 5,86 (sl, 1H, NH); 5,94 (d, 1H, $J = 14,5$; H_2); 5,96 (s, 2H, OCH_2O); 6,58-6,94 (m, 5H; H_4 , H_5 , H_7 , H_{10} e H_{11}); 7.36 (dd; 1H; $J = 14,5$ e $6,4$).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.58): δ 13,9 (C_5'), 22,3 (C_4'); 29,1 (C_3'); 29,3 (C_2'); 39,7 (C_1'); 101,2 (OCH_2O), 105,6 (C_7), 108,4 (C_{10}), 122,5 (C_{11}), 123,3 (C_2), 124,7 (C_4), 130,8 (C_6), 138,7 (C_3), 140,8 (C_5), 148,1 (C_8 e C_9) e 166,1 (CO).

[4d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.63): 3395, 2959, 2931, 2873, 1638, 1593, 1503, 1489, 1445, 1252, 1129, 1038, 930 e 804.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.64): 329 (6), 202 (8), 201 (57), 172 (10), 171 (12), 142 (18), 135 (14), 116 (15), 115 (92), 89 (14), 65 (10), 63 (13), 57 (44), 55 (17), 44 (28), 43 (30), 42 (46), 41 (100) e 39 (34).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.61): δ 0,93 (t, 6H; $J=7,0$ Hz; H_4'); 1,17-1,36 (m, 4H; H_3'); 1,49 (sl, 4H; H_2'); 3,28 (sl, 4H; H_1'); 5,89 (s, 2H, OCH_2O); 6,27 (d, 1H, $J = 14,5$ Hz; H_2); 6,66-6,71 (m, 3H; H_4 , H_5 e H_{11}); 6,82 (dd, 1H; $J = 1,3$ e $7,9$ Hz; H_{10}); 6,91 (d, 1H; $J = 1,3$ Hz; H_7); 7,38 (m; 1H; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.62): δ 13,8 ($\text{C}_4'\text{a}$ e b); 20,1 ($\text{C}_3'\text{a}$ e b); 30,0 ($\text{C}_2'\text{a}$); 31,7 ($\text{C}_2'\text{b}$); 46,6 ($\text{C}_1'\text{a}$); 47,8 ($\text{C}_1'\text{b}$); 101,2 (OCH_2O), 105,6 (C_7), 108,4 (C_{10}), 119,9 (C_2), 122,5 (C_{11}), 125,2 (C_4), 130,9 (C_6), 138,5 (C_3), 142,6 (C_5), 148,1 (C_8 e C_9) e 166,1 (CO).

3.4.2 SÍNTESE DE CINAMAMIDAS

A metodologia utilizada para a síntese dos derivados de cinamamidas consistiu em inicialmente formar derivados do ácido cinâmico, utilizando a reação de Döebner, auxiliada pelo uso de microondas, conforme descrito por Mitra (Mitra *et al.*, 1999), realizada em um forno de microondas convencional. Essa etapa foi realizada com a adição de aproximadamente 10 mmol do aldeído de escolha e dois equivalentes de ácido malônico em cerca de 5 mL de piridina com 20 μ L de piperidina. A mistura reacional foi adicionada a um erlenmeyer com um funil em sua boca e um balão contendo gelo seco como condensador para a reação (Figura 3.3).

Figura 3.3 Esquema de aparato utilizado na síntese em microondas

O tempo de reação foi de 120 segundos, em potência nível 5. Após o término da reação foram adicionados 5 mL de uma solução 50% de ácido clorídrico fumegante em água, com o que se neutralizou a piridina e causou a precipitação do ácido formado que foi então filtrado e recristalizado em EtOH a quente. Os ácidos obtidos foram subsequenteemente convertidos no cloreto de acila correspondente pela reação com cloreto de oxalila e finalmente a formação das amidas desejadas pela reação com diferentes aminas, conforme descrito por de Paula e colaboradores

(de Paula *et al.*, 2000) (Esquema 3.1).

Esquema 3.1: Síntese de Cinamamidas

Dados:**[5a]**

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.67): 3436, 3025, 2966, 1648, 1595, 1461, 1397, 1252, 1219, 1146, 1102, 977, 866, 763, 709, 685, 568 e 542.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.68): 203 (11; M^+), 131 (93), 126 (15), 103 (62), 102 (23), 77(100), 76 (13), 72 (22), 63 (11), 58 (19), 56 (23), 51(65), 50 (21), 44 (25), 42 (70) e 39 (13).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.65): δ 1,17 (t, 3H; $J=6.7$; H2'a); 1,23 (t, 3H; $J=6.7$; H2'b); 3,47 (q, 2H; $J=6,7$ Hz; H1'a); 3,44 (q, 2H; $J=6,7$ Hz; H1'b); 6,83 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 7,30-7,36 (m, 3H ; H6, H7 e H8); 7,48-7,53 (m, 2H; H5 e H9); e 7,71 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.66): δ 12,9 (C2'a); 14,7 (C2'b); 40,7 (C1'a); 41,9 (C1'b); 117,4 (C2); 127,4 (C5 e C9); 128,4 (C6 e C8); 129,1 (C7); 135,1 (C4); 141,8 (C3) e 165,3 (C=O).

[5b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.71): 3267, 3081, 2960, 1655, 1616, 1559, 1449, 1342, 1225, 992, 766, 680, 544 e 491.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.72): 203 (11; M^+), 145 (23), 132 (10), 131 (100), 103 (60), 102(24), 77 (73), 51 (34), 50 (13), 43 (30), 41 (48) e 39 (31).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.69): δ 0,94 (d, 6H; $J=6.6$ Hz; $\text{H}_{3'}$); 1,90 (sep, 1H; $J=6.6$ Hz; $\text{H}_{2'}$); 3,24 (t 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H}_{1'}$); 6,79 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H_2); 7,20-7,25 (m, 3H ; H_6 , H_7 e H_8); 7,40-7,46 (m, 2H; H_5 e H_9); 7,66 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H_3); e 7.63 (sl, 1H; NH) .

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.70): δ 20,0 ($\text{C}_{3'}$); 28,4 ($\text{C}_{2'}$); 47,0 ($\text{C}_{1'}$); 121.4 (C_2); 127,4 (C_5 e C_9); 128,4 (C_6 e C_8); 129,1 (C_7); 134,7 (C_4); 140,0 (C_3) e 166.4 ($\text{C}=\text{O}$).

[5c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.75) : 3276, 3063, 2955, 2933, 1653, 1607, 1553, 1475, 1339, 1218, 979, 988, 764, 719, 575 e 489.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.76): 217 (4, M^+), 160 (13), 146 (25), 131 (100), 103 (49), 102 (16), 84 (18), 77 (58), 51 (24), 41 (28) e 39 (15).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.73): δ 0.86 (ml, 3H; $\text{H5}'$); 1.29 (ml, 4H; $\text{H3}'$ e $\text{H4}'$); 1.59 (ml, 2H; $\text{H2}'$); 3.38 (q, 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H1}'$); 6.68 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H2); 7.20-7.35 (m, 4H ; H6 , H7 , H8 e NH); 7.41-7.46 (m, 2H; H5 e H9); 7.64 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.74) : δ 13,7 ($\text{C5}'$); 22.1 ($\text{C4}'$); 28,9 ($\text{C3}'$); 29,0 ($\text{C2}'$); 39,6 ($\text{C1}'$); 121.3 (C2); 127,4 (C5 e C9); 128,4 (C6 e C8); 129,1 (C7); 134,7 (C4); 139,9 (C3) e 166.3 (C=O).

[5d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.79): 3437, 2957, 2930, 2872, 1650, 1607, 1454, 1427, 1209, 1140, 977, 763, 707, 685, 551 e 489.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.80): 259 (2, M^+), 130 (100), 128 (1), 103 (48), 77 (39), 51 (11), 42 (14) e 41 (26).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.77): δ 0.91-1.05 (m, 6H; H4'a e H4'b); 1,25-1,37 (m, 4H; H3'a e H3'b); 1,50-1,66 (m, 4H; H2'b e H2'b); 3,38 (t, 2H; $J=8.3$ Hz; H1'a); 3,42 (t, 2H; $J=8.3$ Hz; H1'b); 6,83 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 7,30-7,37 (m, 3H ; H6, H7 e H8); 7,48-7,52 (m, 2H; H5 e H9); 7,70 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.78): δ 13,6 (C4'a); 13,7 (C4'b); 19,8 (C3'a); 20,0 (C3'b); 29,8 (C2'a); 31,7 (C2'b); 46,4 (C1'a); 47,7 (C1'b); 117,6 (C2); 127,5 (C5 e C9); 128,5 (C6 e C8); 129,2 (C7); 135,3 (C4); 141,9 (C3) e 165.8 (C=O).

[5e]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.83): 3026, 2933, 2861, 1644, 1589, 1459, 1441, 1280, 1248, 1223, 1019, 990, 764, 707, 568, 554 e 487.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.84): 215 (34, M^+), 214 (25), 138 (33), 132 (11), 131 (88), 104 (14), 103 (74), 102 (23), 84 (51), 77 (100), 63 (12), 56 (27), 55 (50), 54 (20), 53 (14), 52 (16), 51 (76), 50 (27), 43 (15), 42 (98), 41 (92), 40 (10) e 39 (62).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.81): δ 1.59 (sl, 6H; H_2' , H_3' e H_4'); 1,58 (ml, 4H; $\text{H}_3'\text{a}$ e $\text{H}_3'\text{b}$); 6,92 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_2); 7,25-7,35 (m, 3H ; H_6 , H_7 e H_8); 7,44-7,58 (m, 2H; H_5 e H_9); 7,64 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.82): δ 24,5 (C_3'); 25,5 (C_2'); 26,6 (C_4'); 43,1 (C_1'); 46,8 (C_5'); 117,7 (C_2); 127,5 (C_5 e C_9); 128,6 (C_6 e C_8); 129,2 (C_7); 135,4 (C_4); 141,9 (C_3) e 165,2 ($\text{C}=\text{O}$).

[6]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.87): 3435, 3065, 2938, 2843, 1687, 1623, 1597, 1512, 1443, 1428, 1414, 1316, 1254, 1172, 1026, 936, 826, 685, 564, 527 e 513.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.88): 178 (89, M^+), 161 (34), 133 (26), 118 (17), 107 (11), 102 (12), 92 (16), 91 (23), 89 (80), 77 (86), 75 (19), 69 (22), 63 (100), 53 (30), 50 (57), 45 (81) e 39 (68).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.85): δ 3,80 (s, 3H; O-Me); 6,39 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H2); 6,97 (d, 2H ; $J=8,6$ Hz; H6 e H8); 7,56 (d, 1H; $J=16,0$ Hz; H3); 7,56 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz; H5 e H9); e 12,3 (s, 1H; COOH).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.86): δ : 55,5 (OMe); 113,8 (C6 e C8); 116,7 (C2); 127,1 (C4); 130,2 (C5 e C9); 144,0 (C3); 161,2 (C7) e 168.1 (C=O).

[6a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.91): 3471, 2974, 2933, 1647, 1601, 1513, 1458, 1446, 1430, 1287, 1243, 1175, 1139, 1031, 982, 827, 811, 551 e 525.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.92): 233 (31, M^+), 162 (12), 161 (100), 147 (3), 134 (10), 133 (20), 118 (11), 102 (7), 90 (10), 89 (12), 77 (10), 63 (7) e 42 (13).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.89): δ 1,07 (t, 3H; $J=6.6$ Hz; H2'a); 1,13 (t, 3H; $J=6.6$ Hz; H2'b); 3,30-3,40 (m, 4H; H1'a e H1'b); 3,68 (s, 3H; OMe); 6,60 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 6,77 (d, 2H ; $J=8,8$ Hz; H6 e H8); 7,36 (d, 2H; $J=8,8$ Hz; H5 e H9); e 7,56 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.90): δ 12,9 (C2'a); 14,7 (C2'b); 40,7 (C1'a); 41,9 (C1'b); 54,9 (OMe); 113,8 (C6 e C8); 114,9 (C2); 127,7 (C4); 128,9 (C5 e C9); 141,6 (C3); 160,4 (C7) e 165,6 (C=O).

[6b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.95): 3298, 2959, 2870, 2839, 1650, 1617, 1604, 1542, 1511, 1459, 1254, 1222, 1173, 1028, 971, 826 e 671.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.96): 233 (11, M^+), 175 (54), 162 (11), 161 (100), 133 (24), 120 (11), 117 (16), 101 (3), 90 (15), 77 (20), 63 (13), 13 (24), 41 (30) e 39 (16).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.93): δ 0.94 (d, 6H; $J=6.6$ Hz; $\text{H}_{3'}$); 1.86 (sep, 1H; $J=6.6$ Hz; $\text{H}_{2'}$); 3.21 (t 2H; $J=6.6$ Hz; $\text{H}_{1'}$); 3.77 (s, 3H; OMe); 6.45 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz; H2); 6.69 (sl, 1H; NH); 6.79 (d, 2H; $J=8.8$ Hz; H6 e H8); 7.49 (d, 2H; $J=8.8$ Hz; H5 e H9); e 7.59 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.94): δ 20.1 ($\text{C}_{3'}$); 28.5 ($\text{C}_{2'}$); 47.0 ($\text{C}_{1'}$); 55.1 (OMe); 114.0 (C_6 e C_8); 118.8 (C_2); 127.5 (C_4); 129.1 (C_5 e C_9); 139.9 (C_3); 160.5 (C_7) e 166.5 ($\text{C}=\text{O}$).

[6c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.99): 3283, 2960, 2934, 2859, 1653, 1605, 1552, 1514, 1304, 1284, 1258, 1218, 1176, 1032, 982, 827, 650, 553, 540 e 515.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.100): 247 (3, M^+), 176 (33), 161 (100), 134 (14), 133 (36), 121 (38), 118 (26), 108 (5), 103 (17), 102 (14), 92 (13), 92 (11), 79 (19), 77 (40), 76 (11), 64 (15), 63 (30), 55 (11) e 43 (37).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.97): δ 0.79 (sl, 3H; $\text{H5}'$); 1.23 (ml, 4H; $\text{H4}'$ e $\text{H3}'$); 1.48 (sl 2H; $\text{H2}'$); 1.48 (q, 2H; $J = 6,6$ Hz; $\text{H1}'$); 3.70 (s, 3H; OMe); 6.32 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H2); 6.44 (sl, 1H; NH); 6.72 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H6 e H8); 7.31 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H5 e H9); e 7.59 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.98): δ 13,8 ($\text{C5}'$); 22.3 ($\text{C4}'$); 29,0 ($\text{C3}'$); 29,3 ($\text{C2}'$); 39,6 ($\text{C1}'$); 55,1 (OMe); 114,0 (C6 e C8); 118,7 (C2); 127,5 (C4); 129,1 (C5 e C9); 139,9 (C3); 160,5 (C7) e 166,4 (C=O).

[6d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.103): 3470, 2957, 2931, 2872, 1648, 11683, 1512, 1454, 1443, 1426, 1251, 1210, 1174, 1140, 1032, 981, 826 e 529.

EI-EM (m/z (int. rel.)): 289 (M^+ , 3,5), 160 (100), 132 (27), 120 (12), 118 (16), 102 (11), 90 (15), 89 (17), 77 (17), 43 (11), 42 (18), 41 (37) e 39 (11).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.101): δ 0.86 (ml, 6H; H_4'); 1.23 (ml, 4H; H_3'); 1.49 (ml 4H; H_2'); 3.30 (ql, 4H; $J = 7,0$ Hz; H_1'); 3.71 (s, 3H; OMe); 6.62 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_2); 6.78 (d, 2H; $J=8,5$ Hz; H_6 e H_8); 7.36 (d, 2H; $J=8,5$ Hz; H_5 e H_9); e 7.57 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.102): δ 13,6 ($\text{C}_4'\text{a}$); 13,7 ($\text{C}_4'\text{b}$); 19,8 ($\text{C}_3'\text{a}$); 20,1 ($\text{C}_3'\text{b}$); 29,9 ($\text{C}_2'\text{a}$); 31,7 ($\text{C}_2'\text{b}$); 46,4 ($\text{C}_1'\text{a}$); 47,7 ($\text{C}_1'\text{b}$); 55,0 (OMe); 113,9 (C_6 e C_8); 115,0 (C_2); 127,9 (C_4); 129,0 (C_5 e C_9); 141,6 (C_3); 160,5 (C_7) e 166,0 ($\text{C}=\text{O}$).

[6e]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.107): 3448, 2934, 2863, 1642, 1605, 1586, 1574, 1512, 1453, 1441, 1285, 1246, 1222, 1172, 1040, 1016, 986, 831, 561, 546 e 519.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.108): 245 (19, M^+), 244 (11), 161 (90), 138 (13), 134 (20), 133 (41), 118 (25), 103 (20), 102 (13), 92 (14), 91 (13), 90 (40), 89 (46), 84 (43), 79 (19), 77 (37), 64 (16), 63 (33), 56 (27), 55 (46), 54 (19), 51 (18), 43 (16), 42 (100), 41 (87) e 39 (62)

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.105): δ 1,52 (sl, 6H; H_2' e H_3'); 3,51 (sl, 4H; H_1'); 3,70 (s, 3H; OMe); 6,69 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_2); 6,77 (d, 2H; $J = 8,4$ Hz; H_6 e H_8); 7,36 (d, 2H; $J = 8,4$ Hz; H_5 e H_9); e 7,51 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.106): δ 24,3 (C_3'); 25,3 ($\text{C}_2'a$); 26,4 ($\text{C}_2'b$); 43,0 ($\text{C}_1'a$); 46,6 ($\text{C}_1'b$); 55,0 (OMe); 113,9 (C_6 e C_8); 115,0 (C_2); 127,9 (C_4); 128,9 (C_5 e C_9); 141,5 (C_3); 160,4 (C_7) e 165,3 ($\text{C}=\text{O}$).

[7]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.111): 3430, 2901, 1712, 1501, 1445, 1253, 1243, 1200, 1036, 934, 812 e 661.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.112): 192 (100; M^+), 191 (19), 175 (29), 146 (11), 145 (18), 117 (12), 89 (32), 88 (11), 77 (13), 76 (21), 65 (10), 63 (32), 53 (12), 51 (16), 51 (16), 45 (20) e 39 (25).

RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.109): δ 5,99 (s, 2H; OCH_2O); 6,23 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz; H2); 6,79 (d, 1H; $J = 8,1$ Hz; H8); 6,99 (dd, 1H; $J = 8,1$ Hz e 1,3 Hz; H9); 7,12 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz; H5); e 7,40 (d, 1H; $J = 15,8$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.110): δ 99,8 (OCH_2O); 104,7 (C8); 106,6 (C5); 115,3 (C2); 122,6 (C9); 127,0 (C4); 142,1 (C3); 146,5 (C6); 147,5 (C7); e 166,3 (C=O).

[7a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.115): 3457, 2975, 2932, 2901, 1646, 1598, 1503, 1491, 1447, 1251, 1145, 1038, 929, 811 e 523.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.116): 247 (24; M^+), 176 (18), 175 (75), 147 (13), 146 (13), 145(56), 117 (35), 90 (10), 89 (100), 87 (11), 72 (28), 65 (14), 63 (58), 62 (22), 58 (11), 51 (13), 44 (26), 42 (36) e 39 (33).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.113): δ 1,18 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H2'a); 1,25 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H2'b); 3,40-3,50 (m, 4H; H1'a e H1'b); 5,98 (s, 2H; OCH_2O); 6,65 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 6,79 (d, 1H ; $J=8,0$ Hz; H9); 7,00 (d, 1H; $J=8,0$ Hz; H8); 7,03 (s, 1H; H5) e 7,62 (d, 1H; $J=15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.114): δ 13,1 (C2'a); 14,9 (C2'b); 40,9 (C1'a); 42,0 (C1'b); 101,3 (OCH_2O); 106,2 (C5), 108,3 (C8); 115,6 (C2); 123,5 (C9); 129,7 (C4); 141,8 (C3); 148,0 (C7), 148,7 (C6) e 165,6 (C=O).

[7c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.119): 3298, 2950, 2934, 2864, 1655, 1621, 1612, 1547, 1504, 1491, 1252, 1241, 1042, 970, 927, 825, 807, 736, 647, 594 e 423.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.120): 261 (19; M^+), 190 (53), 176 (35), 175 (89), 147 (12), 146 (16), 145 (56), 135 (40), 117 (29), 90 (10), 89 (100), 72 (12), 65 (16), 62 (17) 41 (58) e 39 (43)

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.117): δ 0.79 (ml, 3H; $\text{H5}'$); 1.24 (ml, 4H; $\text{H3}'$ e $\text{H4}'$); 1.48 (ml, 2H; $\text{H2}'$); 3.28 (q, 2H; $J=6,7$ Hz; $\text{H1}'$); 5.86 (s, 2H; OCH_2O); 6.25 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 6.36 (sl, 1H; NH); 6.66 (d, 1H ; $J=8,0$ Hz; H9); 6.85 (d, 1H; $J=8,0$ Hz; H8); 6.88 (s, 1H; H5) e 7.43 (d, 1H; $J=15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.118): δ 13,8 ($\text{C5}'$); 22.3 ($\text{C4}'$); 29,0 ($\text{C3}'$); 29,2 ($\text{C2}'$); 39,7 ($\text{C1}'$); 101,2 (OCH_2O); 106,2 (C5), 108,3 (C8); 119,1 (C2); 123,6 (C9); 129,2 (C4); 140,1 (C3); 148,0 (C7), 148,8 (C6) e 166,2 (C=O).

[8]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.123): 3140, 2837, 2652, 1692, 1628, 1586, 1503, 1400, 1246, 1203, 1160, 1121, 998, 982, 828, 622, 609, 527 e 513.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.124): 238 (50; M^+), 223 (33), 163 (25), 137 (14), 135 (27), 121 (25), 119 (15), 109 (13), 107 (15), 105 (12), 102 (10), 95 (10), 92 (24), 91 (38), 89 (18), 81 (29), 79 (24), 78 (17), 76 (23), 75 (18), 68 (31), 66 (28), 65 (53), 64 (30), 63 (93), 59 (11), 55 (20), 53 (100), 51 (70), 46 (12), 45 (97), 39 (61) e 38 (32).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- D_6) (Figura 8.121): δ 3,69 (s, 3H, MeO- C_7), 3,82 (s, 6H, MeO- C_6), 6,55 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H2); 7,04 (s, 2H; H5); 7,53 (d, 1H; $J = 16,0$ Hz; H3); e 12,29 (sl, 1H; COOH).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- D_6) (Figura 8.122): δ 56,2 (MeO- C_6), 60,3 (MeO- C_7), 106,0 (C_5); 118,8 (C_8); 123,0 (C_4); 130,1 (C_7); 144,4 (C_3); 153,3 (C_6); e 168,0 ($\text{C}=\text{O}$).

[8a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.127): 3448, 2996, 2969, 2940, 1650, 1597, 1582, 1463, 1421, 1142, 1124, 1002, 993, 983, 857, 828, 782, 617, 601, 522 e 485.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.128): 293 (8; M^+), 221 (21), 102 (10), 77 (22), 76 (11), 72 (29), 63 (24), 58 (34), 56 (31), 51 (21), 44 (51), 42 (100) e 39 (14).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.125): δ 1,10 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; $\text{H2}'\text{a}$); 1,18 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; $\text{H2}'\text{b}$); 3,40 (q, 4H; $J=7,0$ Hz $\text{H1}'\text{a}$ e $\text{H1}'\text{b}$); 3,78 (s, 3H; Me- O-C7); 3,80 (s, 6H; OMe-C6); 6,64 (d, 1H, $J = 15,1$ Hz; H2); 6,66 (s, 2H ; H5 e H9) e 7,53 (d, 1H, $J = 15,1$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.126): δ 12,9 ($\text{C2}'\text{a}$); 14,8 ($\text{C2}'\text{b}$); 40,7 ($\text{C1}'\text{a}$); 42,0 ($\text{C1}'\text{b}$); 55,9 (2xMe-O-C6); 60,6 (OMe-C7); 104,7 (C5 e C9); 116,9 (C2); 130,9 (C4); 139,1 (C7); 142,1 (C3); 153,1 (C6 e C8) e 165,3 (C=O).

[8b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.131): 3305, 1963, 1947, 1656, 1620, 1581, 1545, 1468, 1454, 1418, 1322, 1281, 1241, 1127, 993, 968, 822, 611 e 536.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.132): 293 (5; M^+), 221 (11), 92 (8), 63 (12), 53 (10), 51 (10), 43 (90), 42 (100) e 39 (33).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.129): δ 0.95 (d, 6H; $J=6,8$ Hz; $\text{H}_{3'}$); 1.86 (sep, 1H; $J=6,8$ Hz; $\text{H}_{2'}$); 3.21 (t 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H}_{1'}$); 3.84 (s, 6H; OMe- C_6); 3.86 (s, 3H; Me- O- C_7); 6.20 (t, 1H; $J = 5,7$ Hz; NH); 6.42 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H_2); 6.71 (s, 2H ; H_5 e H_9) e 7.54 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.130): δ 20,1 ($\text{C}_{3'}$); 28,5 ($\text{C}_{2'}$); 47,0 ($\text{C}_{1'}$); 55,9 (2xMe-O- C_6); 60,8 (OMe- C_7); 104,7 (C_5 e C_9); 120,3 (C_2); 130,4 (C_4); 139,3 (C_7); 140,5 (C_3); 153,2 (C_6 e C_8) e 165.9 ($\text{C}=\text{O}$).

[8c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.135): 3287, 2961, 2951, 2928, 2856, 1653, 1619, 1582, 1545, 1129, 966, 819, 692, 610 e 552.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.136): 307 (M^+ , 20), 236(29), 222 (27), 221 (55), 181 (41), 179 (20), 147 (16), 110 (26), 102 (21), 92 (24), 91 (19), 77 (35), 65 (18), 63 (27), 55 (26), 51 (23), 44 (14), 43 (69), e 41 (100).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.133): δ 0.83 (sl, 3H; $\text{H5}'$); 1,26 (sl, 4H; $\text{H4}'$ e $\text{H3}'$), 1,49 (sl, 2H; $\text{H2}'$); 3,30 (t 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H1}'$); 3,79 (s, 9H; OMe-C6 e Me-O-C7); 5,75 (sl, 1H; NH); 6,25 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H2); 6,65 (s, 2H ; H5 e H9) e 7,45 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.134): δ 13,9 ($\text{C5}'$); 22,3 ($\text{C4}'$), 29,1 ($\text{C3}'$); 29,3 ($\text{C2}'$); 39,7 ($\text{C1}'$); 56,1 (2x Me-O-C6); 60,9 (OMe-C7); 104,9 (C5 e C9); 120,3 (C2); 130,5 (C4); 139,3 (C7); 140,6 (C3); 153,4 (C6 e C8) e 165.8 (C=O).

[8d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.139): 3472, 2957, 2933, 2872, 1648, 1601, 1583, 1505, 1456, 1418, 1340, 1127, 1007, 978, 824 e 610.

EI-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.140): 203 (7), 146 (27), 131 (100), 103 (43), 102 (14), 77 (55), 63 (5), 51 (26), 43 (11) e 41 (22).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.137): δ 0.88 (ml, 6H; H_4'); 1,28 (sl, 4H; H_3'); 1,50 (sl, 4H; H_2'); 3,33 (sl, 4H; H_1'); 3,78 (s, 3H; Me- O-C7) 3,80, (s, 6H; OMe-C6); 6,65 (d, 1H, $J = 15,1$ Hz; H_2); 6,65 (s, 2H ; H_5 e H_9) e 7,51 (d, 1H, $J = 15,1$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.138): δ 13,5,3 ($\text{C}_4'\text{a}$); 13,6 ($\text{C}_4'\text{b}$), 19,8 ($\text{C}_3'\text{a}$); 20,0 ($\text{C}_3'\text{b}$); 29,9 ($\text{C}_2'\text{a}$); 31,7 ($\text{C}_2'\text{b}$); 46,4 ($\text{C}_1'\text{a}$); 47,6 ($\text{C}_1'\text{b}$); 55,9 (2xMe-O-C6); 60,6 (OMe-C7); 104,8 (C_5 e C_9); 117,1 (C_2); 130,9 (C_4); 139,3 (C_7); 141,9 (C_3); 153,2 (C_6 e C_8) e 165.8 ($\text{C}=\text{O}$).

[9]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.143): 3448, 2974, 1684, 1626, 1585, 1487, 1425, 1401, 1333, 1306, 1284, 1070, 1008, 980, 817, 708, 545 e 486.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.144): 227 (19), 225 (20; M^+), 147 (12), 102 (56), 101 (14), 91 (23), 77 (10) 76 (25), 74 (40), 63 (24), 62 (14), 51 (64), 50 (60), 45 (100), 39 (25) e 38 (21).

RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.141): 6,57 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H2); 7,60 (d, 2H ; H5; $J = 9,0$; H6); 7,67 (d, 2H ; H5; $J = 9,0$; H5); e 7,57 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) (Figura 8.142): δ 120,4 (C2); 123,8 (C7); 130,4 (C5); 132,1 (C6); 133,8 (C4); 142,9 (C3) e 167,7 (C=O).

[9a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.147): 3438, 2977, 2933, 1649, 1605, 1485, 1455, 1446, 1429, 1139, 1067, 975, 819, 798, 535 e 493.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.148): 283 (11), 281 (11; M^+), 211 (47), 109 (46), 182 (13), 180 (11), 130 (12), 126 (23), 101 (100), 76 (18), 75 (21), 72 (23), 58 (17), 56 (15), 51 (21), 50 (17), 44 (24) e 42 (47).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.145): δ 1,09 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H2'a); 1,16 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; H2'b); 3,30-3,40 (m, 4H; H1'a e H1'b); 6,73 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 7,28 (d, 2H ; $J=8,3$ Hz; H5 e H9); 7,39 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H6 e H8); e 7,53 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.146): δ 12,9 (C2'a); 14,9 (C2'b); 40,9 (C1'a); 42,0 (C1'b); 118,2 (C2); 123,3 (C7); 129,0 (C5 e C9); 131,7 (C6 e C8); 134,1 (C4); 140,7(C3) e 165,2 (C=O).

[9b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.151): 3294, 2968, 2955, 1652, 1619, 1548, 1484, 1470, 1331, 1220, 1071, 1009, 973, 817, 732, 546 e 494.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.152): 283 (7), 281 (7; M^+), 226 (18), 224 (18), 210 (47), 209 (47), 183 (9), 129 (10), 77 (5), 76 (16), 75 (21), 51 (20), 50 (15), 43 (41) e 41 (59).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.149): δ 0.86 (d, 6H; $J=6,8$ Hz; $\text{H}_{3'}$); 1,77 (sep, 1H; $J=6,8$ Hz; $\text{H}_{2'}$); 3,13 (t 2H; $J=6,2$ Hz; $\text{H}_{1'}$); 6,45 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_2); 7,21 (d, 2H ; $J=8,3$ Hz; H_5 e H_9); 7,34 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H_6 e H_8); e 7,45 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.150): δ 20,1 ($\text{C}_{3'}$); 28,5 ($\text{C}_{2'}$); 47,1 ($\text{C}_{1'}$); 121,7 (C_2); 123,5 (C_7); 129,0 (C_5 e C_9); 131,9 (C_6 e C_8); 133,7 (C_4); 139,2(C_3) e 165,8 ($\text{C}=\text{O}$).

[9c]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.155): 3283, 2953, 2928, 2859, 1652, 1619, 1543, 1336, 1217, 1070, 1009, 972, 818, 676 e 503.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.156): 297 (4), 295 (4; M^+), 226 (11), 224 (12), 210 (42), 208 (38), 211 (42), 209 (38), 129 (10), 102 (100), 84 (14), 77 (4), 76 (18), 75 (18), 51 (18), 50 (15), 43 (15), 41 (49) e 39 (24).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.153): δ 0.81 (ml, 3H; $\text{H5}'$); 1,24 (ml, 4H; $\text{H3}'$ e $\text{H4}'$); 1,48 (ml, 2H; $\text{H2}'$); 3,29 (q, 2H; $J=6,6$ Hz; $\text{H1}'$); 6,25 (s, 1H; NH); 6,40 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 7,23 (d, 2H ; $J=8,3$ Hz; H5 e H9); 7,36 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H6 e H8); e 7,46 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.154): δ 13,9 ($\text{C5}'$); 22,3 ($\text{C4}'$); 29,0 ($\text{C3}'$); 29,2 ($\text{C2}'$); 39,8 ($\text{C1}'$); 121,7 (C2); 123,6 (C7); 129,0 (C5 e C9); 131,9 (C6 e C8); 133,8 (C4); 139,2(C3) e 165,7 (C=O).

[9d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.159): 3462, 2958, 2930, 2872, 1650, 1907, 1488, 1426, 1210, 1071, 1009, 979, 815 e 494.

IE-EM (m/z (rel. int.)) (Figura 8.160): 339 (3), 337 (4; M^+), 210 (82), 209 (83), 183 (14), 181 (12), 130 (16), 102 (100), 77 (3), 76 (13), 75 (11), 57 (11), 43 (24), 42 (37), 41 (63) e 39 (19).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.157): δ 0.91-1.05 (m, 6H; H4'a e H4'b); 1,25-1,37 (m, 4H; H3'a e H3'b); 1,50-1,66 (m, 4H; H2'b e H2'b); 3,38-3,42 (m, 4H; $J=8.3$ Hz; H1'a e H1'b); 6,82 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H2); 7,36 (d, 2H ; $J=8,3$ Hz; H5 e H9); 7,48 (d, 2H; $J=8,3$ Hz; H6 e H8); e 7,62 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.158): δ 13,7 (C4'a e C4'b); 19,9 (C3'a); 20,1 (C3'b); 29,9 (C2'a); 31,8 (C2'b); 46,5 (C1'a); 47,7 (C1'b); 118,3 (C2); 123,3 (C7); 129,0 (C5 e C9); 131,8 (C6 e C8); 134,3 (C4); 140,7 (C3) e 165,5 (C=O).

[10]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.163): 3442, 2914, 2820, 1679, 1598, 1525, 1435, 1419, 1369, 1333, 1309, 1262, 1229, 1201, 1187, 1166, 995, 988, 943, 814, 676, 548, 531 e 514.

EI-EM (m/z (int. rel.)) não obtido

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- D_6) (Figura 8.161): 2,97 (s, 6H, Me₂N); 6,21 (d, 1H, J = 15,8; H2); 6,70 (d, 2H ; H5; J = 9,0; H6); 7,47 (d, 1H, J = 15,8 Hz; H3), 7,48 (d, 2H ; H5; J = 9,0; H5), e 12,00 (sl, 1H; O).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- D_6) (Figura 8.162): δ 39,9 (Me₂N) 122,0 (C6); 113,1 (C2); 121,7 (C4); 130,0 (C5); 144,9 (C3); 151,8 (C7) e 168,4 (C=O).

[10a]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.166): 3438, 3288, 2982, 2932, 1638, 1627, 1588, 1528, 1232, 1185, 1171, 1114, 1072, 990, 945, 832, 606 e 515.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.167): 274 (4; $M^+ + 28$), 175 (11), 174 (100), 145 (20), 129 (9), 72 (17), 44 (18) e 42 (14).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.164): δ 1,19 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; $\text{H}_2'\text{a}$); 1,25 (t, 3H; $J=7,0$ Hz; $\text{H}_2'\text{b}$); 3,10 (s, 6H; Me_2N); 3,31 (q, 2H; $J=7,0$ Hz; $\text{H}_1'\text{a}$); 3,41 (q, 2H; $J=7,0$ Hz; $\text{H}_2'\text{a}$); 6,65 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz; H_2); 6,77 (d, 2H; $J=8,8$ Hz; H_6); 7,46 (d, 2H; $J=8,8$ Hz; H_5); e 7,42 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.165): δ 12,8 ($\text{C}_2'\text{a}$); 14,2 ($\text{C}_2'\text{b}$); 38,8 ($\text{C}_1'\text{a}$); 40,3 (Me_2N), 42,1 ($\text{C}_1'\text{b}$); 112,1 (C_6 e C_8); 118,5 (C_2); 122,2 (C_4); 130,8 (C_5 e C_9); 149,1 (C_3); 152,1 (C_7) e 167,5 ($\text{C}=\text{O}$).

[10b]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.170): 3433, 3307, 2960, 2919, 1649, 1568, 1518, 1377, 1183, 1119, 990, 820, 694, 511 e 489.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.171): 175 (13), 174 (100), 146 (22), 144 (10), 130 (12), 77 (11), 72 (6), 57 (21), 43 (25), 42 (17), 41 (54), 40 (11) e 39 (26).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.168): δ 0.88 (d, 6H; $J=6.6$ Hz; H3'); 1.79 (sep, 1H; $J=6.6$ Hz; H2'); 2.99 (s, 6H; Me_2N); 3.11 (t 2H; $J=6.6$ Hz; H1'); 6.59 (d, 2H; $J=8.8$ Hz; H6 e H8); 7.28 (sl, 1H; NH); 7.51 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz; H2); 7.51 (d, 2H; $J=8.8$ Hz; H5 e H9); e 7.84 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.169): δ 20.1 (C3'); 28.5 (C2'); 40.1 (Me_2N); 46.6 (C1'); 111.7 (C6 e C8); 112.9 (C2); 122.4 (C4); 131.5 (C5 e C9); 149.0 (C3); 152.6 (C7) e 162.2 (C=O).

[10d]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.174): 3438, 2959, 2930, 1639, 1600, 1527, 1435, 1187, 1129, 963, 813, 785, 643, 621, 527 e 505.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.175): 330 (2; $M^+ + 28$), 175 (10), 174 (100), 145 (17), 128 (3), 103 (3), 77 (4), 57 (15), 42 (10) e 41 (23).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.172): δ 0.79 (t, 3H; $J = 7,0$ Hz; H4'a); 0.90 (t, 3H; $J = 7,0$ Hz; H4'b); 1,11-1,60 (m, 8H; H2'a, H2'b, H3'a e H3'b); 2,97 (s, 6H; Me_2N); 3,16 (t, 2H; $J = 7,7$, H1'a); 3,37 (t, 4H; $J = 7,7$ Hz; H1'b); 6,56 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz; H2); 6,58 (d, 2H; $J = 8,5$ Hz; H6 e H8); 7,38 (d, 2H; $J = 8,5$ Hz; H5 e H9); e 7,44 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz; H3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.173): δ 13,6 (C4'a); 13,8 (C4'b); 19,8 (C3'a); 20,2 (C3'b); 29,4 (C2'a); 30,1 (C2'b); 40,0 (Me_2N); 44,0 (C1'a); 47,4 (C1'b); 111,7 (C6 e C8); 118,3 (C2); 121,6 (C4); 130,8 (C5 e C9); 149,2 (C3); 152,4 (C7) e 167,8 (C=O).

[10e]

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 8.178): 3441, 2935, 1644, 1629, 1580, 1529, 1449, 1380, 1236, 1179, 1129, 1004, 980, 817, 785, 608, 509 e 424.

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 8.179): 286 (4; $M+28$), 175 (10), 174 (100), 145 (27), 144 (11), 130 (9), 84 (4), 77 (9), 69 (13), 55 (9), 42 (26), 41 (59) e 39 (16).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 8.176): δ 1,57 (sl, 6H; $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{3'}$); 2,97 (s, 6H; Me_2N); 3,28 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz; $\text{H}_{1'a}$); 3,57 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz; $\text{H}_{1'b}$); 6,54 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H_2); 6,56 (d, 2H; $J=9,0$ Hz; H_6 e H_8); 7,38 (d, 2H; $J=9,0$ Hz; H_5 e H_9); e 7,45 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8.177): δ 24,3 ($\text{C}_{3'}$); 25,4 ($\text{C}_{2'a}$); 26,2 ($\text{C}_{2'b}$); 39,9 (Me_2N); 42,0 ($\text{C}_{1'a}$); 47,0 ($\text{C}_{1'b}$); 111,6 (C_6 e C_8); 118,2 (C_2); 121,4 (C_4); 130,8 (C_5 e C_9); 149,5 (C_3); 152,5 (C_7) e 166,2 ($\text{C}=\text{O}$).

3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.5.1 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

3.5.1.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES* (FRESEN) E *C. SPHAEROSPERMUM* (PERZIG)

Os microorganismos utilizados no ensaio antifúngico contra fitopatógenos foram os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC 140 e o *C. sphaerospermum* (Penzig) SPC 491, mantidos pelo Instituto de Botânica de São Paulo. Os fungos são semeados com a ajuda de uma alça de platina na superfície de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e incubadas a 22 °C, no escuro, por 14 dias. A extração dos esporos foi realizada com uma solução de sais minerais e glicose na proporção de 6:1 e o auxílio de um pincel. A suspensão foi então filtrada em um funil contendo gaze, e estocada à temperatura de -18 °C para posterior nebulização nas cromatografias em camada delgada.

Foram preparadas soluções utilizando-se o melhor solvente para cada amostra nas concentrações de 20, 10, 5, e 1 µg/10 µL. As amostras foram então aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada analíticas. Após a eliminação de todo o solvente à temperatura ambiente, as placas eram aspergidas com a suspensão de esporos dos fungos em solução nutritiva. As placas foram finalmente incubadas por 72 horas, no escuro e a uma temperatura de 25 °C. A atividade é detectada pela formação de halos de inibição claros sobre o fundo escuro aonde houve o crescimento dos fungos. Nistatina e miconazol foram utilizados como controles positivos para esses ensaios e ampicilina e cloranfenicol foram utilizados como controles negativos (Homans e Fuchs, 1970).

3.5.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA OS PATÓGENOS HUMANOS

*CANDIDA ALBICANS, C. KRUSEI, C. PARAPSILOSIS E CRYPTOCOCCUS**NEOFORMANS*

Algumas das substâncias foram avaliadas quanto a sua atividade contra as leveduras causadoras de patologias humanas *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. O ensaio foi realizado utilizando a técnica de diluições sucessivas (CLSI, 2002) com modificações de acordo com Rodriguez-Tudela e colaboradores (Rodriguez-Tudela *et al.*, 1996).

A metodologia consiste em, primeiro fazer repicagem das leveduras, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* após 24 horas e *C. neoformans* após 48 horas de cultivo em ágar Sabouraud, composto de peptona, dextrose e ágar, sem adição de cloranfenicol seguido de incubação das culturas a 30°. O inóculo das culturas é então preparado, de forma a se obter uma solução final contendo de $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ células e, em seguida, é feita uma diluição 1:100 em meio RPMI, acrescido de 2% de glicose. As placas de micro diluição foram então montadas, com os extratos vegetais e compostos naturais e sintéticos, e com o controle, realizando as diluições adequadas e acrescentando o inóculo.

Após o inóculo, as placas são incubadas a 30° C, com agitação, por um período de 24 horas para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. Por fim, é feita a leitura visual, onde se determina a Concentração Inibitória Mínima.

3.5.2 ENSAIO PARA INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE

Os ensaios realizados na prospecção para compostos com atividade inibidora de acetilcolinesterase (utilizados no combate a doença de Alzheimer) foi o descrito por Marston e colaboradores (Marston *et al.*, 2002) Os extratos foram dissolvido em metanol (80 mg/mL). Alíquotas de 2,5 mL (200 mg) foram aplicados em placas de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, MERCK). Após a evaporação total do solvente, a placa foi borrifada com uma solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) (**Solução A**) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos e, em seguida, borrifada com a **Solução D**.

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica. Galantamina (1 mg) e fisostigmina (0,3 mg), foram utilizados como controle positivo.

Soluções:

Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto no C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução estoque será armazenada a 4 °C, no momento do uso será adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V;

Solução B: 250 mg de 1-naftil acetato em 100 mL de etanol;

Solução C: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada;

Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

3.5.3 ENSAIO LARVICIDA CONTRA CARRAPATOS *BOOPHILUS MICROPLUS*

A atividade larvicida foi avaliada utilizando-se a metodologia de Shaw (Shaw e Baker, 1966), preparando-se soluções sucessivas das diferentes amostras a serem ensaiadas. Os extratos e substâncias naturais isoladas foram dissolvidas inicialmente em acetona e em seguida adicionou-se água destilada até se atingir 40% v/v e 1mg/mL de amostra. Em seguida a solução foi sucessivamente diluída à metade da concentração, produzindo assim soluções com 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/mL. As larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) foram então submersas em 0,5 mL das respectivas soluções por 5 minutos. Então se efetuou a contagem das larvas vivas e mortas, determinando assim a taxa de sobrevivência.

3.5.4 ENSAIOS DE CITOTOXIDADE

As células utilizadas foram das linhagens tumorais HCT-8 (côlon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (melanoma – humano), que foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI - EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, e mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras a serem analisadas foram diluídas em DMSO puro estéril. Extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL.

A técnica utilizada, do Alamar blue, faz uso de um indicador de óxido-redução, o Alamar Blue ou resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzido por células viáveis a resorufina (róseo e altamente fluorescente) (Zhi-Jun *et al.*, 1997). No ensaio do Alamar blue é quantificado apenas a redução da resazurina a resorufina.

O Alamar blue é um indicador sensível da função mitocondrial (Springer *et al.*, 1998).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^5$ cel/mL para as linhagens HCT-8, MDA-MB435 e SF-295. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste tempo, foram adicionados 10 µl de solução estoque (0,312 mg/ml) de Alamar blue (resazurina, sigma-aldrich Co) em todos os poços e incubados por 4 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, a absorbância foi determinada nos comprimentos de onda de 570nm (estado oxidado) e 595nm (estado reduzido), utilizando um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter).

3.6 ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS E CULTURA DE TECIDO *IN VITRO*

Sementes das espécies em estudo tiveram seu pericarpo (Figura 3.4) removido mecanicamente, com uso de pinça, em seguida foram esterilizadas em 200 mL de solução 30% em volume de água sanitária comercial e duas gotas de sabão, sob agitação, por 15 minutos. As sementes foram então lavadas com água Milli Q previamente autoclavada sob fluxo, até a remoção total da solução utilizada para a esterilização das mesmas.

Figura 3.4 Divisões gerais de um fruto

As sementes, uma vez esterilizadas externamente foram inoculadas em meio sólido MS-62 (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com Agar 7g/L (Aldrich) e sacarose (30g/L), o pH ajustado em $5,7 \pm 0,02$.

Após a germinação as plântulas foram mantidas no mesmo meio MS-62, indefinidamente, utilizando-se repicagens sucessivas utilizando segmentos nodais (Figura 3.5) em intervalos de aproximadamente 2 meses entre repicagens. As plântulas assim mantidas foram utilizadas como fonte de explantes para as tentativas de obtenção de calos e para as demais análises e experimentos.

Figura 3.5 Obtenção e repicagem de plântulas

Buscou-se paralelamente estabelecer culturas do mesmo material utilizando-se o mesmo meio básico, com a adição de diferente hormônios, ou reguladores de crescimento. Foram preparados meios contendo 6-benzilaminopurina (**BAP**) e ácido naftalenoacético (**ANA**) ou somente ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**). No primeiro caso foram preparadas 4 composições diferentes, contendo 1mg/L de BAP e 10 mg/L de ANA (Tratamento A), 1mg/L de ANA e 10 mg/L de BAP (Tratamento B), 1mg/L de ambos (Tratamento C) e 10 mg/L de ambos (Tratamento D). Para o 2,4-D foram preparados meios contendo 3 concentrações diferentes do regulador, os meios E com 0,5 mg/L; F com 1mg/L e G com 2mg/L. Também foi feito um meio sem a adição dos reguladores.

O procedimento para o preparo dos meios contendo os reguladores não difere muito da preparação do meio em si, sendo adicionado o regulador após a adição de sacarose, antes de ser completado o volume total do meio de cultura e de ser

adicionado o agente gelificante. Para esse experimento foram preparados 300 mL de cada tratamento, e 300 para o controle. Para cada tratamento foram inoculados 4 replicadas de 3 explantes diferentes: discos foliares de diâmetro de aproximadamente 1 cm, segmentos do pecíolo, e raízes, de ambas as espécies.

Tabela 3-1 Composição de reguladores utilizados para obtenção de calos

Tratamento	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)
A	-	1	0,1
B	-	0,1	1
C	-	0,1	0,1
D	-	1	1
E	0,5	-	-
F	1	-	-
G	2	-	-

Para a obtenção das culturas de suspensão foi utilizado o mesmo meio em que foram obtidos os calos, sem a adição do agente gelificante. Os calos utilizados para originar as suspensões em tal procedimento foram então, sob fluxo, adicionados ao meio líquido esterilizado e dispersos com auxílio de uma pinça previamente esterilizada.

3.7 INCORPORAÇÃO DE PRECURSORES MARCADOS

As plântulas com 50 dias e aproximadamente 5 centímetros (comprimento total raiz e caule) foram retiradas do meio de cultura, tiveram suas raízes lavadas com água destilada e foram então imersas em 50 µL de uma solução 0,1 mCi/mL de *L*-fenilalanina-[U-¹⁴C] (comercial 0,1mCi mL⁻¹ e 400 mCi mmol⁻¹) em água destilada

(total de 2 mCi por experimento) ou em 50 μL de uma solução 0,1 mCi/mL de acetato de sódio-[1- ^{14}C] (preparada a partir do comercial 0,75 mCi mL^{-1} e 39mCi mmol^{-1}) Os reagentes utilizados nesse experimento foram ambos fornecidos pela Sigma. Foram utilizadas oito plântulas para cada experimento, para coleta em quatro momentos, em duplicata.

As plântulas foram então deixadas sob um domo, com ambiente com atmosfera saturada de água. Após a absorção do volume inicial contendo o precursor radioativo, o volume foi repetidamente completado com água destilada, a fim de manter as plântulas vivas. Após 5, 10, 23 e 28 horas duas plântulas foram retiradas de cada experimento, maceradas com nitrogênio líquido e sílica e o macerado extraído com 10 mL de acetona e filtrado no algodão. O solvente então foi evaporado para a obtenção dos extratos. Os extratos assim obtidos foram então ressuspensos em 1 mL de acetona e alíquotas de 50 μL retiradas para a determinação da radiação de cada extrato.

Os extratos com maior radioatividade foram então submetidos à CLAE e o solvente coletado minuto a minuto para medição da radiação, utilizando analisador de cintilação líquida (Liquid Scintillation Analyzer-1600 TR, da Packard), após adição de líquido cintilador.

3.8 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EUPOMATENÓIDE-6-SINTASE DE *PIPER REGNELLII*

3.8.1 OBJETIVOS

Em estágio desenvolvido no exterior foi realizado um projeto de treinamento em técnicas de enzimologia do metabolismo secundário, com o objetivo de purificar a enzima responsável pela conversão de conocarpano em eupomatenóide-6 na espécie *P. regnellii*. Esse projeto se insere no estudo do metabolismo fenilpropanoídico em species de *Piper* e trata-se da continuação de projetos desenvolvidos previamente pelo grupo (Benevides *et al.*, 1999; Sartorelli *et al.*, 2001).

Figura 3.6 Última etapa na biossíntese de eupomatenóide-6

3.8.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Folhas jovens frescas de *Piper regnellii* foram colhidas e congeladas imediatamente após serem colhidas, e mantidas a -20 °C até o momento da extração enzimática. As folhas foram pulverizadas em almofariz com nitrogênio líquido. Após maceração foram adicionados 0,1 g de PVPP e 2,5 mL de tampão fosfato 100 mM, pH = 7 com EDTA 2 mM e ascorbato de sódio 10 mM, adicionado

no momento da extração para evitar oxidação. A suspensão então foi filtrada em Miracloth® e então centrifugada por 30 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante, extrato enzimático bruto, foi então fracionado por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quatro frações 0-20 %, 20-50%, 50-80% e 80-100% da saturação. A fração ativa 50-80% foi congelada e mantida a -20 °C até o início das etapas subseqüentes de purificação.

3.8.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

3.8.3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Todas as manipulações foram efetuadas a 4 °C com monitoração a 280 nm. A concentração proteica foi determinada utilizando-se o método Bradford (Bradford, 1976). Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada com o tampão de Laemmli em condição desnaturante, e com gel com gradiente de 4-15% (Laemmli, 1970) e as proteínas foram visualizadas utilizando prata (Morrissey, 1981).

3.8.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNA

A fração 50-80% de saturação foi ressuspensa em tampão fosfato, 25 mM, pH 7 e então aplicada em coluna de Fenil-sefarose (20x1.6 cm). O sistema binário com solvente A sendo tampão fosfato, 25 mM, pH 7 e B sendo o mesmo com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M e o método utilizado consistiu em um fluxo de 2 mL/minuto, inicialmente com A:B 30:70, por 5 minutos, seguindo para A 100%, em 110 minutos e permanecendo por 15 minutos.

As frações ativas foram então reunidas, concentradas e o tampão trocado por

100 % tampão fosfato, 25 mM, pH 7, utilizando Centricon® Plus-70 (Millipore). Em seguida as amostras foram aplicadas em uma coluna de SP-Sepharose (10x1 cm) e eluídas em um sistema binário com A sendo tampão fosfato, 25 mM, pH 7 e B sendo o mesmo com NaCl 2 M. O programa utilizado foi 1mL/min, inicialmente com 100% de A, por 5 minutos, indo a 1.2% de B até t=10 minutos, permanecendo até t=20 minutos e em seguida indo a 6% de B, em t= 85 minutos, seguido por lavagem da coluna com 100% de B por 5 minutos e reequilibrando em 100% de A por 10 minutos.

As frações ativas resultantes da coluna de SP-Sepharose foram então diretamente aplicadas em coluna de hidroxiapatita cerâmica (10x1 cm) e eluídas em sistema binário de com A (tampão fosfato, 25 mM, pH 7) e B (tampão fosfato, 1 mM, pH 7). O programa de eluição utilizado foi 1mL/min, inicialmente com 100% de A, por 5 minutos, indo a 5 % de B até t=10 minutos, permanecendo até t=20 minutos e em seguida indo a 30 % de B, em t= 85 minutos, seguido por lavagem da coluna com 100% de B por 5 minutos e reequilibrando em 100% de A por 10 minutos.

Após a coluna de hidroxiapatita, as frações ativas foram reunidas e novamente concentradas e o tampão trocado por 100 % tampão fosfato, 25 mM, pH 7, utilizando Centricon® Plus-70 (Millipore). Em seguida a amostra foi aplicada em uma coluna Mono-S™ 5/50 GL. Foi utilizado um sistema binário com A sendo tampão fosfato, 25 mM, pH 7 e B sendo o mesmo com NaCl 2 M. O programa utilizado foi 0.35 mL/min, inicialmente com 100% de A, por 5 minutos, indo a 1.2% de B até t=15 minutos, permanecendo até t=30 minutos e em seguida indo a 6% de B, em t= 100 minutos, seguido por lavagem da coluna com 100% de B por 10 minutos e reequilibrando em 100% de A por 15 minutos.

3.8.3.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos para acompanhamento da purificação foram realizados em tampão fosfato 25 mM pH = 7 e realizados utilizando-se 125 µL da fração enzimática, acrescida de 5 µL de conocarpano 10 mM em metanol e 5 µL de H₂O₂ 100mM.

Os ensaios realizados para determinação dos dados de cinética foram realizados utilizando tampão MES (ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfônico) 100 mM, pH = 6,25. Foram realizados ensaios com 91 µL de tampão mais 4,5 µL da solução enzimática obtida após a coluna de hidroxapatita, 4,5 µL de H₂O₂ 100 mM e 10 µL da solução metanólica de (+) ou (-)-conocarpano em concentrações de 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1,25 mM, 0.5 mM, 0,25 mM, 0.1 mM e 0.05 mM e realizados em triplicata.

A temperatura utilizada nos ensaios foi de 30 °C, a menos que seja dito o contrário. As reações foram interrompidas com a adição de uma solução 20% de ácido acético, 30 % água e 50% metanol. Após o término da reação, a mistura reacional foi centrifugada a 5000 rpm por cinco minutos e então injetada no equipamento de CLAE.

A análise dos produtos foi realizada em CLAE em equipamento Waters Alliance 2690, coluna Symmetry Shield RP18 (Waters; 150 × 3.9 mm de diâmetro interno com partículas de 5 µm). O sistema de eluentes utilizado foi de ácido acético 3% em água (A) e acetonitrila (B) e o gradiente foi de 5 a 15% B em 15 min, então para 40% B aos 33 min, 80% B aod 40 min, 95% B de 41 a 43 min, e 5% B a 44 min, o tempo tota de corrida foi de 60 min.

3.8.4 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DO (+) E (-)-CONOCARPANO

O precursor utilizado nas reações enzimáticas, o conocarpano, foi sintetizado utilizando o método descrito por Maeda e colaboradores (Maeda *et al.*, 1994). Esse consiste na dimerização catalisada por Ag_2O de anol (para-hidroxi-propenilfenol) e foi efetuada utilizando-se 134 mg (1mmol) de anol e 139 mg (0.6 mmol) do catalisador, em 15 mL de benzeno com 33% de acetona. O mecanismo dessa reação envolve o acoplamento oxidativo do propenilfenol, com ataque β -5 (Figura 3.7). O tempo de reação foi de 10 horas, quando o substrato foi praticamente totalmente consumido e começou a observar-se a formação de outros produtos (provavelmente resultado de polimerizações e outras reações laterais catalisadas por Ag_2O). A reação foi então interrompida filtrando-se a mistura reacional a fim de se eliminar o Ag_2O . A mistura reacional foi então rota-evaporada e submetida à purificação por cromatografia preparativa em coluna, com sistema de solvente isocrático, com diclorometano e metanol 2%. O rendimento da reação foi de 70 %.

Figura 3.7 Acoplamento oxidativo levando a formação de ($\pm$)-conocarpano

Os isômeros (+)-conocarpano e (-)-conocarpano foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se uma coluna quiracel OD 250×4.6 mm eluída com hexanos:etanol (95:5) com fluxo de 1.0 ml/min^{-1} e detecção a 280 nm, utilizando-se um coletor de frações para coletar os picos de interesse.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER SCUTIFOLIUM*, *P.*

CORCOVADENSIS E *P. TUBERCULATUM*

4.1.1 *PIPER SCUTIFOLIUM* E *P. CORCOVADENSIS*

Utilizando sucessivos procedimentos cromatográficos foram isolados os principais metabólitos secundários de *P. scutifolium* e *P. corcovadensis*. Os extratos tinham em sua composição principalmente amidas, o que se podia antever devido ao gosto pungente e a ação anestésica observada ao mascar suas raízes. O componente principal de ambas as espécies foi a piperovatina (Figura 4.1), composto previamente isolado de algumas espécies de *Piper* e que apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, que incluem inseticida, piscicida, bactericida e anestésica. Essa última possui efeito anestésico sendo responsável por um dos usos mais característicos das plantas que a produzem, para o alívio da dor de dente, que motivou o presente estudo (Costa e Mors, 1981; Pring, 1982; McFerren e Rodriguez, 1998; Antunes *et al.*, 2001; McFerren *et al.*, 2002; Cunico *et al.*, 2004; Facundo *et al.*, 2004 ; Facundo *et al.*, 2005; Cunico *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008).

A estrutura da substância isolada foi proposta inicialmente com base em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 7.1), que apresentou sinais característicos de amidas isobutílicas, com um dubleto em δ 0,92 correspondente às duas metilas ($J=6,7$, 6H), um multiplete (que seria um noneto não fosse o sinal residual de água) em

δ 1,80 (m, $J = 6,7$, 1H), e em δ 3,16 com (t, $J = 6,7$, 2H), correspondente aos hidrogênios metilênicos. Também são evidentes o singlete característico do grupamento metoxila, em δ 3,79 (s, 2H), os sinais em δ 3,42 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H) dos hidrogênios do carbono 6, em δ 5,78 (d, $J = 14,9$ Hz) do hidrogênio 2 e os demais hidrogênios olefínicos entre δ 6,05 e 6,36 (m, 2H). Os hidrogênios aromáticos também são característicos do anel *para*-substituído com dois dubletos ($J = 8,8$) que integram para 2 hidrogênios cada, em δ 6,84 e 7,08. Esses dados e os de RMN de ^{13}C (Figura 7.3) obtidos estão em concordância com os descritos na literatura (Rendón *et al.*, 1998) (Tabela 4-7).

Figura 4.1 Piperovatina

Tabela 4-1 Dados de RMN de piperovatina obtidos em comparação com dados da literatura.

Posição	Dados obtidos		Literatura (Rendón <i>et al.</i> , 1998)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m; J Hz)	δ_{C}
1	-	166,2	-	166,2
2	5,78 (d; 14,9)	122,6	5,78 (d; 14,9)	122,7
3	7,21 (dd; 14,9, 9,7)	140,8	7,21 (dd; 14,9, 10)	140,6
4	6,05-6,36 (m)	129,0	6,12 (dd; 15,2, 10)	129,0
5	6,05-6,36 (m)	141,1	6,20 (dt, 15,2, 6,6)	140,9
6	3,42 (d; 6,6)	38,3	3,42 (d; 6,6)	38,2
7	-	131,1	-	131,1
8	7,08 (d, 8,8)	129,6	7,08 (AA'BB')	129,5
9	6,84 (d, 8,8)	113,9	6,84 (AA'BB')	113,9
10	-	158,1	-	158,1
1'	3,16 (t; 6,7)	46,9	3,16 (dd; 6,7, 6,1)	46,9
2'	1,80 (m, 6,7)	28,6	1,79 (noneto, 6,7)	28,6
3'	0,92 (d, 6,7)	20,1	0,92 (d, 6,7)	20,1
OMe	3,79 (s)	55,3	3,79 (s)	55,2
NH	5,50 (sl)	-	5,49 (sl)	-

A piperovatina foi o constituinte majoritário nos extratos de todos os tecidos (folhas, caule e raízes) de *P. corcovadensis*, de acordo com as análises feitas por CLAE, como é possível observar nos cromatogramas dos mesmos (Figura 4.2, Figura 4.3 e Figura 4.4).

Figura 4.2 Cromatograma de folhas de *P. corcovadensis*

Figura 4.3 Cromatograma de caule de *P. corcovadensis*

Figura 4.4 Cromatograma de raízes de *P. corcovadensis*

Também foram isoladas das folhas de *P. scutifolium* mais cinco amidas, a piperlonguminina e dois isômeros (Figura 4.5), a corcovadina e um isômero (Figura 4.6).

Os primeiros indícios para a caracterização da piperlonguminina foram os sinais característicos de isobutilamidas no espectro de RMN de ^1H (Figura 7.4 e Figura 7.5), semelhante ao observado para a piperovatina. Foram observados sinais em δ 0,94 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H), em δ 1,83 (m, $J = 6,6$ Hz, 1H), e em δ 3,19 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H). O sinal característico, correspondente ao grupamento metilenodioxifenila, é observado em δ 5,97 (s, 2H). Observa-se ainda sinal correspondente ao H2 em δ 5,93 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), ao H3 em δ 7,36 (dd, $J = 14,8$ e 9,8). Entre δ 6,6 e 7,1 observa-se um multipeto correspondente a cinco hidrogênios, o H4 e H5 e os três hidrogênios aromáticos.

O isômero *cis-cis*, isolonguminina, por sua vez apresenta em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 7.7 e Figura 7.8) sinais em δ 0,94 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H), em δ 1,82 (m, $J = 6,6$ Hz, 1H), e em δ 3,16 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H). Além disso, observam-se os

seguintes sinais: em δ 5,69 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), correspondente ao H2; em δ 6,87 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H), correspondente ao H4; em δ 7,46 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H), correspondente ao H3; e finalmente em δ 6,68 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H) observa-se o sinal correspondente ao H5. Os sinais dos hidrogênios aromáticos são observados como um multipeto entre δ 6,60 e 7,10.

Para ambos os isômeros os dados obtidos de RMN (^1H e ^{13}C) (Figura 7.4, Figura 7.5, Figura 7.6, Figura 7.7, Figura 7.8 e Figura 7.9) são condizentes com os da literatura (Tabela 4-2 e Tabela 4-3).

Figura 4.5 Isômeros de piperlonguminina isolados de *P. scutifolium*

Tabela 4-2 Dados de RMN de piperlonguminina em comparação com os da literatura

Posição	Dados obtidos		Literatura (Cunico, 2007)	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1		166,1	-	166,1
2	5,93 (d, 15,8)	122,6	5,91 (d, 14,8)	122,6
3	7,36 (dd, 14,8 e 9,8)	141,0	7,36 (m)	141,0
4	6,6-7,1 (m)	124,6	6,67 (m)	124,6
5	6,6-7,1 (m)	138,8	6,77 (m)	138,8
6	-	130,8	-	130,9
7	6,6-7,1 (m)	105,7	6,97 (d, 1,35)	105,7
8		148,2	-	148,2
9		148,2	-	148,2
10	6,6-7,1 (m)	108,5	6,72 (d, 8,03)	108,5
11	6,6-7,1 (m)	123,2	6,88 (dd, 1,34 e 8,03)	123,2
1'	3,19 (t, 6,6)	47,0	3,90 (t, 6,5)	47,0
2'	1,83 (quinteto, 6,6)	28,6	1,82 (m)	28,6
3'	0,94 (d, 6,6)	20,1	0,93 (d, 6,7)	20,1
OCH ₂ O	5,97 (s)	101,3	5,97 (s)	101,3
NH	5,65 (sl)		5,67 (sl)	-

Tabela 4-3 Dados de RMN de isopiperlonguminina obtidos em comparação com os da literatura

Posição	Dados obtidos		Literatura (Cunico, 2007)	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	-	166,3	-	166,3
2	5,69 (d, 11,4)	122,2	5,68 (d, 11,4)	123,6
3	7,46 (t, 11,4)	136,3	7,47 (t, 11,4)	136,2
4	6,87 (t, 11,4)	123,6	6,87 (t, 11,4)	122,2
5	6,68 (d, 11,4)	135,7	6,68 (d, 11,4)	135,6
6		130,7	-	130,7
7	6,60-7,10 (m)	108,1	6,96 (d, 1,35)	105,7
8	-	147,2	-	148,2
9	-	147,6	-	148,2
10	6,60-7,10 (m)	109,5	6,76 (d, 8,01)	108,1
11	6,60-7,10 (m)	124,9	6,87 (dd, 1,34 e 8,03)	124,8
1'	3,16 (t, 6,4)	46,7	3,17 (t, 7,0)	46,7
2'	1,82 (quint, 6,6)	28,6	1,82 (m)	28,6
3'	0,94 (d, 6,6)	20,1	0,94 (d, 7,0)	20,1
OCH ₂ O	5,97	101,1	5,96 (s)	101,3
NH	6,66 (sl)	-	5,65 (sl)	-

A estrutura da corcovadina (Figura 4.6-A) por sua vez, caracteriza-se pelo sinal no espectro de RMN de ^1H (Figura 7.10 e Figura 7.11) em δ 1,37 (s, 6H), correspondente às metilas 3', também são observados sinais em δ 2,96 (s, 3H) da metila 2'' do grupo acetila e em δ 3,54 (d, J = 6,6 Hz, 2H) correspondente a H1'.

Figura 4.6 Amidas acetiladas de *P. scutifolium*

No espectro observam-se ainda sinais em δ 5,91, (d, J = 14,6 Hz, 1H), correspondente ao H2, em δ 7,30 (dd, J = 9,9 e 14,6 Hz, 1H). Há ainda um multiplete de δ 6,53 a 6,97 que integra para 5 hidrogênios, correspondente a H4, H5, H7, H10 e H11. A corcovadina havia sido isolada previamente apenas de uma espécie, *Ottonia corcovadensis* (Costa e Mors, 1981), que ocorre na mesma região que *P. scutifolium* e os dados obtidos estão de acordo com os relatados e complementamos com a adição dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 7.12)

Tabela 4-4 Dados de RMN obtidos para corcovadina

Posição	Dados obtidos		Literatura (Costa e Mors, 1981)
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)
1		166,3	-
2	5,91 (d, 14,6)	122,6	5,94 (d, 15)
3	7,30 (dd, 14,6 e 9,9)	141,4	7,38 (m)
4	6,5-7,0 (m)	124,5	6,60-6,98 (m)
5	6,5-7,0 (m)	139,0	6,60-6,98 (m)
6	-	130,8	-
7	6,5-7,0 (m)	105,7	6,60-6,98 (m)
8		148,2	-
9		148,2	-
10	6,5-7,0 (m)	108,5	6,60-6,98 (m)
11	6,5-7,0 (m)	123,0	6,60-6,98 (m)
1'	3,54(d, 6,6)	48,1	3,59 (d, 6)
2'	-	82,4	-
3'	1,37 (s)	24,1	1,46 (s)
1''	-	170,9	-
2''	2,96 (s)	22,4	2,02
OCH ₂ O	5,97 (s)	101,3	5,95 (s)
NH	6,25 (sl)		5,58 (sl)

Além das amidas conhecidas, foram ainda isolados isômeros de piperlonguminina e corcovadina com conformação *trans-cis*, denominados scutifoliamida A e B, respectivamente (Figura 4.5-C e Figura 4.6-C). Essas amidas inéditas possuem uma estereoquímica rara em amidas insaturadas apesar de análogos terem sido isolados de outras espécies de *Piper* (*P. arboreum*, *P. brachystachyum*, *P. hoffmanseggianum*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. officinarum* e *P. tuberculatum* (Koul *et al.*, 1988a; da Silva *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2007)

O primeiro indício de que a scutifoliamida A seria um análogo à piperlonguminina foram os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 7.13) característicos de isobutilamidas em δ 3,17 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 1,80 (m, 1H) e 0,93 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H). Entretanto, a substância apresentou nos sinais relativos aos hidrogênios das duplas ligações conjugadas sinais que diferiam e indicaram a estereoquímica diferente (Figura 7.14). Há o sinal em δ 6,00 (d, $J = 14,5$ Hz, 1H), relativo ao hidrogênio 2, semelhante à piperlonguminina, porém o sinal relativo ao hidrogênio 3, apresenta um duplo dubleto em δ 7,72, com $J = 14,5$ e 11,4 Hz, indicando a presença de uma dupla *cis* e uma *trans*. Os demais sinais confirmaram a suposição, com sinais em δ 6,23 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H), 6,62 (d, $J = 11,4$ Hz) relativos aos hidrogênios das posições 4 e 5, respectivamente. O padrão observado está de acordo com os observados em amidas isoladas de *P. tuberculatum* com simetria *cis-trans* (da Silva *et al.*, 2002). Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 7.15) confirmaram a estrutura, apresentando sinais para o carbono carbonílico em δ 166,2, o grupo metilenodioxí em δ 101,2, dez carbonos sp^2 entre δ 147,9 e δ 108,4, e três carbonos alifáticos em δ 47,0 (CH_2), 28,6 (CH) e 20,1 (CH_3), mostrando a estereoquímica diferente, pela diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos C-2 a C-5. A

estrutura foi então confirmada como (2*E*,4*Z*)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ila)-*N*-isobutilpenta-2,4-dienamida, ou scutifoliamida A.

O espectro de RMN de ^1H da scutifoliamida B (Figura 7.18 e Figura 7.19) mostrou um perfil similar ao observado nos espectros da scutifoliamida A, principalmente devido aos sinais dos hidrogênios das duplas conjugadas em δ 5,90 (d, $J = 14.7$ Hz, H2), 6,25 (t, $J = 11.4$, H4), 6,65 (t, $J = 11.4$ Hz, H5) e 7,74 (dd, $J = 14,7$ e $11,4$ Hz, H3), os hidrogênios aromáticos apresentam sinais entre δ 6,74 e 6.98 (m), e o grupo metilenodioxí em δ 5,97 (s, 2H). O espectro dessa amida apresentou também sinais análogos aos observados em corcovadina (Costa e Mors, 1981), um dubleto em δ 3,58 ($J = 6.4$ Hz, 2H) correspondente ao hidrogênio H1', um singlete em δ 1,45 (6H), correspondente aos hidrogênio metílicos H3' e um último sinal em δ 2,03 (s, 3H), do grupo acetóxi. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.20) observam-se carbonos sp^2 entre δ 147,9 e 108,4, o carbono do grupo metilenodioxí em δ 101,2 e duas carbonilas em δ 166,1 (amida) e 170,9 (éster). Além disso, é possível observar os sinais dos carbonos alifáticos em δ 22,4 (CH_3), 24,1 (CH_3) e 82,3 (C), este último sinal correspondente ao carbono carbinólico, confirmando a presença do grupo acetóxi ligado ao carbono C2'. Finalmente confirmando que a estrutura seria a da 1-((2*E*,4*Z*)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ila)penta-2,4-dienamido)-2-metilpropan-2-il acetato, ou scutifoliamida B.

Figura 4.7 Scutifoliamidas A e B

Tabela 4-5 Dados da amidas inéditas Scutifoliamida A e B

Posição	Scutifoliamida A		Scutifoliamida B	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	-	166,2	-	166,1
2	6,00 (d, 14,5)	123,5	5,90 (d, 14,7)	123,6
3	7,72 (dd, 14,5 e 11,4)	136,7	7,74 (dd, 14,7 e 11,4)	137,1
4	6,23 (t, 11,4)	126,4	6,25 (t, 11,4)	126,4
5	6,62 (d, 11,4)	136,1	6,65 (d, 11,4)	136,3
6	-	130,6	-	130,6
7	6,70 – 7,10 (m)	108,4	6,74 – 6,98 (m)	108,4
8	-	147,9	-	147,9
9	-	147,8	-	147,9
10	6,70 – 7,10 (m)	109,2	6,74 – 6,98 (m)	109,3
11	6,70 – 7,10 (m)	125,8	6,74 – 6,98 (m)	125,6
1'	3,17 (t, 6,6)	47,0	3,58 (d, 6,4)	48,2
2'	1,80 (m)	28,6	-	82,3
3'	0,93 (d, 6,6)	20,1	1,45 (s)	24,1
4'	0,93 (d, 6,6)	20,1	1,45 (s)	24,1
C(O)	-	-	-	170,9
CH ₃	-	-	2,03 (s)	22,4
OCH ₂ O	6,02 (s)	101,2	5,97 (s)	101,2

Dados:

Scutifoliamida A:

Sólido branco amorfo.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 7.16): 3304; 1649; 1254

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 7.17): 273 (27, M^+), 216 (14), 201 (54), 173 (53), 143 (33), 135 (10), 122 (6), 115 (100), 96 (28), 89 (19), 83 (5), 63 (20), 57 (21), 41 (33).

Scutifoliamida B:

Sólido branco amorfo

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) (Figura 7.21): 3327; 1732; 1657; 1255 cm^{-1} .

IE-EM (m/z (int. rel.)) (Figura 7.22): 331 (1, M^+), 271 (8), 216 (9), 230 (5), 201 (70), 172 (23), 150 (29), 143 (19), 115 (73), 89 (14), 59 (29), 43 (100).

Além das amidas descritas acima foram ainda isoladas duas aristolactamas, a piperolactama C e a stigmalactama (Figura 4.8), previamente isoladas em outras espécies de *Piper* como foi apresentado na Tabela 1-1 (página 50). Essas lactamas têm ocorrência relativamente restrita, no reino vegetal, às famílias Magnoliales e Ranunculales e apresentam atividade biológica, principalmente citotóxica, que as fazem de grande interesse e vem estimulando diversos estudos relativos a essa classe de compostos (Estevez *et al.*, 1992; Couture *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003; Tabopda *et al.*, 2008).

Figura 4.8 Piperolactama C e stigmalactama

A etapa crucial na purificação dessas lactamas foi o acompanhamento das frações utilizando luz ultravioleta em de 365 nm uma vez que esses compostos são fluorescentes e podem assim ser observados ao longo das etapas cromatográficas. A etapa final de purificação para ambas as aristolactamas foi a cromatografia em coluna de Sephadex com metanol como eluente que se mostrou muito eficiente para a purificação desses compostos.

A stigmalactama foi identificada inicialmente por seu espectro de RMN de ^1H , (Figura 7.23, Figura 7.24 e Figura 7.25) que apresenta três sinais das metoxilas

em δ 3,98, 4,18 e 4,40, característicos de aristolactamas trimetoxiladas. Os demais sinais aparecem no espectro de hidrogênio muito mais desprotegidos em δ 7,09 (dd; $J = 2,6$ e $8,7$; H7), 7,17 (s, H9), 7,72 (d, $J = 8,7$, H8) e 8,64 (d, $J = 2,6$, H5). No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.26) observam-se os sinais relativos às três metoxilas em δ 61,4, 62,1 e 63,3. Há dez sinais de carbonos entre δ 108,0 e 133,0 dos carbono sp^2 . Os sinais relativos aos carbonos ligados a oxigênios em δ 147,5 (C3), 151,3 (C6), 156,9 (C2) e 158,7 (C4), e finalmente há o sinal relativo à carbonila em δ 167,9. No espectro de massas (Figura 7.27) pode-se observar claramente o pico M^+ (m/z 325 e 94 de intensidade relativa). Por fim, o espectro no IV (Figura 7.28) observa-se uma banda intensa e larga em 3381, correspondente ao estiramento O-H, sobreposta a banda de estiramento N-H, e a banda em 1675 relativa ao estiramento C=O.

Figura 4.9 Stigmatalactama

Tabela 4-6 Dados de RMN obtidos para Stigmatalactama em comparação com literatura

Posição	Dados obtidos		Dados da literatura (Chia <i>et al.</i> , 2000)	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	-	126,9	-	126,8
2	-	156,9	-	156,9
3	-	147,5	-	147,5
4	-	158,7	-	158,7
4a	-	127,3	-	127,2
4b	-	117,2	-	117,2
5	8,64 (d, 2,6)	112,2	8,64 (d, 2,8)	112,2
6	-	151,3	-	151,2
7	7,09 (dd; 2,6 e 8,7)	117,6	7,09 (dd; 2,8 e 8,8)	117,5
8	7,72 (d, 8,7)	131,1	7,72 (d, 8,8)	131,1
8a	-	129,4	-	129,3
9	7,17 (s)	108,0	7,17 (s)	108,0
10	-	133,0	-	133,0
11	-	128,6	-	128,6
MeO-2	4,40 (s)	63,3	4,41 (s)	63,2
MeO-3	3,99 (s)	62,1	3,99 (s)	62,1
MeO-4	4,18 (s)	61,4	4,19 (s)	61,4
C=O	-	167,9	-	167,9
OH	n.o.	-	n.o.	-
NH	n.o.	-	n.o.	-

A piperolactama C apresenta um espectro de RMN de ^1H (Figura 7.29, Figura 7.30 e Figura 7.31) também com sinais em δ 4,00, δ 4,20 e δ 4,53 referentes às metoxilas ligadas aos carbonos 3,4 e 2, respectivamente. Em δ 7,26 observa-se um singlete relativo ao hidrogênio do carbono 9; em δ 7,52-7,60, um multipeto relativo aos hidrogênios das posições 6 e 7. Há ainda um sinal referente ao hidrogênio da posição 8 em δ 7,84, como duplo dubleto com J s de 3,6 e 6,1 Hz. Por fim em δ 9,20 observa-se outro duplo dubleto referente ao hidrogênio da posição 5, com J de 3,3 e 6,0 Hz. Devido à pequena quantidade de material isolado não foi possível realizar experimentos de RMN de ^{13}C .

No espectro de massas do composto (Figura 7.32) é possível observar o pico íon molecular de m/z 309 e o espectro no IV (Figura 7.33) é possível observar a banda de estiramento N-H em 3409 cm^{-1} e a banda de estiramento da carbonila em 1692 cm^{-1} .

Figura 4.10 Piperolactama C

Tabela 4-7 Dados RMN de ^1H e ^{13}C de piperolactama C

Posição	Dados obtidos (CD_3OD , 300 MHz)	Dados da literatura (DMSO-D_6 , 100 MHz) (Desai <i>et al.</i> , 1988)
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)
5	9,20 (dd, 3,6 e 6,1)	9,10 d
6	7,52-7,60 (m)	7,57 (m)
7	7,52-7,60 (m)	7,57 (m)
8	7,89 (dd, 3,3 e 6,0)	7,98 (d)
9	7,26 s	7,27 s
MeO-2	4,44 (s)	4,39 s
MeO-3	4,01 (s)	3,93 s
MeO-4	4,20 (s)	4,12 s

A análise cromatográfica dos extratos dos diferentes tecidos de *P. scutifolium* mostram que os principais constituintes dessa espécie foram isolados. Pode-se notar também que o perfil metabólico apresentado por essa espécie é mais diversificado que o observado para *P. corcovadensis*. Alguns dos compostos observados no cromatograma não foram isolados devido, provavelmente, a decomposição durante os procedimentos de purificação. A piperovatina é o composto majoritário observado nos extratos de caule e raiz, entretanto não é o principal componente observado nas folhas que apresentam principalmente a corcovadina e isocorcovadina.

Figura 4.11 Cromatograma das folhas de *P. scutifolium*

Figura 4.12 Cromatograma do caule de *P. scutifolium*

Figura 4.13 Cromatograma das raízes de *P. scutifolium*

4.1.2 *PIPER TUBERCULATUM*

O extrato de *P. tuberculatum* foi fracionado em diversas etapas, a primeira utilizando coluna filtrante originou 43 frações. Inicialmente buscava-se a purificação da piplartina (Figura 4.14). As frações 35 a 41 contendo-a foram reunidas e 200 mg de piplartina foram obtidos através de recristalização em metanol. As frações 10-14 que apresentaram perfil semelhante em cromatografia de camada delgada analítica foram reunidas e subseqüentemente refracionadas por cromatografia em coluna com gradiente de polaridade crescente com hexano e acetato. Após essa coluna as frações 11 a 15 foram submetidas em coluna de Sephadex[®] com metanol como eluente obtendo-se (*E*)-3-(3,4,5-trimetoxicinamato de etila (**11**) (14 mg) e 3,4,5-trimetoxidiidrocinaurato de etila (**12**) (10 mg) (Figura 4.14). As frações 19-20, que apresentaram no espectro de RMN de ¹H sinais indicativos da presença de isobutilamidas, foram reunidas e, após sucessivas etapas cromatográficas, resultaram no isolamento da pelitorina (Figura 4.14)

Figura 4.14: Substâncias isoladas de *Piper tuberculatum*

Piplartina e pelitorina tiveram as suas estruturas determinada por comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 7.34 e Figura 7.35) com aqueles descritos na literatura, o que foi suficiente para sua identificação inequívoca. A piplartina, obtida como cristais brancos, apresentou dados idênticos aos descritos na literatura (Boll *et al.*, 1984; Duh *et al.*, 1990a). A pelitorina é uma das amidas mais conhecidas, devido a sua atividade inseticida, e foi identificada por comparação dos dados de RMN (Figura 7.36 e Figura 7.37) com os disponíveis na literatura (Mandai *et al.*, 1980; Rosario *et al.*, 1996).

Tabela 4-8 Dados obtidos para piplartina

Posição	Dados obtidos		Literatura (Boll <i>et al.</i> , 1984)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	168,3	-	168,3
2	7,26 (d, 15,8)	120,9	7,37 (d, 15,6)	120,8
3	7,53 (d, 15,8)	145,5	7,73 (d, 15,6)	145,0
4	-	130,4	-	120,1
5	6,66 (s)	105,2	6,80 (s)	105,3
6	-	153,1	-	144,6
7	-	139,7	-	139,7
1'	-	-	-	165,3
2'	5,88 (dl, 9,6)	125,5	6,03 (dq, 9,6 e 1,8)	125,4
3'	6,8 (m)	143,4	6,94 (m/d, 9,6)	143,2
4'	2,33 (sl)	24,5	2,45 (t, 7,5)	24,7
5'	3,88 (t, 6,4)	41,4	4,03 (t, 7,5)	41,5
MeO-C6	3,74 (s)	55,9	3,89 (s)	56,0
MeO-C7	3,72 (s)	60,7	3,88 (s)	60,7

Tabela 4-9 Dados obtidos para pelitorina

Posição	Dados obtidos		Literatura (Park <i>et al.</i> , 2002)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	166,5	-	166,4
2	5,84 (d, 14,9)	121,9	5,76 (d; 15)	121,8
3	7,18 (dd, 9,7 e 14,9)	142,8	7,19 (d; 15)	141,27
4	6,0-6,2 (m)	128,2	6,09 (m)	128,20
5	6,0-6,2 (m)	141,0	6,09 (m)	128,20
6	2,13 (dd, 6,6 e 12,7)	32,7	2,13 (dd; 7 e 13,8)	32,9
7	1,2-1,5 (m)	28,4	1,37 (m)	28,5
8	1,2-1,5 (m)	31,2	1,28 (m)	31,4
9	1,2-1,5 (m)	22,3	1,28 (m)	22,5
10	0,88 (t, 6,6)	13,9	0,88 (s)	14,0
1'	3,14 (t, 6,6)	46,9	3,16 (t; 6,4 e 12,9)	46,9
2'	1,8 (sep, 6,6)	28,5	1,76 (m)	28,6
3'	0,91 (d; 6,6)	20,0	0,92 (d)	20,1

Os ésteres aromáticos **11**, previamente isolado de *P. longum* (Kumar *et al.*, 2005) e *Rauvolfia yunnanensis* Tsiang (Geng e Liu, 2008), e **12**, isolado pela primeira vez, mas sintetizados previamente no estudo realizado por Kumar (Kumar *et al.*, 2005), foram identificados com base em seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , EM e IV. O éster **11**, apresentou, no espectro de ^1H (Figura 7.38) um triplete em δ 1,34 (H2', t, $J = 7,0$ Hz) correspondente a três hidrogênios e um quadrupletto em δ 4,27 (H1', q, $J = 7,0$ Hz), correspondente a dois hidrogênios, o que indicou tratar-se de um etiléster. Além desses sinais, o intenso sinal em δ 3,89, correspondente a nove hidrogênios, foi atribuído às três metoxilas. É possível ainda observar os sinais correspondentes à insaturação em δ 6,34 (H2, d, $J = 16,2$), e em δ 7,60 (H3, d, $J = 16,2$). Por fim, o singlete em δ 6,75 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H5 e H9. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.39) foram observados sinais em δ 14,3 (C2'), em 56,1 (MeO-C6 e MeO-C8), 60,5 (C1'), 60,9 (MeO-C7), 105,1 (C5 e C9), 117,5 (C2), 129,9 (C4), 140,0 (C7), 144,5 (C3), 153,4 (C6 e C8) e, finalmente, em 167,0, sendo este último sinal correspondente ao carbono carbonílico (C1). Vale ressaltar que a atribuição dos sinais de ^{13}C encontrados na literatura (Kumar *et al.*, 2005) não estão em concordância com os obtidos, havendo uma inversão na atribuição. Isso pode ser comprovado no espectro da substância **12** (Figura 7.43), onde o sinal correspondente ao carbono sp^2 em δ 117,5 (C2) é substituído pelo sinal em δ 31,3, e o sinal em δ 105,1 (C5 e C9) permanece.

No espectro no infravermelho (Figura 7.40) obtido em solução é possível observar claramente a banda da carbonila em 1731 e 1714 cm^{-1} . É possível visualizar também a banda de estiramento C-O em 1127 cm^{-1} . No espectro de massas (Figura 7.41) é possível observar o pico íon molecular M^+ , de m/z 266 (int. rel. 23).

Tabela 4-10 Dados de RMN de ^{11}B

Posição	Dados obtidos		Literatura (Kumar <i>et al.</i> , 2005)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	167,0	-	167,9
2	6,34 (d, 16,2)	117,5	6,35 (d, 15,9)	105,5*
3	7,60 (d, 16,2)	144,5	7,59 (d, 16,2)	144,9
4	-	129,9	-	130,3
5	6,75 (s)	105,1	6,75 (s)	117,9*
6	-	153,4	-	153,8
7	-	140,0	-	145,2
8	-	153,4	-	153,8
9	6,75 (s)	105,1	6,75 (s)	117,9*
1'	4,27 (q, 7,0)	60,5	4,25 (q, 7,5)	61,3
2'	1,34 (t, 7,0)	14,3	1,34 (t, 7,5)	14,69
C6-OMe	3,88 (s)	56,1	3,88 (s)	56,5
C7-OMe	3,88 (s)	60,9	3,88 (s)	60,8
C8-OMe	3,88 (s)	56,1	3,88 (s)	56,5

* = Atribuição invertida

O composto **12**, obtido pela primeira vez de fonte vegetal, apresentou no espectro de ^1H (Figura 7.42) um tripleto em δ 1,22 (H2', t, $J = 7,1$ Hz) correspondente a três hidrogênios e um quadrupeto em δ 4,11 (H1', q, $J = 7,1$ Hz), correspondente a dois hidrogênios, o que indicou tratar-se também de um etiléster. Além desses sinais foram observados dois tripletos em δ 2,58 (H2, t, $J = 7,1$ Hz) e δ 2,87 (H3, t, $J = 7,1$ Hz) integrando para dois hidrogênios cada, e dois sinais correspondentes às metoxilas, em δ 3,79 (MeO-C7, s) e δ 3,81 (MeO-C6 e MeO-C6, s) correspondentes a três e seis hidrogênios, respectivamente. Por fim, é possível observar um sinal dos dois hidrogênios aromáticos equivalentes em δ 6,40 (H5 e H9, s). No espectro de ^{13}C (Figura 7.43) temos sinais em δ 14,1 (C2'), em δ 31,3 (C3), em δ 36,0 (C3), em δ 55,9 (MeO-C6 e MeO-C8), em δ 60,3 (C1'), em δ 60,7 (MeO-C7), em δ 105,1 (C5 e C9), em δ 136,3 (C4 e C7), em δ 153,1 (C6 e C8) e, finalmente, em δ 172,7 o sinal correspondente ao carbono carbonílico (C1).

O espectro de RMN-2D HSQC obtido para esse composto (Figura 7.44)

mostra claramente que o carbono com sinal em δ 105,1 está conectado aos hidrogênios aromáticos H5 e H9, com sinal em δ 6,40, confirmando a conclusão de que os dados de ^{13}C do composto **11** fornecidos na literatura (Kumar *et al.*, 2005) estão invertidos.

No espectro de infravermelho (Figura 7.45) obtido em solução é possível observar claramente a banda da carbonila em 1732 cm^{-1} , é possível visualizar, também a banda de estiramento C-O em 1128 cm^{-1} . No espectro de massas (Figura 7.46) é possível observar o pico íon molecular M^+ , de m/z 268 (int. rel. 84).

Tabela 4-11 Dados obtidos para 12

Posição	Dados obtidos	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	172,7,0
2	2,58 (t, 7,1)	31,3
3	2,87 (t, 7,1)	36,0
4	-	136,3
5	6,75 (s)	105,1
6	-	153,1
7	-	136,3
8	-	153,1
9	6,40 (s)	105,1
1'	4,11 (q, 7,1)	60,5
2'	1,22 (t, 7,1)	14,1
C6-OMe	3,81 (s)	55,9
C7-OMe	3,79 (s)	60,3
C8-OMe	3,81 (s)	55,9

4.2 SÍNTESE DE DIENAMIDAS

Utilizando-se a reação de Horner-Emmons, de acordo com a metodologia descrita anteriormente, foram sintetizados os ácidos (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienóico **[1]**, (2*E*,4*E*)-5-(3-metoxifenil)penta-2,4-dienóico **[2]** e (2*E*,4*E*)-5-(4-metoxifenil)penta-2,4-dienóico **[3]**. A partir da piperina natural foi obtido por hidrólise o ácido (2*E*,4*E*)-5-(benzo[1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienóico ou ácido pipérico. A partir dos ácidos sintetizados, foram obtidas as amidas de interesse: (2*E*, 4*E*)-*N,N*-dietil-5-fenilpenta-2,4-dienamida **[1a]**, (2*E*, 4*E*)-*N*-isobutil-5-fenilpenta-2,4-dienamida **[1b]**, (2*E*,4*E*)-*N*-pentil-5-fenilpenta-2,4-dienamida **[1c]**, (2*E*,4*E*)-*N,N*-dietil-5-(3-metoxifenil)penta-2,4-dienamida **[2a]**, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-5-(3-metoxifenil)penta-2,4-dienamida **[2b]**, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-5-(4-metoxifenil)penta-2,4-dienamida **[3b]**, (2*E*,4*E*)-5-(4-metoxifenil)-*N*-pentilpenta-2,4-dienamida **[3c]**, (2*E*,4*E*)-*N,N*-dibutil-5-(4-metoxifenil)penta-2,4-dienamida, **[3d]**, (2*E*,4*E*)-5-(4-metoxifenil)-1-(piperidin-1-il)penta-2,4-dien-1-ona **[3e]**, (2*E*,4*E*)-5-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-*N,N*-dietilpenta-2,4-dienamida **[4a]**, (2*E*,4*E*)-5-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-*N*-pentilpenta-2,4-dienamida **[4c]** e (2*E*,4*E*)-5-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-*N,N*-dibutilpenta-2,4-dienamida **[4d]**.

A metodologia utilizada mostrou-se muito eficiente e de fácil execução, envolvendo inicialmente a etapa de extensão da cadeia lateral e formação da dupla ligação com configuração *E* utilizando-se a variação da reação de olefinação de Wittig (Wittig e Schöllkopf, 1954; Wittig e Haag, 1955) conhecida como Horner-Wadsworth-Emmons (Wadsworth e Emmons, 1961), que utiliza fosfonatos, ao invés de fosfinas.

Figura 4.15 Formação do ânion de fosfonocrotonato de dietila, estabilizado pelas estruturas de ressonância

A configuração da ligação dupla obtida pode ser explicada pelo mecanismo proposto (Brandt et al., 1998; Ando, 1999; Clayden et al., 2001), e pela estabilidade do ânion formado pela abstração do hidrogênio do fosfonocrotonato de dietila pelo *n*-BuLi (Figura 4.15). De acordo o mecanismo proposto, o ataque do ânion formado à carbonila ocorre perpendicularmente, para que haja a sobreposição correta do HOMO e LUMO dos reagentes, o que leva a formação de dois fosfoetanos intermediários. A formação do intermediário que levaria a formação do produto *Z* seria o produto cinético, pois no estado de transição os substituintes estariam mais afastados (Figura 4.16, rota A). Por outro lado, o ataque que leva a formação do produto desejado (Figura 4.16, rota B), apesar de mais lento, por ter um estado de transição com maior impedimento estérico, leva ao intermediário mais estável, com os substituintes em posição anti, e também ao produto *trans* mais estável.

Figura 4.16 Mecanismo proposto para olefinação, via A levando ao produto *cis* e via B levando ao produto *trans*

Há também a proposta na qual a rota A seria favorável do ponto de vista estérico na reação tradicional de Wittig, e que a rota B seria estéricamente favorável também na primeira etapa, devido à diminuição do efeito estérico com a substituição do grupo fenila por OEt (Costa *et al.*, 2003). O reagente fosfonocrotonato de dietila forma, como já foi dito, um ânion estabilizado, e isso faz com que a primeira etapa seja reversível, permitindo que o produto formado seja aquele com intermediário e produto final mais estáveis, ou produto termodinâmico.

De fato, utilizando a metodologia descrita foram obtidos apenas os produtos *trans* desejados, não sendo detectados indícios de formação de produtos *cis*. A reação foi realizada com considerável sucesso, como pode ser observado pelos rendimentos obtidos (Tabela 4-12)

Tabela 4-12 Rendimentos na síntese de dienamidas

Produto	Rendimento
1	84%
1a	57%
1b	79%
1c	80%
2	88%
2a	72%
2b	82%
3	78%
3b	62%
3c	71%
3d	52%
3e	64%
4	50%
4a	38%
4c	46%
4d	41%

Os dados obtidos nos espectros no IV indicam claramente que foram obtidos os produtos desejados, como é possível observar pelas bandas características (Tabela 4-13). Foi possível identificar em todos os espectros bandas nas regiões características de compostos carbonílicos (estiramento da ligação C=O) bandas características dos anéis aromáticos (deformação fora do plano das ligações C-H bem como deformação angular das ligações C=C) Foi possível visualizar em todos os espectros as bandas características de duplas ligações com configuração *trans*, de estiramento da ligação C=C, bem como as resultantes da deformação angular da ligação C=C-H. Nos espectros das amidas é possível visualizar, além das bandas mencionadas, a correspondente ao estiramento da ligação C-N. Finalmente, no espectro das amidas secundárias é possível ainda visualizar as bandas de estiramento e de deformação angular da ligação N-H (Silverstein *et al.*, 2007).

Tabela 4-13 Bandas no IV das dienamidas obtidas

Composto	Bandas características no IV (cm^{-1})					
	C=C-H	C=C	N-H	C=O	C-N	Ar
1	939	1621	-	1679	-	756 e 688
1a	969	n.o.	-	1634	1450	755 e 700
1b	989	1614	3292, 1545	1646	1446	755 e 691
1c	990	1615	3287, 1547	1644	1443	745 e 690
2	995	1612	-	1687	-	774 e 679
2a	1044	1605	-	1632	1462	784 e 687
2b	990	1609	3308, 1543	1644	1432	771 e 683
3	1005	1595	-	1680	-	849
3b	988	1600	3295, 1551	1644	1463	822
3c	992	1598	3302, 1535	1645	1469	842
3d	1000	1603	-	1638	1464	838
3e	1007	1603	3046, 1589	1634	1435	838
4	994	1598	-	1671	-	854
4a	1038	1502		1632	1445	806
4c	988	1539	3287	1642	1447	810
4d	930	1593	-	1638	1445	804

Nos espectros de massas das dienamidas foi possível detectar os respectivos íons moleculares ímpares apenas para os compostos **1**, **1b**, **1c**, **2**, **2b**, **3**, **3b**, **3c**, **3e**, **4a** e **4c**. Também é possível observar os picos relativos aos íons acílio, resultado da quebra da ligação C-N, de m/z 157 para os compostos **1x**, 187 para os compostos metoxilados **2x** e **3x** e 201 para os compostos **4x** (Figura 4.17).

Figura 4.17 Íons acílio formados na fragmentação das dienamidas

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostram claramente tratar-se dos compostos esperados. Na etapa de formação dos ácidos, é possível observar que os J observados indicam a formação do isômero *trans*, pelo sinal correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono 5, dupletos de J de aproximadamente 15 Hz, de acordo com o esperado para essa configuração. Também é claramente visível o duplete relativo ao H2, intenso, em torno de δ 6 ppm, com J também de 15 Hz. Os sinais dos hidrogênios aromáticos, nos casos em que foi possível resolver as constantes de acoplamento, estão de acordo com o esperado. No caso dos compostos metoxilados na posição *meta* (**2x**), derivados do *meta*-anisaldeído, foi possível observar o acoplamento em torno de 8 Hz entre os hidrogênios em *orto* em relação um ao outro, bem como, de 2 Hz para os acoplamentos em *meta*. Os compostos com metoxila em posição *para* (**3x**) apresentam dois dupletos

característicos do sistema AA'BB', com J de aproximadamente 8,8 Hz. Para ambas as séries de análogos mono-metoxilados é possível distinguir claramente o sinal relativo à metoxila, em torno de δ 3,8.

Os derivados da piperina apresentam o sinal característico do grupo metilenodioxi, como um singlete em δ 5,9 e é possível também observar os acoplamentos em *orto* de aproximadamente 8 Hz bem como os em *meta* com valores em torno de 1,5 Hz.

No caso dos derivados foi possível visualizar claramente os sinais relativos aos substituintes ligados ao nitrogênio amídico. Para as dietilamidas (**Xa**) é possível observar o sinal das metilas terminais em torno de δ 1,2 como dois tripletos sobrepostos com J de aproximadamente 7,5 Hz, e dos hidrogênios em posição α ao nitrogênio em aproximadamente δ 3,4, como tripletos de J de aproximadamente 7,4 Hz. Os derivados isobutílicos, por sua vez os sinais característicos consistem em um dubleto de $J = 6,6$ Hz em torno de δ 0,94 ppm correspondente a 6 hidrogênios (2 H3'), um multipeto (noneto, normalmente visualizado apenas como quinteto) em torno de δ 1,9 que integra para 1 hidrogênio (H2'), com $J = 6,6$ Hz, e finalmente um tripeito em aproximadamente δ 3,24 com $J = 6,6$ Hz que integra para 2 hidrogênios (H1').

Os derivados *N*-pentano (**Xc**) apresentam um tripeito ou singlete largo em aproximadamente δ 0,8, correspondente aos 3 hidrogênios metílicos (H5'), um singlete largo ou multipeto em δ 1,2, correspondente a 4 hidrogênios (H4' e H3'), outro singlete largo em δ 1,5 integrando para 2 hidrogênios (H2') e finalmente um quarteto em aproximadamente δ 3,3 (H1'). Os derivados *N-N*-dinbutílicos (**d**) os sinais consistem em um multipeto ou singlete largo em torno de δ 0,8 (H4'a e H4'b),

um multiplete em aproximadamente δ 1,25 (H3'a e H3'b), outro multiplete em δ 1,5 (H2'a e H2'b) e, por fim, tem-se dois tripletos ou um multiplete largo em torno de δ 3,3 correspondentes aos hidrogênios α ao nitrogênio (H1'a e H1'b).

Finalmente, os derivados piperidínicos (**e**) apresentam um singlete ou multiplete largo em δ 1,6 integrando para 6 hidrogênios (H3' e H2') e outro multiplete ou singlete largo em aproximadamente δ 3,6 que integra para 4 hidrogênios (H1'a e H1'b).

4.3 SÍNTESE DE CINAMAMIDAS

Utilizando-se a metodologia sintética descrita anteriormente, foram sintetizados os ácidos (*E*)-3-(4-metoxifenil)acrílico (**6**), (*E*)-3-(benzo[1,3]dioxol-5-il)acrílico (**7**), o (*E*)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrílico (**8**), o (*E*)-3-(4-bromofenil)acrílico (**9**) e o (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrílico (**10**). A partir do ácido cinâmico comercial foram sintetizados as amidas *N,N*-dietilcinamamida (**5a**), *N*-isobutilcinamamida (**5b**), *N*-pentilcinamamida (**5c**), *N,N*-dibutilcinamamida (**5d**) e a (*E*)-3-fenil-1-(piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona (**5e**). A partir dos ácidos obtidos de acordo com a metodologia descrita foram sintetizadas as seguintes amidas: (*E*)-*N,N*-dietil-3-(4-metoxifenil)acrilamide (**6a**) (*E*)-*N*-isobutil-3-(4-metoxifenil)acrilamida (**6b**), (*E*)-3-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-*N,N*-dietilacrilamida (**7a**), (*E*)-3-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-*N*-pentilacrilamida (**7c**), (*E*)-*N,N*-dietil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (**8a**), (*E*)-*N*-isobutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (**8b**), (*E*)-*N*-pentil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (**8c**), (*E*)-*N,N*-dibutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (**8d**), (*E*)-3-(4-bromofenil)-*N,N*-dietilacrilamida (**9a**), (*E*)-3-(4-bromofenil)-*N*-isobutilacrilamida (**9b**), (*E*)-3-(4-bromofenil)-*N*-pentilacrilamida (**9c**), (*E*)-3-(4-bromofenil)-*N,N*-dibutilacrilamida (**9d**), (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-*N,N*-dietilacrilamida (**10a**), (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-*N*-isobutilacrilamida (**10b**), (*E*)-*N,N*-dibutil-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilamida (**10d**) e (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona (**10e**).

Figura 4.18 Cinamamidas sintetizadas

A reação utilizando o aparelho de microondas mostrou-se extremamente eficiente e de grande simplicidade operacional, apresentando rendimento considerável (Tabela 4-14) e com um grande ganho de tempo em relação ao procedimento feito com aquecimento convencional, envolvendo refluxo de 3 a 12 horas (McNulty *et al.*, 1998; Ullah e Arafteh, 2009). Com a metodologia descrita foi possível reduzir esse tempo reacional para a faixa de 2 a 5 minutos.

A reação de Döebner já é bastante conhecida e possui um mecanismo proposto (Clayden *et al.*, 2001) que envolve inicialmente a piperidina como base, abstraindo um hidrogênio e formando o diânion enólico do ácido malônico, relativamente estável devido a diversas estruturas de ressonância e carga concentrada nos oxigênios. Em seguida o diânion ataca o aldeído levando a formação do aldol que após, desidratação e descarboxilação concertadas, resulta na formação da dupla ligação desejada.

Figura 4.19 Reação de Knoevenagel, variação de Döbner

Pode-se considerar também que a piperidina além de agir como simples catalisador básico e age também formando, com o aldeído, o intermediário íon imínio, mais reativo.

Figura 4.20 Mecanismo de catalise orgânica com piperidina como catalisador

O primeiro indício de formação dos produtos, na primeira etapa de formação do ácido deu-se pela análise em CCDA, revelando para cada composto um ponto visível sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm), concomitante ao desaparecimento do ponto relativo aos respectivos aldeídos. Todos os produtos obtidos foram recristalizados em etanol a quente após a adição da solução 1:1 v/v de ácido clorídrico para finalizar a reação.

Tabela 4-14 Rendimentos na síntese de cinamamidas

Composto	Rendimento
6	83%
7	89%
8	87%
9	92%
10	61%
5a	87%
5b	92%
5c	95%
5d	85%
5e	73%
6a	62%
6b	75%
6c	70%
6d	43%
6e	59%
7a	34%
7c	47%
8a	57%
8b	67%
8c	41%
8d	42%
9a	40%
9b	52%
9c	47%
9d	45%
10a	69%
10b	72%
10d	58%
10e	36%

No espectro no IV dos produtos foi possível observar bandas características da formação de ácidos e da dupla ligação *trans* (Tabela 4-15). As bandas de carbonila foram observadas em aproximadamente 1680-1700 cm^{-1} . A formação da dupla ligação também pode ser observada por bandas que podem ser atribuídas ao estiramento da dupla ligação conjugada, em torno de 1600 cm^{-1} e também da deformação angular fora do plano da ligação C-H, em torno de 980 cm^{-1} (dados resumidos na Tabela 4-15).

Na reação de formação das amidas a partir dos ácidos sintéticos e obtidos comercialmente (ácido cinâmico), a formação do cloreto de acila foi realizada e a formação do produto acompanhada por análise em CCDA. Uma vez consumido todo o substrato, a mistura reacional foi rotaevaporada, ressolubilizada em THF seco e distribuída em cinco balões para a etapa final de formação das amidas. Novamente a reação foi acompanhada por CCDA. No espectro no IV dos produtos foi possível observar o surgimento de bandas características de amidas, sinais de estiramento C=O em torno de 1650 cm^{-1} , estiramento C-N em torno de 1450. As amidas secundárias apresentam também sinais característicos do estiramento N-H em torno de 3270 cm^{-1} e de deformação angular da mesma ligação em torno de 1550 cm^{-1} (Tabela 4-15).

Nos espectros de ácidos e amidas é possível ainda observar bandas características do anel aromático, em torno de 760 e 700 cm^{-1} para os compostos derivados do ácido cinâmico, com apenas um substituinte, e em torno de 830 cm^{-1} para os demais compostos.

Tabela 4-15 Bandas no IV características das cinamamidas obtidas

Composto	Bandas características no IV (cm ⁻¹)					
	C=C-H	C=C	N-H	C=O	C-N	Ar
5a	977	1595	-	1648	1461	763 e 709
5b	992	1616	3267, 1559	1655	1449	766 e 680
5c	979	1607	3276,1553	1653	1475	764 e 719
5d	977	1607	-	1650	1427	763 e 707
5e	990	1589	-	1644	1441	764 e 707
6	936	1597	-	1687	-	826
6a	982	1601	-	1647	1446	827
6b	971	1604	3298, 1542	1650	1459	826
6c	982	1605	3283, 1552	1653	1426	827
6d	981	1603	-	1648	1453	826
6e	986	1586	-	1642	1445	831
7	934	1615	-	1712	-	812
7a	929	1598	-	1646	1447	811
7c	970	1612	3298, 1547	1655	1439	825
8	998	1586	-	1692	-	828
8a	993	1583	-	1650	1421	828
8b	992	1582	3305, 1545	1656	1418	822
8c	966	1583	3287,1545	1653	1418	819
8d	978	1583	-	1648	1418	824
9	980	1586	-	1684	-	817
9a	975	1584	-	1649	1429	819
9b	973	1586	3294, 1547	1652	1470	817
9c	972	1586	3283, 1543	1652	1485	818
9d	979	1607	-	1650	1426	815
10	995	1596	-	1638	-	814
10a	990	1588	-	1638	1436	832
10b	990	1568	3307, 1568	1649	1436	820
10d	963	1600	-	1639	1435	813
10e	980	1580	-	1644	1449	817

No espectro de massas dos compostos foram observados sinais dos respectivos íons moleculares, com diferentes intensidades relativas, o que confirmou a obtenção dos produtos, com exceção dos compostos **10**, **10a**, **10b**, **10d** e **10e**.

Figura 4.21 Fragmentação e íons acílio característicos de cada esqueleto.

Foi possível observar também íons fragmentários característicos de cada composto, correspondentes a cada conjunto de análogos. Uma das quebras que resultou em fragmentos diagnóstico foi a da ligação C-N, que ocorre de duas formas possíveis: com geração de íons acílio de grande abundância, e a fragmentação

gerando um radical acílio e o cátion característico (Figura 4.22). Também ocorre, por outro lado, a quebra com a formação do radical acílio e com a liberação do radical contendo o nitrogênio (Figura 4.22) e também fragmentos característicos dos diferentes anéis aromáticos com seu respectivos substituintes.

Figura 4.22 Fragmentação levando aos fragmentos característicos dos diferentes N-substituintes

Outra fragmentação que ocorreu gerando íons com grande abundância foi a perda de CO dos íons descritos na Figura 4.21, gerando fragmentos com perda de 28, (Figura 4.23). Nos casos dos compostos trimetoxilados o pico não é observado, sendo detectado apenas o produto da perda da metoxila na forma de CH_2O , gerando o pico com m/z 163.

Figura 4.23 Proposta de fragmentação dos íons acílios

Ainda são observados picos comuns nos espectros de massas de várias amidas. O pico de m/z 77 ($C_6H_5^+$), característico de compostos aromáticos é observado em todos os espectros bem como o pico m/z 41, equivalente a $C_2H_2NH^+$.

Os espectros de RMN obtidos para todos os compostos confirmam inequivocamente as estruturas dos compostos sintetizados. Em todos os compostos foi possível observar dois dubletos com J de aproximadamente 16 Hz, confirmando a configuração *trans* da dupla formada. O primeiro dubleto mais protegido, correspondente ao hidrogênio 2, entre δ 6 e 7, e o segundo desprotegido pelo efeito de ressonância da carbonila conjugada, em torno de δ 7,5.

Os sinais correspondentes aos anéis aromáticos dos derivados sem substituintes (**5**) apresentam multipletos na região de δ 7,10-7,60 que integram para cinco hidrogênios. Os metoxilados (**6**) apresentaram o sinal característico de metoxila como um singleto em torno de δ 3,7 e dois dubletos do sistema AA'BB' na região dos aromáticos. Os derivados com metilenodióxi (**7**) apresentaram um singleto característico de metilenodióxifenilas, em torno de δ 5,9. Os sinais dos hidrogênios aromáticos na região esperada com acoplamento em *meta* com J de aproximadamente 8 Hz. No caso do ácido, foi também possível observar o acoplamento em *meta* com $J = 1,3$ Hz. Os compostos trimetoxilados (**8**) apresentaram sinais de metoxila, em torno de δ 3,7, um singleto das duas metoxilas equivalentes integrando para seis hidrogênios e outro integrando para três da metoxila restante. Nesses compostos os dois hidrogênios aromáticos tem sinal correspondente um singleto entre δ 6,5 e 7,0.

Nos espectro dos compostos bromados (**9**) por sua vez, observa-se um sistema semelhante ao dos compostos metoxilados, AA'BB', porém nesse caso os dois dubletos aparecem mais próximos, provavelmente devido ao efeito mesomérico menos pronunciado no caso do bromo, em comparação com metoxilas. Por fim os compostos com dimetilamina como substituinte (**10x**) apresentaram um singleto

característico das metilas equivalentes ligadas ao nitrogênio, próximo de δ 3. Como no caso dos compostos monosubstituídos com metoxila ou bromo, os hidrogênios aromáticos apresentam um sistema AA'BB'. O efeito de ressonância mais pronunciada do nitrogênio causa uma maior proteção dos substituintes em orto, cujos sinais são observados em aproximadamente δ 6,5 enquanto os sinais dos hidrogênios em *meta* ocorrem em torno de δ 7,5.

Os diferentes *N*-substituintes também geraram sinais claros no espectro de RMN. Os compostos *N,N*-dietil (**XXa**) apresentam no espectro de ^1H dois tripletos em torno de δ 1,2 (em alguns casos um multipletto) (H2'a e H2'b) e dois quedrupletos (não resolvidos em alguns casos) em torno de δ 3,5, ambos com *J* de aproximadamente 7 Hz (H1'a e H1'b). No caso dos derivados isobutílicos (**XXb**) os sinais característicos consistem em um dubleto de *J* = 6,6 Hz em torno de δ 0,94 correspondente a 6 hidrogênios (2 H3'), um multipletto (noneto, normalmente visualizado apenas como quinteto) em torno de δ 1,9 que integra para 1 hidrogênio (H2'), com *J* = 6,6 Hz, e finalmente um triplete em aproximadamente δ 3,24 com *J* = 6,6 Hz que integra para 2 hidrogênios (H1').

Os derivados *N*-pentano (**XXc**) apresentam um triplete ou singletto largo em aproximadamente δ 0,8, correspondente aos 3 hidrogênios metílicos (H5'), um singletto largo ou multipletto em δ 1,2, correspondente a 4 hidrogênios (H4' e H3'), outro singletto largo em δ 1,5 integrando para 2 hidrogênios (H2') e finalmente, um quarteto em aproximadamente δ 3,3 (H1'). Os derivados di-*N*-butílicos (**d**) os sinais consistem em um multipletto ou singletto largo em torno de δ 0,8 (H4'a e H4'b), um multipletto em aproximadamente δ 1,25 (H3'a e H3'b), outro multipletto em δ 1,5 (H2'a e H2'b) e, por fim, dois tripletos ou um multipletto largo em torno de δ 3,3

correspondentes aos hidrogênios em α ao nitrogênio (H1'a e H1'b).

Os derivados piperidínicos (**e**) apresentam um singleto ou multipeto largo em δ 1,6 integrando para 6 hidrogênios (H3' e H2') e outro multipeto ou singleto largo em aproximadamente δ 3,6 que integra para 4 hidrogênios (H1'a e H1'b). No caso de **10b** há dois sinais, um tripleto em δ 3,6 (H1'b) e outro em δ 3,3 (H1'a).

Nas amidas trissubstituídas foi possível observar, uma diferença no deslocamento químico dos hidrogênios H1'a e H1'b, e até nos H2'a e H2'b, devido ao efeito anisotrópico da carbonila. Essa gera um cone de proteção que atua em contraposição ao campo magnético aplicado, blindando núcleos no eixo perpendicular à dupla ligação e desblindando os núcleos que se encontram fora desse “cone” de proteção. No caso, a rotação da ligação C-N é restrita pela ressonância da dupla de elétrons do nitrogênio com a carbonila, um de seus substituintes fica mais próximo a carbonila e sofre um efeito anisotrópico mais pronunciado. Esse efeito fica mais claro nos espectros de ^{13}C , onde se observa claramente a diferença entre os sinais de carbono que seriam equivalentes na ausência desse efeito.

Nos espectros de RMN de ^{13}C é possível observar claramente o sinal do carbono carbonílico em torno de δ 166. É possível ainda observar os sinais dos carbonos ligados diretamente no nitrogênio, em torno de δ 45.

Além disso são claros nos compostos metoxilados (**6** e **8**) estão presentes os sinais dos carbonos ligados ao oxigênio, em torno de δ 56. No caso dos derivados contendo o grupo metilenodioxi o sinal do carbono OCH_2O pode ser observado próximo a δ 100. Os compostos com Br tem sinal do carbono aromático no qual o

heteroátomo está ligado em aproximadamente δ 123. Finalmente, os carbonos ligados ao nitrogênio nos compostos dimetilamino derivados (**10**) apresentam sinal em δ 40.

4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.4.1 ENSAIO CONTRA *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* E *C. SPHAEROSPERMUM*

Os ensaios realizados no Instituto de Botânica de São Paulo foram realizados utilizando-se uma metodologia que apresenta diversas vantagens para a bioprospecção. A técnica é simples, rápida em sua execução e apresenta resultados diretos. Uma vantagem que deve ser levada em consideração é a possibilidade de se realizar os ensaios independente do solvente necessário para a preparação das amostras uma vez que os solvente não permanece na amostra quando a solução de esporos é borrifada e assim os resultados não sofrem interferência dos mesmos e a solubilidade em água não é pré-requisito como em outros ensaios de atividade biológica.

Por outro lado a técnica é indicada para ensaios preliminares devido a pequena resolução e a obtenção de quantidade inibitória mínima de forma não quantitativa. Além disso deve-se considerar a técnica como preliminar uma vez que, da forma realizada nesse caso, os halos de inibição são observados a olho nu, e não por um analizador de imagens, o que seria mais apropriado.

Os compostos foram ensaiados conforme a metodologia descrita em 3.5.1.1 e os resultados podem ser observados na fotografia das placas preparativas reveladas em UV e após a aspersão de esporos e crescimento dos fungos (Figura 4.24). As placas após inspeção visual foram convertidas em uma tabela em que a atividade é indicada pelo número de asteriscos (- = inativa, * = fraca, * * = média e *** = forte) (Tabela 4-16)

Figura 4.24 Placas utilizadas no ensaio antifúngico. 1-piperina; 2-piplartina; 3-piperovatina; 4-piperlonguminina; 5-12; 6-pelitorina; 7-1a; 8-1b; 9-1c; 10-2a ; 11-2b; 12-desconsiderar; 13-3b; 14-3c; 15-3d; 16-3e; 17 a 23- desconsiderar; 24-4a; 25-4c; 26-4d; 27-5a; 28-5b; 29-5c; 30-5d; 31-5e; 32-6a; 33-6b; 34-6c; 35-6d; 36-6e; 37-7a; 38-7c; 39-8a; 40-8b; 41-8c; 42-8d; 43-9a; 44-9b; 45-9c; 46-9d; 47-10a; 48-10b; 49-10c; 50-10d; 51-10e; e P-Nistatina.

Tabela 4-16 Resultado da bioautografia: * = atividade fraca; ** = atividade média; * = atividade forte e - = não detectado.**

Amostras	C. cladosporioides						C. sphaerospermum					
	100ug	50ug	25ug	10ug	5ug	1ug	100ug	50ug	25ug	10ug	5ug	1ug
Piperina	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	**	**
Piplartina	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Piperovatina	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Piperlonguminina	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
12	***	***	***	**	**	*	***	***	***	**	*	-
Pelitorina	**	**	**	*	*	-	**	**	**	*	*	-
1a	***	***	***	***	**	*	***	***	***	**	**	*
1b	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
1c	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
2a	***	**	**	**	**	*	***	**	**	*	*	-
2b	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*
3b	**	**	**	*	*	*	**	**	**	*	*	*
3c	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
3d	***	***	**	*	*	-	***	***	**	*	*	*
3e	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	*
4a	**	**	**	*	*	*	**	**	**	*	*	*
4c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4d	**	**	**	*	*	-	**	**	**	*	*	-
5a	***	***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	*
5b	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
5c	**	**	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*
5d	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	*	*
5e	***	***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	*
6a	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	*
6b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6d	*	*	*	*	-	-	*	*	*	*	-	-
6e	***	***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	*
7a	***	***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	*
7c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8a	*	*	*	-	-	-	*	*	*	-	-	-
8b	*	*	*	-	-	-	*	*	*	-	-	-
8c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8d	*	*	*	*	-	-	*	*	*	*	-	-
9a	***	***	***	***	**	*	***	***	***	***	**	*
9b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
9c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
9d	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	*
10a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10c	**	**	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*
10d	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	-
10e	**	**	**	**	**	-	**	**	**	**	**	-
Nistatina	***	***	**	**	**	**	***	***	**	**	**	**

Pode-se observar que diversos compostos apresentaram limite de detecção igual ao observado para o padrão nistatina. Os compostos naturais piplartina, piperovatina e piperlonguminina apresentaram atividade igual a da nistatina para ambas as espécies de fungo. A piperina, por sua vez, mostrou uma maior atividade contra *C. sphaerospermum*, tão ativa quando o padrão nistatina.

Os compostos sintéticos apresentaram resultados promissores. Os compostos com maior atividade para 1µg não foram os mesmos que apresentaram maior halo de inibição nos “spots” de maior quantidade, havendo um efeito dose-resposta diferente para os diferentes análogos. Os que apresentaram maior atividade final (sombreado mais escuro na Tabela 4-16), foram os compostos **1b**, **1c**, **2b** (para *C. cladosporioides* apenas), **3c**, **5b**, **5c** e **10c** (apenas para *C. cladosporioides*). Assim há, tanto para os compostos sintéticos como naturais, uma maior eficiência na inibição do crescimento dos fungos por parte das isobutilamidas.

É Interessante ressaltar que as dietilamidas estudadas apresentam um halo de inibição muito mais intenso nas maiores concentrações, (sombreado claro na Tabela 4-16) porém não se observa o mesmo nas concentrações menores, como pode ser observado para **1a**, **2a**, **5a**, **5e**, **7a** e **9a** (apesar dos derivado metoxilados apresentarem menor atividade em geral), havendo portanto um efeito dose-resposta pronunciado. O mesmo é observado para os compostos **12**, **3d**, **5e** e **6e**. Seria possível argumentar que esses compostos teriam uma maior difusão ao serem aplicados nas placas de CCDA, entretanto, como pode-se observar na revelação em UV anterior à asperção dos esporos, isso não é o que ocorre. Poder-se-ia propor um limite de sensibilidade acima do qual a atividade seria acentuada e, abaixo desse limite, a atividade cairia exponencialmente. Estudos mais profundos são necessários para compreender o mecanismo de ação desses compostos e para elucidar os

motivos que levam a esse fenômeno.

Foi possível também determinar que os compostos metoxilados ou bromo substituídos como substituinte (**8x** e **9x** exceto **9a**) são sensivelmente menos ativos do que os demais compostos.

O número de duplas ligações pareceu não afetar a atividade observada e em alguns casos foi observada atividade que não se encaixa nas observações gerais acima. É o caso dos compostos **1c**, **3c**, **5c**, **5e**, **6e** e **10c**, que indicam n-pentila, di-n-butila e piperidina como substituintes que poderiam contribuir para a atividade. De maneira geral, a característica que aparentemente leva a uma maior atividade é o anel benzênico não substituído, como pode ser observado pela maior atividade observada para os análogos com essa característica (**1x** e **5x**).

4.4.2 ANTIMICROBIANO CONTRA *CANDIDA ALBICANS*, *C. KRUSEI*, *C. PARAPSILOSIS* E *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Os compostos sintetizados assim como os naturais tiveram seu CIM determinado conforme a metodologia apresentada em materiais e métodos (3.5.1.2) (Tabela 4-17).

Tabela 4-17: Ensaios Antimicrobianos contra patógenos humanos

Substância	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM	CIM	CIM	CIM
Piperina	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL
Piplartina	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL
Corcovadina	250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL
Piperlonguminina	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL
Pelitorina	> 250 µ/mL	250 µ/mL	> 250 µ/mL	125 µ/mL
JVMn 12	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	250 µ/mL
1	250 µ/mL	250 µ/mL	> 250 µ/mL	125 µ/mL
2	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	250 µ/mL
3	250 µ/mL	250 µ/mL	> 250 µ/mL	125 µ/mL
4	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	125 µ/mL
5	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	125 µ/mL
6	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	250 µ/mL
7	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	250 µ/mL
1a	250 µ/mL	125 µ/mL	250 µ/mL	62,5 µ/mL
1b	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL	> 250 µ/mL

As substâncias avaliadas mostraram atividade moderada ou baixa contra as cepas de patógenos avaliadas. Entre os compostos naturais, o único que apresentou atividade um pouco mais elevada foi a pelitorina. O resultado mais positivo foi observado para o composto **1a**, principalmente contra *Cryptococcus neoformans* (Tabela 4-17, em sombreado). Os ácidos carboxílicos também apresentaram uma atividade moderada, mas como apenas as amidas sem substituintes no anel foram avaliadas até o momento, não é possível fazer suposições a respeito das características estruturais que afetam a atividade.

Apesar dos compostos ensaiados terem apresentado atividade moderada, os demais análogos sintetizados estão em fase de avaliação a fim de determinar se a classe como um todo apresenta potencial para futuras investigações.

4.4.3 INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE

O ensaio realizado para avaliar se a atividade inibidora da acetilcolinesterase foi realizada apenas com os compostos sintéticos **1a**, **1b**, **2a**, **2b** e **3b**. Além disso, foram avaliados os compostos naturais piperlonguminina, corcovadina, piperolactama C, piperovatina e piperina. Os demais compostos terão sua atividade avaliada.

Figura 4.25 Galantamina

Figura 4.26 Compostos avaliados para atividade inibidora de acetilcolinesterase.

Todos os compostos foram submetidos a um ensaio preliminar, em que foram aplicados 200 μg de cada substância, a fim de se determinar quais possuiriam atividade. Com base no ensaio preliminar (Figura 4.27) foi possível determinar que os compostos **1b**, **2b**, **3b**, a piperolactama C e a piperina possuem maior atividade.

Figura 4.27 Ensaio anti-acetilcolinesterase preliminar, com 200 µg

Com base no ensaio preliminar foram selecionados os compostos para repetir o ensaio a fim de se determinar a concentração mínima para que a atividade seja observada. A inspeção visual da placa de CCDA após a revelação mostra que o limite de detecção para os compostos **1b** e **2b** foi de 1 µg, para **3b** e piperina o limite foi de 0,3 µg, e para a piperolactama C, o limite foi de 3 µg. O limite de detecção para o controle positivo galantamina foi de 0,1 µg.

Figura 4.28 Determinação do limite de detecção para os os compostos 1b, 2b, 3b, piperolactama C e piperina

Os resultados demonstram o potencial desses compostos com limites de detecção que se aproximam dos limites para galantamina (Figura 4.25). Outros análogos devem ser avaliados para que seja possível obter informações mais precisas a respeito das características estruturais que levariam a uma maior atividade. Também seria necessário realizar ensaios que possibilitem uma avaliação quantitativa da atividade a fim de se delinear modelos estrutura-atividade adequados. Esse resultado é positivo pois atividade para compostos estruturalmente semelhantes ainda não foi descrita, apesar da busca por compostos que possuam essa atividade estar sendo realizada por diversos grupos, levando a um amplo leque de possíveis candidatos ativos (Houghton *et al.*, 2006; Loizzo *et al.*, 2008).

4.4.4 CARRAPATICIDA

O carrapato *Boophilus microplus* tem ampla ocorrência no hemisfério sul e causa grandes perdas na pecuária. O carrapato ocorre com maior abundância no final do período de seca, em meados de setembro e, além de enfraquecer os animais por sua ação em si, causa perdas por danificar o couro dos animais e por ser também um vetor de doenças (Jonsson, 2006; Jonsson *et al.*, 2008).

Figura 4.29 *Boophilus microplus* e bovino infestado pelo parasita

Um grande problema encontrado no controle aos carrapatos é o fato desses desenvolverem rapidamente resistência aos acaricidas utilizados, principalmente amicticas ou piretróides, devido principalmente a sua rápida reprodução (Graf *et al.*, 2004; Jonsson e Hope, 2007; Farias *et al.*, 2008). Assim, em face aos prejuízos e a constante demanda por novos acaricidas, os extratos das espécies *P. scutifolium* e *P. corcovadensis*, bem como seus principais metabólitos secundários foram investigados buscando potenciais acaricidas utilizando-se a metodologia descrita na seção 3.5.3.

Tabela 4-18 Resultado do ensaio contra larvas de *Boophilus microplus*

	vivas	mortas	total	% de mortalidade
Branco				
controle 1	37	0	37	0,00
controle 2	91	10	101	9,90
Amitraz				
Controle positivo (0,21mg/ml)	0	107	107	100,00
<i>P. scutifolium</i> Folha				
1mg/ml	50	6	56	10,71
0,5mg/ml	66	5	71	7,04
0,25mg/ml	60	6	66	9,09
<i>P. scutifolium</i> Raiz				
1mg/ml	0	62	62	100,00
0,5mg/ml	1	55	56	98,21
0,25mg/ml	29	36	65	55,38
<i>P. scutifolium</i> Caule				
1mg/ml	0	102	102	100,00
0,5mg/ml	0	11	11	100,00
0,25mg/ml	9	49	58	84,48
<i>P. corcovadensis</i> Folha				
1mg/ml	32	54	86	62,79
0,5mg/ml	39	20	59	33,90
0,25mg/ml	82	40	145	27,59
<i>P. corcovadensis</i> Raiz				
1mg/ml	0	98	98	100,00
0,5mg/ml	0	112	112	100,00
0,25mg/ml	8	50	58	86,21
<i>P. corcovadensis</i> Caule				
1mg/ml	1	82	83	98,80
0,5mg/ml	52	45	97	46,39
0,25mg/ml	44	5	180	2,78
Piperovatina				
1mg/ml	0	67	67	100,00
0,5mg/ml	0	109	109	100,00
0,25mg/ml	0	55	55	100,00
0,125mg/ml	2	104	106	98,11
0,0625mg/ml	0	76	76	100,00
Isocorcovadina				
1mg/ml	109	0	109	0,00
0,5mg/ml	119	0	119	0,00
0,25mg/ml	15	0	15	0,00
0,125mg/ml	124	11	135	8,15
0,0625mg/ml	15	38	53	71,70
Piperongumimina				
1mg/ml	18	32	50	64,00
0,5mg/ml	106	12	118	10,17
0,25mg/ml	64	31	95	32,63
0,125mg/ml	23	11	34	32,35
0,0625mg/ml	53	28	81	34,57
Isopiperlonguminina				
1mg/ml	57	6	63	9,52
0,5mg/ml	122	0	122	0,00
0,25mg/ml	115	10	125	8,00
0,125mg/ml	102	15	117	12,82
0,0625mg/ml	40	10	50	20,00
Corcovadina				
1mg/ml	102	2	104	1,92
0,5mg/ml	90	0	90	0,00
0,25mg/ml	100	0	100	0,00
0,125mg/ml	63	2	65	3,08
0,0625mg/ml	51	3	54	5,56

Como constatou-se (Tabela 4-18) os extratos dos diferentes tecidos ricos em piperovatina possuem uma considerável atividade carrapaticida. É também clara a atividade sendo apresentada pela piperovatina pura, o que suporta o composto como o principal responsável pela atividade observada nos extratos. O padrão positivo, amitraz, é um dos carrapaticidas mais utilizados e apresenta problemas relacionados à sua toxicidade (Agin *et al.*, 2004; Elinav *et al.*, 2005; Kizil *et al.*, 2008).

Figura 4.30 Amitraz

Os resultados são promissores, indicando que extratos vegetais de espécies que possuem uma alta concentração de piperovatina, como é observado em espécies de *Piper*, principalmente do clado *Ottonia*, constituem candidatos para uso no controle de carrapatos. São alternativas frente ao desenvolvimento de resistência, observada em relação a alguns dos compostos tradicionais que, além disso possuem problemas relacionados à sua toxicidade (Kato *et al.*, 2007).

4.4.5 CITOTOXIDADE

Os ensaios realizados para avaliação da atividade citotóxica contra células de câncer do cólon, glioblastoma e melanoma. Os ensaios foram realizados devido ao potencial antitumoral elevado apresentado pelo composto piplartina, isolado de *P. tuberculatum* (Bezerra *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2007a; Bezerra *et al.*, 2008a; Bezerra *et al.*, 2008b).

Os compostos que foram avaliados até o momento foram o **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **1e**, **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **8**, **8a**, **8b**, **8c** e **8d**. Nenhum dos compostos avaliados apresentou potencial citotóxico elevado, *in vitro*, contrariando as expectativas devido à atividade observada para a piplartina. Apesar desse resultado negativo, a investigação dessa classe de compostos será aprofundada levando em conta possivelmente outros sistemas como *in vivo* em ratos, uma vez que outros compostos já apresentaram resultados negativos *in vitro* e positivos *in vivo* (Bezerra *et al.*, 2008d).

Possivelmente a atividade observada para a piplartina está fortemente relacionada à presença do grupo 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-ona como indicam estudos realizados com análogos sintéticos (Bezerra *et al.*, 2007b) e naturais, como o dímero piperarborenina C (Figura 4.31) isolado de *P. arborescens* (Tsai *et al.*, 2005).

Figura 4.31 Piperarborenina C

4.5 PLÂNTULAS E CULTURA DE CÉLULAS *IN VITRO*

4.5.1 ASPECTOS GERAIS

O estabelecimento de plântulas foi realizado com sucesso para as espécies *P. scutifolium* e *P. corcovadensis*. A metodologia empregada mostrou-se eficiente na descontaminação das sementes utilizadas e foi possível obter uma taxa de germinação de 60%.

Figura 4.32 Plântulas de *P. corcovadensis* germinando e após repicagem.

No caso de *P. corcovadensis* foi possível obter e manter as plântulas por tempo suficiente para analisar seu perfil metabólico, realizando extratos com acetato de etila de plântulas liofilizadas. Neste, foi possível observar a produção de piperovatina como composto majoritário (Figura 4.33), como no caso das plantas adultas *in vivo*, constituindo assim um bom modelo para estudos relativos à biossíntese da piperovatina.

Figura 4.33 Cromatograma do extrato de plântulas de *P. corcovadensis*

No caso de *P. scutifolium*, o cultivo *in vitro* mostrou-se problemático e, após cerca de quatro repicagens, as plântulas mostraram sinais de clorose (Figura 4.34) que levaram eventualmente a perda das plântulas dessa espécie, o que impossibilitou estudos relativos à fitoquímica e metabolismo diferencial da mesma.

Figura 4.34 Início de clorose em plântulas *in vitro*

Antes de serem deflagrados os problemas na propagação das plântulas de *P. scutifolium*, foram realizados os experimentos de morfogênese a partir de explantes

das mesmas, bem como de *P. corcovadensis*. Os teste utilizando 2,4-D não propiciaram resultados satisfatórios resultando, em todas as concentrações e para todos os explantes, na oxidação total e morte dos tecidos. As tentativas iniciais de indução, utilizando-se ANA e BAP levaram a resultados mais promissores.

No caso de *P. scutifolium* os explantes submetidos aos tratamentos B, C e D sofreram oxidação e morte do tecido. Por outro lado, pecíolos submetidos ao tratamento A (ANA 1mg/mL e BAP 0,1 mg/mL) resultaram na formação de calos friáveis a partir dos pecíolos (Figura 4.35) que puderam ser repicados e vem sendo mantidos desde então (Figura 4.36).

Figura 4.35 Formação de calos de *P. scutifolium* a partir de pecíolos

Figura 4.36 Calos de *P. scutifolium* após repicagem

A análise fitoquímica dos calos indicou que não há produção significativa de nenhum dos metabólitos isolados a partir das plantas. Essa observação pode ser

explicada pela grande especificidade observada na produção de metabólitos, normalmente restrita a certas organelas ou tecidos (Verpoorte *et al.*, 2002; Cseke *et al.*, 2006).

Figura 4.37 Organogênese e formação de pelos radiculares em explantes de raiz de *P. corcovadensis* sob tratamento A

No caso de *P. corcovadensis* observou-se no tratamento A para explantes de raiz, a formação de pelos radiculares e organogênese (desenvolvimento de novas plântulas), provavelmente indireta (Figura 4.37). No tratamento B, também nos explantes de raiz, por sua vez foi observada a formação de calos e de pelos radiculares (Figura 4.38). Os demais explantes e tratamentos apresentaram como resultado a morte eventual dos explantes por oxidação, sem desenvolvimento de modificações morfológicas.

Os calos obtidos nesse experimento formam repicados para o mesmo meio no qual foram obtidos, porém não foi obtido crescimento dos mesmos e, com o tempo, o material foi perdido. Não foi possível retomar o estudo e aprofundar a investigação biotecnológica devido à baixa disponibilidade de material, devido à utilização do mesmo para os ensaios na investigação da biossíntese de

piperovatina.

Figura 4.38 Formação de calos e pelos radiculares em explantes de raiz de *P. corcovadensis* sob tratamento B

Os resultados obtidos para a obtenção de cultura de células das espécies em estudo, apesar de não ter se mostrado promissora em termos de produção dos metabólitos e como ferramenta para estudar os mesmos é de validade para pesquisas posteriores. Em pesquisas futuras pode-se buscar a utilização de elicitores ou diferentes composições de meio para incrementar a produção de metabólitos que possam ser de interesse. Ademais, a cultura de tecidos é também utilizada como ferramenta para o estudo do funcionamento celular de plantas, para a obtenção e manutenção de plantas e germoplasma estéreis e para a propagação clonal de plantas (utilizado amplamente na produção de flores, como orquídeas (Murashige, 1974)) (Thorpe, 2007). Assim, como as espécies em estudo são espécies endêmicas de um bioma sob constante pressão, a mata atlântica, as técnicas utilizadas podem ser de serventia para a manutenção, principalmente de *P. scutifolium*, espécie considerada particularmente rara (Guimarães e Giordano, 1997).

4.5.2 BIOSÍNTESE DE PIPEROVATINA, ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DE *L*-FENILALANINA-[U- ^{14}C] E DE ÁCIDO ACÉTICO-[1- ^{14}C]

Como é discutido na seção anterior foi possível obter plântulas de *P. corcovadensis* que apresentam como principal metabólito a piperovatina. Essa plântulas constituem-se assim em um bom modelo para estudos relativos a biossíntese da mesma, conforme a metodologia descrita em 3.7.

Os extratos obtidos para cada momento tiveram sua radiação determinada previamente à análise por CLAE. O Gráfico 4-1 mostra a incorporação em cada experimento, nos quatro momentos avaliados:

Gráfico 4-1: Incorporação dos precursores radioativos

Pode-se observar que houve uma incorporação muito maior no experimento realizado com fenilalanina, com maior radioatividade na amostra recolhida em 5 horas.

Nota-se que houve maior incorporação em $T = 23$ horas para ambos os experimentos, com exceção à incorporação em $T = 5$ horas no experimento de

incorporação de fenilalanina, que foge do padrão geral observado. Assim, os extratos obtidos em T = 23 horas foram utilizados na análise por CLAE.

O experimento realizado com acetato de sódio-[1- 14 C] e com *L*-fenilalanina-[U- 14 C] permitiu observar a incorporação de radioatividade no principal metabólito secundário produzido pelas plântulas de *P. corcovadensis*, a piperovatina, como observa-se nos cromatogramas superimpostos à contagem de decaimentos por minuto (DPM) (Figura 4.39 e Figura 4.40) realizada no material coletado das respectivas corridas de CLAE.

Figura 4.39 Incorporação de acetato de sódio-[1- 14 C]

Figura 4.40 Incorporação de *L*-fenilalanina-[U- 14 C]

Com base nos resultados obtidos com a incorporação dos precursores marcados é possível confirmar a via biossintética proposta para a piperovatina e propor uma rota biossintética para os metabólitos em questão, com origem mista (Esquema 4.1). A próxima etapa necessária para a elucidação da biossíntese desse composto seria a incorporação de precursores marcados com ^{13}C e/ou ^2H a fim de se observar, principalmente, em que etapa da biossíntese da piperovatina ocorre a reação de descarboxilação. A adição de unidades de acetato deveria resultar em uma cadeia de cinco ou sete carbonos e o composto possui seis.

Esquema 4.1 Proposta biossintética para amidas isobutílicas

4.6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EUPOMATENÓIDE-6-SINTASE

Durante o estágio de doutorado desenvolvido na Washington State University tinha-se como objetivo inicial o isolamento e caracterização de enzimas envolvidas na formação de amidas em *P. nigrum*. O projeto inicial apresentou algumas dificuldades associadas a falta de material vegetal com fitoquímica desejada e de informações disponíveis relacionadas a purificação e sequências dos genes envolvidos na formação de amidas. Assim sendo, buscou-se desenvolver outro projeto com espécies de *Piper* que envolvesse as mesmas técnicas do projeto original e que fossem disponíveis na Washington State University. O estudo da biossíntese de neolignanais em *P. regnellii* havia sido iniciada pelo grupo do LQPN-IQ-USP rendendo bons frutos (Benevides *et al.*, 1999; Sartorelli *et al.*, 2001) e, com material lá disponível foram realizados os estudos relativos a última etapa na formação de eupomatenóide-6, a desidrogenação do conocarpano (Figura 4.41).

Figura 4.41 Transformação de conocarpano em eupomatenóide-6

A purificação da enzima responsável pela conversão de conocarpano em eupomatenóide-6 foi realizada com sucesso e permitiu uma análise preliminar de parâmetros cinéticos da mesma. A purificação, conforme descrita em materiais e métodos (Tabela 4-19) resultou em grande purificação enzima utilizando três colunas com diferentes resinas e sistemas de eluentes. Pode-se observar um grande aumento na atividade específica com um ganho final de 590 vezes na

atividade específica após a última coluna.

Tabela 4-19 Etapas de purificação de eupomatenóide-6-sintase

Etapa	Concentração protéica (mg/mL)	Proteína total (mg)	pKat (pmol/sec)	pKat/mg	Fator de purificação
(NH ₄) ₂ SO ₄ (50-80%)	27.5000	440.0000	0.0184	0.0022	1
Fenil	1.0900	21.8000	0.0350	0.1069	48
SP Sepharose	0.0183	0.5931	0.0041	0.7526	338
Hidroxiapatita	0.0443	0.1328	0.0058	1.3142	590

O andamento da purificação foi também acompanhado por SDS-PAGE (Figura 4.42), o que permitiu observar uma diminuição sensível do número de bandas chegando muito próximo da homogeneidade. Pode-se supor que a proteína ativa seja a banda observada em aproximadamente 75 kDa, uma vez que foi observada uma concordância entre a intensidade relativa dessa banda e da atividade enzimática, ao longo dos procedimentos de purificação.

Figura 4.42 SDS-PAGE ilustrando as diferentes etapas de purificação da enzima

Com a proteína parcialmente purificada foram realizados ensaios preliminares para observar o uso de diferentes substratos e co-fatores na atividade enzimática. Inicialmente, para se determinar as condições para os ensaios, foram testados diversos co-fatores e o conocarpano racêmico obtido através de síntese como substrato (3.8.4).

Existe na literatura alguns relatos de enzimas que catalisam reações similares, como na biossíntese de esteróides e ácidos graxos. Essas enzimas, denominadas de desaturases ou desidrogenases, requerem como co-fatores em alguns casos NAD^+ ou NADP^+ (Atawong *et al.*, 2002) e em outros NADH ou NADPH e oxigênio (Taton e Rahier, 1996; Behrouzian e Buist, 2003). Esses co-fatores e as condições utilizadas nos ensaios para tais enzimas foram testados e observou-se

que os mesmos não levavam a atividade da enzima de interesse. Uma família de enzimas que realiza reações muito similares a conversão do conocarpano em eupomatenóide-6 são as flavonas sintases, que realizam a conversão de flavanonas em flavonas (Martens e Mithofer, 2005) (Figura 4.43).

Figura 4.43 Conversão de flavanonas em flavonas, catalizada por flavonas sintases

As flavonas sintases são enzimas dependentes de 2-oxoglutarato, oxigênio molecular e Fe^{2+} . Foram realizados ensaios, de caráter preliminar com objetivo de verificar se a enzima em estudo teria a mesma natureza das flavonas-sintases ou ao menos se possuiria um mecanismo de ação semelhante e poderia utilizar co-fatores semelhantes (Tabela 4-20).

Tabela 4-20 Condições de otimização das condições reacionais

#	Solução de enzima	2-oxoglutarato 10 mM	Fe^{2+} 0,5 mM	EDTA 20 mM	H_2O_2 10 mM	Tampão KPi 50 mM, pH=7
I	100 μL	10 μL	10 μL			200 μL
II	100 μL				10 μL	210 μL
III	100 μL	10 μL	10 μL	10 μL		190 μL
IV	100 μL			10 μL	10 μL	200 μL
V	100 μL		10 μL		10 μL	200 μL

. Os dados obtidos no ensaio (Gráfico 4-2) mostram que a presença ou ausência de Fe^{2+} não afetou a atividade enzimática, bem como a presença ou ausência de EDTA, agente quelante que é forte inibidor da atividade de enzimas metal-dependentes como as flavonas sintases. Foi possível também verificar que 2-

oxoglutarato pode ser utilizado com co-fator, substituindo H_2O_2 , porém possuindo menor eficiência em concentração semelhante. É possível considerar que o 2-oxoglutarato pode atuar gerando peróxido de hidrogênio, o que explicaria o menor rendimento e a possibilidade de utilizá-lo como co-fator.

Gráfico 4-2 Velocidade inicial de reação de desidrogenação com diferentes condições

Ainda é necessária uma análise mais aprofundada e estatisticamente relevante, com dados cinéticos precisos em relação a esses fatores, mais é possível concluir que, ao menos o mecanismo de reação é diferente do observado nas flavonas sintases. Em suma, pode-se concluir pelos ensaios preliminares que se trata de uma enzima que difere das demais descritas para reações desse tipo, podendo ser uma nova família de proteínas com mecanismo de ação inédito uma vez que o principal co-fator necessário para que ocorresse a reação de interesse é H_2O_2 , e a presença dos demais co-fatores não afetou a velocidade da reação observada.

Foram realizados também ensaios para se verificar a velocidade de reação frente aos dois isômeros (+) e (-)-conocarpanos uma vez que, em experimentos

paralelos, observou-se que o conocarpano remanescente após a reação não possuía a mesma proporção dos enantiômeros que a utilizada como substrato para os ensaios. Foram então realizados ensaios de 5 minutos, variando-se a concentração dos diferentes substratos, obtidos de acordo com o procedimento descrito em materiais e métodos (3.8.3.3) (Figura 4.44).

Figura 4.44 Gráfico de cinética da formação de eupomatenóide-6 para (+) e (-)-conocarpano

Com base no resultado acima, adequado à equação de Michaelis-Menten, para cinética de enzimas, é possível estimar o valor de K_m , ou afinidade ao substrato, bem como ter uma idéia relativa dos valores de velocidade máxima ($V_{\max}$) para os dois enantiômeros (valores absolutos de $V_{\max}$ requerem proteína totalmente pura para que se saiba a quantidade exata de proteína utilizada nos ensaios). Os dados indicam, entretanto, um valor de K_m para o (+)-conocarpano de 0,231 e $V_{\max}$ aparente de 0,029 pKat/mg , enquanto para o (-)-conocarpano foram obtidos os valores de $K_m = 0.0145$ e de $V_{\max}$ aparente de 0.038 pKat/mg o que claramente indica uma estereoseletividade com maior afinidade (cerca de 15 vezes maior) e uma maior velocidade (aproximadamente o dobro) para o enantiômero (-)-

conocarpano.

O estudo realizado permitiu um grande aprendizado das técnicas de enzimologia do metabolismo secundário e culminaram na purificação e caracterização parcial de uma enzima do metabolismo fenilpropanoídico de uma espécie de *Piper* estudada por sua química e atividade biológica (Costantin *et al.*, 2001; Luize *et al.*, 2006; Felipe *et al.*, 2008) e permite um conhecimento mais profundo de seu metabolismo. Trata-se ainda de uma enzima estereoseletiva e que, ao que tudo indica, não possui mecanismo descrito em outros casos e nem pertence a famílias conhecidas de enzimas.

5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico de *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis*, espécies de ocorrência restrita à Mata Atlântica indicou um acúmulo preferencial por amidas e piperovatina como o principal metabólito. Essa amida é responsável pela atividade analgésica e consequentemente pelo uso tradicional dessas plantas. Além desta, foram isoladas de *P. scutifolium* outras cinco amidas, duas das quais inéditas e duas aristolactamas. Além dessas espécies também foi realizado o estudo em *P. tuberculatum* para obtenção da piplartina e, ao longo do processo, houve o isolamento da pelitorina e dois ésteres, um de ocorrência rara e outro inédito (JVMn 11 e JVMn 12, respectivamente).

As amidas isoladas foram submetidas a diversos ensaios de atividade biológica e foi observado elevado potencial como antifúngicas, antimicrobianas, carrapaticidas e inibidoras da acetilcolinesterase. Os ensaios de citotoxicidade também são importantes mostrando características fundamentais para a atividade da piplartina, com a perda total da atividade com a remoção do grupo 5,6-dihidropiridin-2(1*H*)-ona.

A avaliação das amidas contra *C. saphaerospermum* e *C. cladosporioides* permitiu estabelecer preliminarmente relações entre estrutura e atividade. Notou-se nesse caso que, dentro das séries com mesmo substituinte, *N-N*-dietilamidas apresentaram maior atividade em maiores concentrações e as *n*-pentil e isobutilamidas apresentaram maior atividade em menores quantidades. Porém, de maneira geral as amidas sem substituintes no anel aromático apresentaram maior atividade. As observações são preliminares e tornam-se necessários outros estudos, sobretudo objetivando a obtenção de dados quantitativos de atividade e descritores

físico-químicos para as amidas, a fim de se determinar relações quantitativas estrutura/atividade.

De forma geral, os compostos estudados demonstram o potencial de se utilizar produtos naturais como ponto de partida na busca por substâncias bioativas (Beghyn *et al.*, 2008). Nesse contexto, os compostos de origem natural são promissores por serem fruto de um “screening” natural, no qual foram eventualmente selecionados por conferirem vantagens adaptativas aos organismos que os produzem. A síntese combinatória para a obtenção de compostos bioativos, amplamente utilizada nas últimas décadas, não resultou em um grande avanço no número de descobertas promissoras (Feher e Schmidt, 2003). Porém, o uso de produtos naturais como ponto de partida para síntese combinatória amplia consideravelmente as chances de sucesso desse esforço, justamente por restringir o universo químico a ser explorado, focando esforços em compostos que possuem maior potencial de afetarem sistemas biológicos (Dobson, 2004; Koch *et al.*, 2005).

Do ponto de vista sintético, a abordagem utilizada foi bem sucedida, permitindo a obtenção de uma grande gama de compostos com poucas etapas, bom rendimento e com economia de átomos adequada. A otimização das reações não foi realizada uma vez que o objetivo central foi a obtenção de amostras para avaliação da atividade biológica. Os produtos obtidos com rendimentos de até 90% indicam a possibilidade de se obter os demais compostos com rendimentos melhores. Outro fato a ser levado em consideração é que os reagentes utilizados, à exceção do fosfonocrotonato de dietila, são de baixo custo.

O estudo dessas espécies também do ponto de vista da pesquisa básica foi frutífero. Além da prospecção por compostos bioativos foi possível obter cultura de tecidos de *P. scutifolium* que pode ser utilizado tanto na tentativa de produção de

compostos naturais, quanto como ferramenta na manutenção de germoplasma para conservação da mesma. Essa espécie se encontra sob ameaça de extinção, devido ao rápido desaparecimento de seu habitat, a Mata Atlântica, e o conhecimento obtido é peça fundamental para o uso sustentável desse bioma.

Estudos dessa natureza produzem conhecimento a cerca da composição química e potencial uso de espécies como fonte de extrato bioativo, bem como um entendimento sobre processos biotecnológicos (a cultura de tecidos) que podem auxiliar na sua preservação. Eles compõem um arcabouço de conhecimento fundamental para a tomada de decisões informadas no futuro levando a exploração e manutenção do enorme potencial biológico desses biomas.

Ao longo do projeto foi também possível desenvolver pesquisas que são de fundamental importância no estudo da química de produtos naturais. Utilizando a espécie *P. corcovadensis* como modelo de estudos foi possível realizar estudos preliminares relativos à biossíntese da piperovatina. Essa amida que possui diversas atividades biológicas descritas não possui nenhum estudo relativo a sua biossíntese e, no presente trabalho, foi possível estabelecer um modelo promissor para tal estudo. Foi possível demonstrar que as plântulas produzem esse composto como principal metabólito e que é possível observar a incorporação tanto de fenilalanina quanto de acetato de sódio marcados com ^{14}C . O estudo, apesar de preliminar, mostra a possibilidade de se utilizar esse modelo nas próximas etapas dessa investigação, com a administração de precursores marcados com ^3H , ^2H e ^{13}C , objetivando determinar com maior precisão as diferentes etapas desse processo, incluindo a localização das posições marcadas.

O estudo realizado sobre a biossíntese da neolignana eupomatenóide-6 de *P. regnellii*, apesar de se relacionar com o restante do trabalho apenas na família

vegetal e via metabólica (fenilpropanoídica), gerou resultados muito interessantes. Por um lado levou ao isolamento de uma enzima desconhecida, estereoseletiva e que, aparentemente, não pertence a nenhuma família conhecida de enzimas. Por outro lado, a experiência permitiu um grande aprendizado em técnicas de biologia molecular e enzimologia que são fundamentais para o estudo do metabolismo.

A química de produtos naturais é uma área verdadeiramente interdisciplinar. O seu estudo integra a química, a bioquímica e a biologia para compreender melhor os processos biológicos do nível celular ao ecológico. Os diferentes níveis de organização são indissociáveis, com produtos naturais sintetizados por organismos através de seu maquinário bioquímico e, ao mesmo tempo, afetam o metabolismo e também o ecossistema que os produzem. Para alcançar um entendimento desse sistema é necessário abordá-lo por diferentes ângulos através das ferramentas disponíveis.

6 BIBLIOGRAFIA

- ABARBRI, M., PARRAIN, J.-L., DUCHÄNE, A. (1998). A Synthetic Approach to Natural Dienamides of Insecticidal Interest. *Synthetic Communications* **28**, 239 - 249.
- ABBOTT, H. C. (1896). Certain chemical constituents of plants in relation to their morphology and evolution. *Bot. Gazz* **11**, 270-272.
- ABDOU, W. M., GANOUB, N. A. F., MAHRAN, M. R. (1992). Organophosphorus chemistry 24¹ Wittig reaction of β -aroylacrylic and cinnamic acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **66**, 79 - 85.
- ABE, Y., KAYAKIRI, H., SATOH, S., INOUE, T., SAWADA, Y., INAMURA, N., ASANO, M., HATORI, C., SAWAI, H., OKU, T., TANAKA, H. (1998). A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B2 Receptor Antagonists. 2. Overcoming the Species Difference between Guinea Pig and Man. *Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 4053-4061.
- ADDAE-MENSAH, I., GIBBS TORTO, F., DIMONYEKA, C. I., BAXTER, I., SANDERS, J. K. M. (1977). Novel amide alkaloids from the roots of *Piper guineense*. *Phytochemistry* **16**, 757-759.
- ADEDIRE, C. O. (2002). Use of nutmeg *Myristica fragrans* (Houtt.) powder and oil for the control of cowpea storage bruchid, *Callosobruchus maculatus* Fabricius. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **109**, 193-199.
- AGIN, H., ÇALKAVUR, S., UZUN, H., BAK, M. (2004). Armitraz poisoning: Clinical and laboratory findings. *Indian Pediatrics* **41**, 482-486.
- AHMED, S., GRAINGE, M. (1986). Potential of the neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development. *Economic Botany* **40**, 201-209.
- ALECIO, A. C., BOLZANI, V. D., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., FURLAN, M. (1998). Antifungal Amide from Leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* **61**, 637-639.
- ANDRADE, E. H. A., CARREIRA, L. M. M., DA SILVA, M. H. L., DA SILVA, J. D., BASTOS, C. N., SOUSA, P. J. C., GUIMARAES, E. F., MAIA, J. G. S. (2008). Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry and Biodiversity* **5**, 197-208.
- ANTUNES, P. A., CHIERICE, G. O., CONSTANTINO, C. J. L., AROCA, R. F. (2001). Spectroscopic characterization of N-isobutyl-6-(p-methoxyphenyl) 2E,4E-hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua*. *Vibrational Spectroscopy* **27**, 175-181.
- APG (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**, 399-

436.

- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, A. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- ARIGONI, D., SAGNER, S., LATZEL, C., EISENREICH, W., BACHER, A., ZENK, M. H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-d-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10600-10605.
- ARMAREGO, W. L. F., CHAI, C. L. L. **Purification of Laboratory Chemicals**. 5th ed. New York: Butterworth-Heinemann. 2003. 608 p.
- ATAWONG, A., HASEGAWA, M., KODAMA, O. (2002). Biosynthesis of Rice Phytoalexin: Enzymatic Conversion of 3 β -Hydroxy-9 β -pimara-7,15-dien-19,6 β -olide to Momilactone A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 566-570.
- BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **51**, 899-902.
- BANERJI, A., BANDYOPADHYAY, D., SARKAR, M., K. SIDDHANTA, A., C. PAL, S., GHOSH, S., ABRAHAM, K., N. SHOOLERY, J. (1985). Structural and synthetic studies on the retrofractamides-amide constituents of *Piper retrofractum*. *Phytochemistry* **24**, 279-284.
- BANERJI, A., BANERJEE, T., SENGUPTA, R., SENGUPTA, P., DAS, C., SAHU, A. (2002). Synthetic and spectroscopic studies of structural analogs of piper amides - The 5-aryl-2E,4E-pentadienamides. *Journal of the Indian Chemical Society* **79**, 876-883.
- BANERJI, A., DAS, C. (1989). Two amides from *Piper brachystachyum*. *Phytochemistry* **28**, 3039-3042.
- BANERJI, J., DHARA, K. P. (1974). Lignan and amides from *Piper sylvaticum*. *Phytochemistry* **13**, 2327-2328.
- BARBIERI JR, E., BARRETO JR, C. B., RIBEIRO, R. C., DE OLIVEIRA, V. H., FREIRE DE LIMA, M. E., MOYA-BORJA, G. E. (2007). Insecticide effects of natural amides from *Piper* and of the synthetic derivative tetrahydropiperine on *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology* **16**, 87-91.
- BARD, M., DOWNING, J. F. (1981). Genetic and biochemical aspects of yeast sterol regulation involving 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of General Microbiology* **125**, 415-420.
- BARI, S. S., SATTAR, M. A., VIG, R., KUMAR, A., VASISHT, N. (1990). Synthesis of pellitorine and sarmentine. Alkamides isolated from *Piper sarmentosum*. *Journal of the Indian*

Chemical Society **67**, 995-996.

BASARAN, P., RODRIGUEZ-CEREZO, E. (2008). Plant molecular farming: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* **28**, 153-172.

BATISTA-PEREIRA, L. G., CASTRAL, T. C., DA SILVA, M. T. M., AMARAL, B. R., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. F. G. F., CORREIA, A. G. (2006). Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **61**, 196-202.

BATISTA JR, J. M., LOPES, A. A., AMBRÓSIO, D. L., REGASINI, L. O., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., CICARELLI, R. M. B., FURLAN, M. (2008). Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 538-540.

BATTERSBY, A. R. (1996). The Marvels of Biosynthesis: Tracking Nature's Pathways. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **4**, 937-964.

BEGHYN, T., DEPREZ-POULAIN, R., WILLAND, N., FOLLEAS, B., DEPREZ, B. (2008). Natural compounds: Leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery. *Chemical Biology and Drug Design* **72**, 3-15.

BEHROUZIAN, B., BUIST, P. H. (2003). Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **68**, 107-112.

BENEVIDES, P. J. C., SARTORELLI, P., KATO, M. J. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* **52**, 339-343.

BENTLEY, R. (1985). The use of stable isotopes at Columbia University's College of physicians and surgeons. *Trends in Biochemical Sciences* **10**, 171-174.

BENTLEY, R. (1999). Secondary metabolite biosynthesis: The first century. *Critical Reviews in Biotechnology* **19**, 1-40.

BENYHE, S. (1994). Morphine: New aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences* **55**, 969-979.

BERNARD, C. B., KRISHANMURTY, H. G., CHAURET, D., DURST, T., PHILOGÈNE, B. J. R., SÁNCHEZ-VINDAS, P., HASBUN, C., POVEDA, L., SAN ROMÁN, L., ARNASON, J. T. (1995). Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 801-814.

BEZERRA, D. P., CASTRO, F. O., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., ELMIRO, F. J. M., COSTA-LOTUFO, L. V. (2006). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from piper. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**, 801-807.

BEZERRA, D. P., CASTRO, F. O. D., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, C., MORAES, M. O. D., SILVEIRA,

- E. R., FRANCISCA, M. A. S. L., M., J., ALENCAR, E. N. M. N. D., MESQUITA, R. O., LIMA, M. W., COSTA-LOTUFO, L. V. (2008a). *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology* **28**, 156-163.
- BEZERRA, D. P., MILITÃO, G. C. G., DE CASTRO, F. O., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., ELMIRO, F. J. M., COSTA-LOTUFO, L. V. (2007a). Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro* **21**, 1-8.
- BEZERRA, D. P., MOURA, D. J., ROSA, R. M., DE VASCONCELLOS, M. C., E SILVA, A. C. R., DE MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., HENRIQUES, J. A. P., COSTA-LOTUFO, L. V., SAFFI, J. (2008b). Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **652**, 164-174.
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., DE ALENCAR, N. M. N., MESQUITA, R. O., LIMA, M. W., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., CHAVES, J. H., SILVEIRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V. (2008c). *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. *Journal of Applied Toxicology* **28**, 599-607.
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., ELMIRO, F. J. M., COSTA-LOTUFO, L. V. (2005). Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **60**, 539-543.
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., MORAES, M. O., MENEZES, J. E. S. A., SILVEIRA, E. R., PESSOA, O. D. L., COSTA-LOTUFO, L. V., 2007b. Structure-activity relationships of piplartine-induced cytotoxicity on human cancer cells., 39^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto - SP.
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., MORAES, M. O. D., ALENCAR, N. M. N. D., MESQUITA, R. O., LIMA, M. W., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., CHAVES, J. H., SILVEIRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V. (2008d). *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. *Journal of Applied Toxicology* **28**, 599-607.
- BIZERRIL, M. X. A., RAW, A. (1998). Feeding behaviour of bats and the dispersal of *Piper* arboreum seeds in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **14**, 109-114.
- BLAGBROUGH, I. S., BRACKLEY, P. T. H., BRUCE, M., BYCROFT, B. W., MATHER, A. J., MILLINGTON, S., SUDAN, H. L., USHERWOOD, P. N. R. (1992). Arthropod Toxins as Leads for Novel Insecticides - an Assessment of Polyamine Amides as Glutamate Antagonists. *Toxicon* **30**, 303-322.
- BODIWALA, H., SINGH, G., SINGH, R., DEY, C., SHARMA, S., BHUTANI, K., SINGH, I. (2007). Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *Journal of Natural Medicines* **61**, 418-421.

- BOLL, P. M., HANSEN, J., SIMONSEN, O., THORUP, N. (1984). Synthesis and molecular structure of piplartine (=piperlongumine). *Tetrahedron* **40**, 171-175.
- BONNET, J., BONNEMOY, F., DUSSER, M., BOHATIER, J. (2008). Toxicity Assessment of the Herbicides Sulcotrione and Mesotrione Toward Two Reference Environmental Microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **55**, 576-583.
- BOUDET, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**, 2722-2735.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161**, 839-851.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- BUZZETTI, F., BRASCA, M. G., CRUGNOLA, A., FUSTINONI, S., LONGO, A., PENCO, S., DALLA ZONCA, P., COMOGLIO, P. M. (1993). cinnamamide analogs as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Farmaco* **48**, 615-636.
- CAI, M., TONG, X., HU, W., HUANG, Y. (2006). Silica-bound poly-4-oxa-6,7-bis(diphenylarsino)heptylsiloxane palladium(0) complex catalyzed Heck arylation of butyl acrylate and acrylamide with aryl halides. *Reactive and Functional Polymers* **66**, 531-536.
- CAMPAIGNE, E. (1955). Wöhler and the overthrow of vitalism. *Journal of Chemical Education* **32**, 403.
- CAMPOS, M. P., CECHINEL FILHO, V., SILVA, R. Z., YUNES, R. A., MONACHE, F. D., CRUZ, A. B. (2007). Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **62**, 173-178.
- CANDOLLE, A. P. **Essai sur les propriétés médicales des plantes, comparées avec leur formes extérieures et leur classification naturelle**. Edn. 1. Paris: Méquignon. 1804
- CARDELLINA, J. H. (1983). Step Gradient Elution in Gel Permeation Chromatography. A New Approach To Natural Products Separations. *Journal of Natural Products* **46**, 196-199.
- CHANDRASEKHAR, S., VENKAT REDDY, M., SRINIVASA REDDY, K., RAMARAO, C. (2000). Addition of carbon nucleophiles to aldehyde tosylhydrazones of aromatic and heteroaromatic-compounds: Total synthesis of piperine and its analogs. *Tetrahedron Letters* **41**, 2667-2670.
- CHATTERJEE, A., DUTTA, C. P. (1967). Alkaloids of *Piper longum* Linn-I. Structure and

- synthesis of piperlongumine and piperlonguminine. *Tetrahedron* **23**, 1769-1781.
- CHATTERJEE, S., NIAZ, Z., GAUTAM, S., ADHIKARI, S., VARIYAR, P. S., SHARMA, A. (2007). Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*). *Food Chemistry* **101**, 515-523.
- CHAURET, D. C., BERNARD, C. B., ARNASON, J. T., DURST, T., KRISHNAMURTY, H. G., SANCHEZ-VINDAS, P., MORENO, N., SAN ROMAN, L., POVEDA, L. (1996). Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *Journal of Natural Products* **59**, 152-155.
- CHAVES, M. C. D. O., DE OLIVEIRA, A. H., SANTOS, B. V. D. O. (2006). Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **34**, 75-77.
- CHEN, J.-J., DUH, C.-Y., HUANG, H.-Y., CHEN, I.-S. (2003). Cytotoxic Constituents of *Piper sintenense*. *Helvetica Chimica Acta* **86**, 2058-2064.
- CHEN, J. J., HUANG, Y. C., CHEN, Y. C., HUANG, Y. T., WANG, S. W., PENG, C. Y., TENG, C. M., CHEN, I. S. (2002). Cytotoxic amides from *Piper sintenense*. *Planta Medica* **68**, 980-985.
- CHEN, Y. C., CHEN, J. J., CHANG, Y. L., TENG, C. M., LIN, W. Y., WU, C. C., CHEN, I. S. (2004). A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. *Planta Medica* **70**, 174-177.
- CHEN, Y. C., LIAO, C. H., CHEN, I. S. (2007). Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. *Phytochemistry* **68**, 2101-2111.
- CHEN, Z. N., YU, P. Z., XU, P. J. (1993). Anti-platelet activating factor constituents, 2,5-diaryltetrahydrofuran type lignans, from *Piper futokadsura* Sied. et Zucc. *Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* **18**, 292-294, 318.
- CHIA, Y.-C., CHANG, F.-R., TENG, C.-M., WU, Y.-C. (2000). Aristolactams and Dioxoaporphines from *Fissistigma balansae* and *Fissistigma oldhamii*. *Journal of Natural Products* **63**, 1160-1163.
- CHOU, C. H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**, 609-636.
- CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press. 2001
- CLSI, C. A. L. S. I. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Approved standard M27-A2*.
- COE, F. G., ANDERSON, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology* **96**, 303-323.

- COIMBRA, H. S., ROYO, V. A., DE SOUZA, V. A., PEREIRA, A. C., DE SOUZA, G. H., DA SILVA, R., DONATE, P. M., SILVA, M. L., CUNHA, W. R., CARVALHO, J. C., BASTOS, J. K. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activities of (-)-o benzyl cubebin, a (-)-cubebin derivative, obtained by partial synthesis. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **143**, 65-69.
- CONNOLLY, J. D., DEANS, R., HAQUE, M. E. (1995). Constituents of *Piper chaba*. *Fitoterapia* **66**, 188.
- COSTA, P. R. R., PILLI, R. A., PINHEIRO, S., VASCONCELLOS, M. L. D. A. A. **Substâncias carboniladas e derivados**. 1. Porto Alegre: Bookman 2003
- COSTA, S. S., MORS, W. B. (1981). Amides of *Ottonia corcovadensis*. *Phytochemistry* **20**, 1305-1307.
- COSTANTIN, M. B., SARTORELLI, P., LIMBERGER, R., HENRIQUES, A. T., STEPPE, M., FERREIRA, M. J. P., OHARA, M. T., EMERENCIANO, V. P., KATO, M. J. (2001). Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Medica* **67**, 771-773.
- COUTURE, A., DENIAU, E., GRANDCLAUDON, P., RYBALKO-ROSEN, H., LE?ONCE, S., PFEIFFER, B., RENARD, P. (2002). Synthesis and biological evaluation of aristolactams. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **12**, 3557-3559.
- COWLES, R. S., MILLER, J. R., HOLLINGWORTH, R. M., ABDEL-AAL, M. T., SZURDOKI, F., BAUER, K., MATOLCSY, G. (1990). Cinnamyl derivatives and monoterpenoids as nonspecific ovipositional deterrents of the onion fly. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2401-2428.
- CROMBIE, L., HORSHAM, M. A., BLADE, R. J. (1987). Synthetic approaches to isobutylamides of insecticidal interest. *Tetrahedron Letters* **28**, 4879-4882.
- CSEKE, L. J., KIRAKOSYAN, A., KAUFMAN, P. B., WARBER, S., DUKE, J. A., BRIELMANN, H. L. **Natural products fom plants**. 2^a. Boca Raton: CRC Press. 2006
- CUNICO, M. M. ***Ottonia martiana* MIQ., Piperaceae: um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar**. 2007. 176 f. Doutor - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- CUNICO, M. M., DIAS, J. G., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G., AUER, C. G., CÔCCO, L. C., LOPES, A. R., YAMAMOTO, C. I., MONACHE, F. D. (2006). Antimicrobial and allelopathic potential of the amides isolated from the roots of *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Quimica Nova* **29**, 746-749.
- CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., MIGUEL, M. D., KERBER, V. A., MONTRUCCHIO, D. P., AUER, C. G., GRIGOLETTIR JR, A. (2004). Evaluation of antibacterial activity of *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Revista de Ciencias Farmaceuticas* **24**, 141-145.
- CUTILLO, F., D'ABROSCA, B., DELLAGRECA, M., DI MARINO, C., GOLINO, A., PREVITERA, L.,

- ZARRELLI, A. (2003). Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth. *Phytochemistry* **64**, 1381-1387.
- DA SILVA, R. V., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., MEDA, C. I., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**, 521-527.
- DANELUTTE, A. P., COSTANTIN, M. B., DELGADO, G. E., BRAZ-FILHO, R., KATO, M. J. (2005). Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1425-1430.
- DANELUTTE, A. P., LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **64**, 555-559.
- DAS, B., KASHINATHAM, A., MADHUSUDHAN, P. (1998). Long chain esters and alkamides from *Piper Longum*. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **137**, 319-320.
- DE ARAÚJO JR, J. X., BARREIRO, E. J., PARENTE, J. P., FRAGA, C. A. M. (1999). Synthesis of piperamides and new analogues from natural safrole. *Synthetic Communications* **29**, 263-273.
- DE ARAÚJO JR, J. X., DUARTE, C. D. M., CHAVES, M. C. D. O., PARENTE, J. P., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J. (2001). Synthesis of natural amide alkaloid piperdardine and a new bioactive analogue. *Synthetic Communications* **31**, 117-123.
- DE FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. (2000). Pollination Biology of Piperaceae Species in Southeastern Brazil. *Ann Bot* **85**, 455-460.
- DE MOREIRA, L. D., KAPLAN, M. A. C., GUIMARAES, E. F. (1995). Chemical constituents from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacia* **76**, 106-109.
- DE PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. D. A., DEMUNER, A. J., PILÓ-VELOSO, D., PICANÇO, M. C. (2000). Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Management Science* **56**, 168-174.
- DE SOUZA, V. A., DA SILVA, R., PEREIRA, A. C., ROYO, V. D. A., SARAIVA, J., MONTANHEIRO, M., DE SOUZA, G. H. B., DA SILVA FILHO, A. A., GRANDO, M. D., DONATE, P. M., BASTOS, J. K., ALBUQUERQUE, S., E SILVA, M. L. A. (2005). Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **15**, 303-307.
- DEBNATH, B., SAMANTA, S., ROY, K., JHA, T. (2003). QSAR Study on Some p-Arylthio Cinnamides as Antagonists of Biochemical ICAM-1/LFA-1 Interaction and ICAM-1/JY-8 Cell Adhesion in Relation to Anti-inflammatory Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**, 1615-1619.

- DELLAGRECA, M., PREVITERA, L., PURCARO, R., ZARRELLI, A. (2006). Cinnamic acid amides and lignanamides from *Aptenia cordifolia*. *Tetrahedron* **62**, 2877-2882.
- DESAI, S. J., PRABHU, B. R., MULCHANDANI, N. B. (1988). Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. *Phytochemistry* **27**, 1511-1515.
- DHOLWANI, K., SALUJA, A., GUPTA, A., SHAH, D. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal of Pharmacology* **40**, 49-58.
- DIXON, D. R. A. (2001a). Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. *Phytochemistry* **57**, 145-148.
- DIXON, R. A. (2001b). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.
- DOBSON, C. M. (2004). Chemical space and biology. *Nature* **432**, 824-828.
- DUARTE, C. D. M., VERLI, H., ARAUJO-JUNIOR, J. X. D., MEDEIROS, I. A. D., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. (2004). New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 363-369.
- DUH, C.-Y., WU, Y.-C., WANG, S.-K. (1990a). Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. *Phytochemistry* **29**, 2689-2691.
- DUH, C.-Y., WU, Y.-C., WANG, S.-K. (1990b). Cytotoxic Pyridone Alkaloids from the Leaves of *Piper aborescens*. *Journal of Natural Products* **53**, 1575-1577.
- DURANTINI, E. N. (1999). Synthesis of Functional Olefins Using the Wittig-Horner Reaction in Different Media. *Synthetic Communications* **29**, 4201 - 4222.
- DYER, L. A., DODSON, C. D., STIREMAN, J. O., TOBLER, M. A., SMILANICH, A. M., FINCHER, R. M., LETOURNEAU, D. K. (2003). Synergistic Effects of Three Piper Amides on Generalist and Specialist Herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2499-2514.
- DYER, L. A., LETOURNEAU, D. K., DODSON, C. D., TOBLER, M. A., STIREMAN III, J. O., HSU, A. (2004a). Ecological causes and consequences of variation in defensive chemistry of a neotropical shrub. *Ecology* **85**, 2795-2803.
- DYER, L. A., PALMER, A. D. N. **Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004
- DYER, L. A., RICHARDS, J., DODSON, C. D., 2004b. Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology Of Piper Amides. In: Dyer, L. A., Palmer, A. N. (Eds.), **Piper. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004b. p. 117-139.
- EE, G. C. L., LIM, S. K., LIM, C. M., DZULKEFLY, K. (2008). Alkaloids and carboxylic acids from *Piper nigrum*. *Asian Journal of Chemistry* **20**, 5931-5940.

- EISENREICH, W., BACHER, A., ARIGONI, D., ROHDICH, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 1401-1426.
- EKUNDAYO, O., LAAKSO, I., ADEGBOLA, R. M., OGUNTIMEIN, B., SOFOWORA, A., HILTUNEN, R. (1988). Essential oil constituents of Ashanti pepper (*Piper guineense*) fruits (berries). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 880-882.
- ELINAV, E., SHAPIRA, Y., OFRAN, Y., HASSIN, T., BEN-DOV, I. Z. (2005). Near-fatal amitraz intoxication: The overlooked pesticide. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **97**, 185-187.
- ESTEVEZ, J. C., CARMEN VILLAYERDE, M., ESTEVEZ, R. J., CASTEDO, L. (1992). A simple, efficient route to the synthesis of dibenzocoumaranones and aristolactams. *Tetrahedron Letters* **33**, 5145-5146.
- ESTRELA, J. L. V., FAZOLIN, M., CATANI, V., DE LIMA, M. S. (2006). Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **41**, 217-222.
- FACCHINI, P. J., DE LUCA, V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: Model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant Journal* **54**, 763-784.
- FACUNDO, V. A., DA SILVEIRA, A. S. P., MORAIS, S. M. (2005). Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 753-756.
- FACUNDO, V. A., MORAIS, S. M., BRAZ FILHO, R. (2004). Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta Amazônica: atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono *Química Nova* **27** 79-83
- FANG, J., XIE, J., SHAO, Y. C., QIAN, F. G. (2007). Chemical constituents in root and stem of *Piper laetispicum* (II). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* **38**, 1289-1292.
- FARIAS, N. A., RUAS, J. L., DOS SANTOS, T. R. B. (2008). Acaricids efficacy analysis on *Boophilus microplus* tick, in the last decade in the southern of Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* **38**, 1700-1704.
- FEHER, M., SCHMIDT, J. M. (2003). Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 218-227.
- FELIPE, C. F. B., FILHO, J. T. S., SOUZA, L. E. D. O., SILVEIRA, J. A., UCHOA, D. E. D. A., SILVEIRA, E. R., PESSOA, O. D. L., VIANA, G. S. D. B. (2007). Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomedicine* **14**, 605-612.

- FELIPPE, L. G., BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., GUIMARÃES, E. F., CICALLELLI, R. M. B., FURLAN, M. (2008). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* **69**, 445-450.
- FILHO, R. B., DE SOUZA, M. P., MATTOS, M. E. O. (1981). Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **20**, 345-346.
- FISCHER, R., RICHTER, A., WANEK, W., MAYER, V. (2002). Plants feed ants: food bodies of myrmecophytic *Piper* and their significance for the interaction with *Pheidole bicornis* ants. *Oecologia* **133**, 186-192.
- FLEMING, T. H. (1981). Fecundity, fruiting pattern, and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat-dispersed tropical shrub. *Oecologia* **51**, 42-46.
- FLORES, N., CABRERA, G., JIMÉNEZ, I. A., PIÑERO, J., GIMENEZ, A., BOURDY, G., CORTÉS-SELVA, F., BAZZOCCHI, I. L. (2007a). Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Medica* **73**, 206-211.
- FLORES, N., CABRERA, G., JIMÉNEZ, I. A., PIÑERO, J., GIMÉNEZ, A., BOURDY, G., CORTÉS-SELVA, F., BAZZOCCHI, I. L. (2007b). Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Medica* **73**, 206-211.
- FRAENKEL, G. S. (1959). The Raison d'Etre of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science* **129**, 1466-1470.
- FREIXA, B., VILA, R., FERRO, E. A., ADZET, T., CAÑIGUERAL, S. (2001). Antifungal principles from *Piper fulvescens*. *Planta Medica* **67**, 873-875.
- FRIDMAN, E., PICHESKY, E. (2005). Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 242-248.
- FRIEDRICH, U., SIEMS, K., SOLIS, P. N., GUPTA, M. P., JENETT-SIEMS, K. (2005). New prenylated benzoic acid derivatives of *Piper hispidum*. *Pharmazie* **60**, 455-457.
- FU, P. P., XIA, Q., GUO, L., YU, H., CHAN, P. C. (2008). Toxicity of kava kava. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* **26**, 89-112.
- GBEWONYO, W. S. K., CANDY, D. J. (1992). Separation of insecticidal components from an extract of the roots of male *Piper Guineense* (West African black pepper) by gas chromatography. *Toxicon* **30**, 1037-1042.
- GENG, C.-A., LIU, X.-K. (2008). New Macrocyclic Diamide from *Rauvolfia Yunnanensis* Tsiang. *Chemical Research in Chinese Universities* **24**, 303-305.
- GLEITZ, J., BEILE, A., WILKENS, P., AMERI, A., PETERS, T. (1997). Antithrombotic action of the

- kava pyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets. *Planta Medica* **63**, 27-30.
- GOBEC, S., SOVA, M., KRISTAN, K., RIZNER, T. L. (2004). Cinnamic acid esters as potent inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase - A model enzyme of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **14**, 3933-3936.
- GRAF, J. F., GOGOLEWSKI, R., LEACH-BING, N., SABATINI, G. A., MOLENTO, M. B., BORDIN, E. L., ARANTES, G. J. (2004). Tick control: An industry point of view. *Parasitology* **129**, S427-S442.
- GRAGASIN, M. C. B., WY, A. M., RODEROS, B. P., ACDA, M. A., SOLSOLOY, A. D. (2006). Insecticidal activities of essential oil from Piper beetle Linn. against storage insect pests. *Philippine Agricultural Scientist* **89**, 212-216.
- GRATTAPAGLIA, D., KIRST, M. (2008). *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* **179**, 911-929.
- GRAY, J. C. (1978). Absorption of polyphenols by polyvinylpyrrolidone and polystyrene resins. *Phytochemistry* **17**, 495-497.
- GREENSPAN, P. D., FUJIMOTO, R. A., MARSHALL, P. J., RAYCHAUDHURI, A., LIPSON, K. E., ZHOU, H., DOTI, R. A., COPPA, D. E., ZHU, L., PELLETIER, R., UZIEL-FUSI, S., JACKSON, R. H., CHIN, M. H., KOTYUK, B. L., FITT, J. J. (1999). Carboxy-Substituted Cinnamides: A Novel Series of Potent, Orally Active LTB₄ Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 164-172.
- GREGER, H. (1984). Alkamides: structural relationships, distribution, and biological activity. *Planta Medica* **50**, 366-375.
- GREGER, H., HOFER, O., KÄHLIG, H., WURZ, G. (1992). Sulfur containing cinnamides with antifungal activity from glycosmis cyanocarpa. *Tetrahedron* **48**, 1209-1218.
- GUERRINI, A., SACCHETTI, G., ROSSI, D., PAGANETTO, G., MUZZOLI, M., ANDREOTTI, E., TOGNOLINI, M., MALDONADO, M. E., BRUNI, R. (2009). Bioactivities of Piper aduncum L. and Piper obliquum Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **27**, 39-48.
- GUIMARÃES, E. F., GIORDANO, L. C. D. S. (1997). Notas em Piperaceae IV- *Piper scutifolium* Yuncker, espécie rara no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Bradea* **8**, 41-44.
- GUPTA, M., WAKHLOOB, B. P. (2007). Tetrabutylammoniumbromide mediated Knoevenagel condensation in water: Synthesis of cinnamic acids. *Arkivoc* **2007**, 94-98.
- GUPTA, O. P., ATAL, C. K., GAIND, K. N. (1972). Constituents of *Piper nepalense*. *Phytochemistry* **11**, 2646.

- GUPTA, S., JHA, A., PRASAD, A. K., RAJWANSHI, V. K., JAIN, S. C., OLSEN, C. E., WENGEL, J., PARMAR, V. S. (1999). A new amide, N-cinnamoylpyrrole and other constituents from *Piper argyrophyllum*. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry* **38**, 823-827.
- HALL, R. D. (2006). Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist* **169**, 453-468.
- HARBORNE, J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports* **18**, 361-379.
- HARBORNE, J. B., TURNER, B. L. **Plant Chemosystematics**. Orlando: Academic Press. 1984. 562 p.
- HARTMAN, L. (1957). Wöhler and the vital force. *Journal of Chemical Education* **34**, 141-142.
- HARTMANN, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**, 2831-2846.
- HASLAM, E. (1985). Secondary Metabolism - Fact and Fiction. *Natural Product Reports* **3**, 217-249.
- HEGNAUER, R., HEGNAUER, M. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel: Birkhäuser. 1962. 517 p.
- HIRATA, N., NARUTO, S., INABA, K., ITOH, K., TOKUNAGA, M., IINUMA, M., MATSUDA, H. (2008). Histamine release inhibitory activity of *Piper nigrum* leaf. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 1973-1976.
- HOMANS, A. L., FUCHS, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography A* **51**, 327-329.
- HORSHAM, M. A., CLASS, T. J., JOHNSTON, J. J., CASIDA, J. E. (1989). Metabolites of the prototype insecticide (2E,4E)-N-isobutyl-6-phenylhexa-2,4-dienamide. 1. Synthesis, chromatography, spectroscopy, and biological activity. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 777-781.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. (2007). The Search for New Drugs from Higher Plants. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **61**, 322-326.
- HOU, T., XU, X. (2001). Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses of a series of cinnamamides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **56**, 123-132.
- HOUGHTON, P. J., REN, Y., HOWES, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports* **23**, 181-199.
- INATANI, N. N. A. R. (1981). Isobutyl Amides from Pepper (*Piper nigrum* L.). *Agric. Biol.*

Chem., **45**, 1473 - 1476,.

- JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *Am. J. Bot.* **88**, 706-716.
- JARVIS, B. B. **Evolution of Metabolic Pathways (Recent Advances in Phytochemistry)**. Amsterdam: Pergamon Press. 2000
- JENKE-KODAMA, H., MÜLLER, R., DITTMANN, E., 2008. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. In: Petersen, F., Amstutz, R. (Eds.), *Progress in Drug Research*, vol. 65, pp. 120-140.
- JENSEN, H. R., SCOTT, I. M., SIMS, S., TRUDEAU, V. L., ARNASON, J. T. (2006). Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1289-1295.
- JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., NGASSOUM, M. B., GEISLER, M. (2002). Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A* **976**, 265-275.
- JONES, C. G., FIRN, R. D., MALCOLM, S. B. (1991). On the Evolution of Plant Secondary Chemical Diversity [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **333**, 273-280.
- JONG-WOONG, A., MI-JA, A., OK-PYO, Z., EUN-JOO, K., SUEG-GEUN, L., HYUNG, J. K., KUBO, I. (1992). Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* fruits. *Phytochemistry* **31**, 3609-3612.
- JONSSON, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology* **137**, 1-10.
- JONSSON, N. N., BOCK, R. E., JORGENSEN, W. K. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology* **155**, 1-9.
- JONSSON, N. N., HOPE, M. (2007). Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **146**, 193-198.
- KANG, T.-S., JO, H.-O., PARK, W.-K., KIM, J.-P., KONISHI, Y., KONG, J.-Y., PARK, N.-S., JUNG, Y.-S. (2008). Synthesis and antioxidant activities of 3,5-dialkoxy-4-hydroxycinnamamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 1663-1667.
- KARCHGAUDHURI, N., DE, A., MITRA, A. K. (2002). Microwave-assisted condensation reactions exploiting hexamethylenetetramine as a catalyst under solvent-free

- conditions. *Journal of Chemical Research* **2002**, 180-183.
- KATO, M. J., FURLAN, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 529-538.
- KATO, M. J., FURLAN, M., MURATA, A. T., BORTOLI, S. A., MIRANDA, J. E., BEBONSI, H. M., MARQUES, J. V., KAWANO, T., TEIXEIRA, E., BOLZANI, V. S., MENDES, M. C., YOUNG, M. C. M., 2007. Composição inseticida, carrapaticida, moluscicida e/ou fungicida e uso. In: RPI (Ed.), Brasil.
- KITAMURA, R. O. S., ROMOFF, P., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., LAGO, J. H. G. (2006). Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* **67**, 2398-2402.
- KIUCHI, F., NAKAMURA, N., TSUDA, Y., KONDO, K., YOSHIMURA, H. (1988). Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**, 2452-2465.
- KIYOTA, H. (2006). Synthesis of Naturally Derived Bioactive Compounds of Agricultural Interest. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 317-324.
- KIZIL, O., BALIKÇI, E., DABAK, M., OZDEMIR, H. (2008). Amitraz intoxication in two cattle. *Revue de Medecine Veterinaire* **159**, 166-168.
- KOCH, M. A., SCHUFFENHAUER, A., SCHECK, M., WETZEL, S., CASAULTA, M., ODERMATT, A., ERTL, P., WALDMANN, H. (2005). Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17272-17277.
- KOLEWE, M. E., GAURAV, V., ROBERTS, S. C. (2008). Pharmaceutically Active Natural Product Synthesis and Supply via Plant Cell Culture Technology. *Molecular Pharmaceutics* **5**, 243-256.
- KONISHI, T., KONOSHIMA, T., DAIKONYA, A., KITANAKA, S. (2005). Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **53**, 121-124.
- KOUKOL, J., CONN, E. E. (1961). The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. IV. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE PHENYLALANINE DEAMINASE OF HORDEUM VULGARE. *J. Biol. Chem.* **236**, 2692-2698.
- KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., DHAR, K. L., JAMWAL, D. S., SINGH, K., REEN, R. K., SINGH, J. (2000). Structure-activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their inhibitory potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **8**, 251-268.
- KOUL, S. K., TANEJA, S. C., AGARWAL, V. K., DHAR, K. L. (1988a). Minor amides of Piper species. *Phytochemistry* **27**, 3523-3527.

- KOUL, S. K., TANEJA, S. C., DHAR, K. L., ATAL, C. K. (1983). Lignans of *Piper clusii*. *Phytochemistry* **22**, 999-1000.
- KOUL, S. K., TANEJA, S. C., PUSHPANGADAN, P., DHAR, K. L. (1988b). Lignans of *Piper trichostachyon*. *Phytochemistry* **27**, 1479-1482.
- KRISTAN, K., STARCEVIC, S., BRUNSKOLE, M., RIZNER, T. L., GOBEC, S. (2006). Cinnamates and cinnamamides inhibit fungal 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase. *Molecular and Cellular Endocrinology* **248**, 239-241.
- KRYSHTAL, G. V., ZHDANKINA, G. M., SEREBRYAKOV, E. P. (1993). A novel approach to the synthesis of benzoic and cinnamic acid derivatives with nor-isoprenoid substituents. *Russian Chemical Bulletin* **42**, 866-869.
- KUMAR, R., PARMAR, V. S., ERRINGTON, W., WENGEL, J., OLSEN, C. E. (1998). 1-(3,4-Dimethoxy- α,β -dihydrocinnamoyl)-pyrrole, a Novel Amide from *Piper brachystachyum*. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* **54**, 363-365.
- KUMAR, S., ARYA, P., MUKHERJEE, C., SINGH, B. K., SINGH, N., PARMAR, V. S., PRASAD, A. K., GHOSH, B. (2005). Novel Aromatic Ester from *Piper longum* and Its Analogues Inhibit Expression of Cell Adhesion Molecules on Endothelial Cells. *Biochemistry* **44**, 15944-15952.
- KUMAR, V., POONAM, PRASAD, A. K., PARMAR, V. S. (2003). Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Natural Product Reports* **20**, 565-583.
- KUTCHAN, T., DIXON, R. A. (2005). Physiology and metabolism: Secondary metabolism: nature's chemical reservoir under deconvolution. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 227-229.
- KUZUYAMA, T., SETO, H. (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Natural Product Reports* **20**, 171-183.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAGO, J. H. G., TANIZAKI, T. M., YOUNG, M. C. M., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. (2005). Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 153-156.
- LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., REIGADA, J. B., SOARES, M. G., ROESLER, B. P., KATO, M. J. (2007). Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (PIPERACEAE). *Química Nova* **30**, 1222-1224.
- LANGE, B. M. (2006). Integrative analysis of metabolic networks: from peaks to flux models?

- Current Opinion in Plant Biology* **9**, 220-226.
- LEE, F. P., CHEN, Y. C., CHEN, J. J., TSAI, I. L., CHEN, I. S. (2004). Cyclobutanoid Amides from *Piper arborescens*. *Helvetica Chimica Acta* **87**, 463-468.
- LEE, S. A., HONG, S. S., HAN, X. H., HWANG, J. S., OH, G. J., LEE, K. S., LEE, M. K., HWANG, B. Y., RO, J. S. (2005). Piperine from the Fruits of *Piper longum* with Inhibitory Effect on Monoamine Oxidase and Antidepressant-Like Activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **53**, 832-835.
- LEE, S. E., PARK, B. S., KIM, M. K., CHOI, W. S., KIM, H. T., CHO, K. Y., LEE, S. G., LEE, H. S. (2001). Fungicidal activity of pipernonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **20**, 523-528.
- LI, C.-Y., TSAI, W.-J., DAMU, A. G., LEE, E. J., WU, T.-S., DUNG, N. X., THANG, T. D., THANH, L. (2007). Isolation and Identification of Antiplatelet Aggregatory Principles from the Leaves of *Piper lolot*. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9436-9442.
- LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M., SCHWENDER, J. (1997a). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* **101**, 643-652.
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A., ROHMER, M. (1997b). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *Febs Letters* **400**, 271-274.
- LIKHITWITAYAWUID, K., RUANGRUNGSI, N., LANGE, G. L., DECICCO, C. P. (1987). Structural elucidation and synthesis of new components isolated from *Piper sarmentosum* (Piperaceae). *Tetrahedron* **43**, 3689-3694.
- LIN, L. C., SHEN, C. C., SHEN, Y. C., TSAI, T. H. (2006). Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*. *Journal of Natural Products* **69**, 842-844.
- LIN, Z., LIAO, Y., VENKATASAMY, R., HIDER, R. C., SOUMYANATH, A. (2007a). Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59**, 529-536.
- LIN, Z., LIAO, Y., VENKATASAMY, R., HIDER, R. C., SOUMYANATH, A. (2007b). Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59**, 529-536.
- LODER, J. W., NEARN, R. H. (1972). Constituents from *Piper banksii*. *Phytochemistry* **11**, 2645-2646.
- LOIZZO, M. R., TUNDIS, R., MENICHINI, F. (2008). Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: An update. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 1209-1228.

- LOOMIS, W. D., BATTAILE, J. (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**, 423-438.
- LUIZE, P. S., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V. (2006). Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 2126-2130.
- MA, J., JONES, S. H., HECHT, S. M. (2004a). Phenolic acid amides: A new type of DNA strand scission agent from *Piper caninum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **12**, 3885-3889.
- MA, J., JONES, S. H., MARSHALL, R., JOHNSON, R. K., HECHT, S. M. (2004b). A DNA-Damaging Oxoaporphine Alkaloid from *Piper caninum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1162-1164.
- MA, Y., HAN, G. Q., LI, C. L., CHENG, J. R., ARISON, B. H., HWANG, S. B. (1991). Neolignans from *Piper polysyphorum* C.DC. *Acta Pharmaceutica Sinica* **26**, 345-350.
- MACÍAS, F. A., GALINDO, J. L. G., GALINDO, J. C. G. (2007). Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2917-2936.
- MAEDA, S., MASUDA, H., TOKOROYAMA, T. (1994). Studies on the preparation of bioactive lignans by oxidative coupling reaction. I. Preparation and lipid peroxidation inhibitory effect of benzofuran lignans related to schizotenuins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **42**, 2500-2505.
- MAHMUD, T. (2007). Isotope tracer investigations of natural products biosynthesis: The discovery of novel metabolic pathways. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **50**, 1039-1051.
- MAKAPUGAY, H. C., SOEJARTO, D. D., DOUGLAS KINGHORN, A., BORDAS, E. (1983). Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutescens*. *Journal of Ethnopharmacology* **7**, 235-238.
- MANDAI, T., GOTOH, J., OTERA, J., KAWADA, M. (1980). A new synthetic method for pellitorine. *Chemistry Letters* **3**, 313-314.
- MARQUES, J. V., KITAMURA, R. O. S., LAGO, J., XE, O. HENRIQUE, G., YOUNG, M. C. M., GUIMAR, ES, E. F., KATO, M. J. (2007). Antifungal Amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *J. Nat. Prod.* **70**, 2036-2039.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* **13**, 51-54.
- MARTENS, S., MITHOFER, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**, 2399-2407.

- MARTIN, H. B., MCCALLUM, M., STOFER, W. D., EICHINGER, M. R. (2002). Kavain attenuates vascular contractility through inhibition of calcium channels. *Planta Medica* **68**, 784-789.
- MARTINS, R. C. C., LAGO, J. H. G., ALBUQUERQUE, S., KATO, M. J. (2003). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **64**, 667-670.
- MARTINS, R. C. C., LATORRE, L. R., SARTORELLI, P., KATO, M. J. (2000). Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **55**, 843-846.
- MATA, R., MORALES, I., PÉREZ, O., RIVERO-CRUZ, I., ACEVEDO, L., ENRIQUEZ-MENDOZA, I., BYE, R., FRANZBLAU, S., TIMMERMAN, B. (2004). Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1961-1968.
- MATSUDA, H., NINOMIYA, K., MORIKAWA, T., YASUDA, D., YAMAGUCHI, I., YOSHIKAWA, M. (2008). Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on d-galactosamine/TNF- α -induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 2038-2042.
- MAXWELL, A., RAMPERSAD, D. (1991). A New Dihydropiplatine and Piplatine Dimer from *Piper rugosum*. *Journal of Natural Products* **54**, 1150-1152.
- MCBURNETT, B. G., CHAVIRA, A. A., LOPEZ, A. C., MOSSO, J., COLLINS, S. M., 2007. Analysis of *Piper auritum*: A traditional hispanic herb. ACS Symposium Series, vol. 946, pp. 67-76.
- MCCOY, E., O'CONNOR, S. E., 2008. Natural products from plant cell cultures. In: Petersen, F., Amstutz, R. (Eds.), Progress in Drug Research, vol. 65, pp. 330-370.
- MCFERREN, M. A., CORDOVA, D., RODRIGUEZ, E., RAUH, J. J. (2002). In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorium* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **83**, 201-207.
- MCFERREN, M. A., RODRIGUEZ, E. (1998). Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorium* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **60**, 183-187.
- MCMURRY, J., BEGLEY, T. P. **The organic chemistry of biological pathways**. Greenwood Village: Roberts & Company Publishers. 2005
- MCNULTY, J., STEERE, J. A., WOLF, S. (1998). The ultrasound promoted Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes. *Tetrahedron Letters* **39**, 8013-8016.
- MEDEIROS, C. A. B., GONÇALVES, M. D. M. (2007). Avaliação de Produtos Alternativos no Controle de Danos Causados por Insetos em Tubérculos de Batata Cultivada em Sistema Orgânico. *Rev. Bras. de Agroecologia* **2**, 1012-1015.

- MICHALET, S., CARTIER, G., DAVID, B., MARIOTTE, A.-M., DIJOUX-FRANCA, M.-G., KAATZ, G. W., STAVRI, M., GIBBONS, S. (2007). N-Caffeoylphenalkylamide derivatives as bacterial efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 1755-1758.
- MITRA, A. K., DE, A., KARCHAUDHURI, N. (1999). Application of Microwave Irradiation Techniques for the Syntheses of Cinnamic Acids by Doebner Condensation. *Synthetic Communications* **29**, 573-581.
- MOGILIAH, K., REDDY, G. R. (2004). Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of trans-Cinnamic Acids Using Lithium Chloride as Catalyst. *ChemInform* **35**.
- MOHOTTALAGE, S., TABACCHI, R., GUERIN, P. M. (2007). Components from Sri Lankan Piper betle L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. *Flavour and Fragrance Journal* **22**, 130-138.
- MORANDIM, A. D., BERGAMO, D. C. B., KATO, M. J., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D., FURLAN, M. (2005). Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. *Phytochemical Analysis* **16**, 282-286.
- MORIKAWA, T., MATSUDA, H., YAMAGUCHI, I., PONGPIRIYADACHA, Y., YOSHIKAWA, M. (2004). New Amides and Gastroprotective Constituents from the Fruit of *Piper chaba*. *Planta Medica*, 152-159.
- MORRISSEY, J. H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* **117**, 307-310.
- MUNDINA, M., VILA, R., TOMI, F., TOMÁS, X., CICCIO, J. F., ADZET, T., CASANOVA, J., CANIGUAL, S. (2001). Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 739-748.
- MURASHIGE, T. (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology* **25**, 135-166.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- NAKATANI, N., INATANI, R., FUWA, H. (1980). Structure and syntheses of two phenolic amides from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2831-2836.
- NARASIMHAN, B., BELSARE, D., PHARANDE, D., MOURYA, V., DHAKE, A. (2004). Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 827-834.
- NARUI, T., TAKEUCHI, M., ISHII, R., ISHIDA, T., OKUYAMA, T. (1995). Studies on the constituents of *Piper hancei* of spice from Okinawa. *Natural Medicines* **49**, 438-441.
- NAVICKIENE, H. M. D., ALÉCIO, A. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M.,

- CAVALHEIRO, A. J., FURLAN, M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **55**, 621-626.
- NAVICKIENE, H. M. D., MIRANDA, J. E., BORTOLI, S. A., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., FURLAN, M. (2007). Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Pest Management Science* **63**, 399-403.
- NEISH, A. C. (1961). Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry* **1**, 1-24.
- NOEL, J. P., AUSTIN, M. B., BOMATI, E. K. (2005). Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 249-253.
- NOVOTNY, V., MILLER, S. E., CIZEK, L., MILAN, J. L., BASSET, J. Y., WEIBLEN, G. D., DARROW, K. (2003). Colonising aliens: caterpillars (Lepidoptera) feeding on *Piper aduncum* and *Piper umbellatum* in rainforests of Papua New Guinea. *Ecological Entomology* **28**, 704-716.
- OKOGUN, J. I., EKONG, D. E. U. (1974). Extracts from the fruits of *Piper guineense* Schum. and Thonn. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2195-2198.
- OKOGUN, J. I., SONDEGAM, B. L., KIMBU, S. F. (1977). New amides from the extracts of *Piper guineense*. *Phytochemistry* **16**, 1295.
- OLSEN, C. E., TYAGI, O. 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 revision of the structures of piperolactam B and D. *Phytochemistry* **33**, 518-520.
- OLSEN, R. A., SPESSARD, G. O. (1981). A short, stereoselective synthesis of piperine and related pepper-derived alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**, 942-944.
- ORJALA, J., ERDELMEIER, C. A. J., WRIGHT, A. D., RALI, T., STICHER, O. (1993a). Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medica* **59**, 546-551.
- ORJALA, J., WRIGHT, A. D., RALI, T., STICHER, O. (1993b). Aduncamide, a Cytotoxic and Antibacterial b-Phenylethylamine-Derived Amide from *Piper aduncum*. *Natural Product Research* **2**, 231 - 236.
- OYEDEJI, O. A., ADENIYI, B. A., AJAYI, O., KO?NIG, W. A. (2005). Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research* **19**, 362-364.
- PALMEIRIM, J. M., GORCHOY, D. L., STOLESON, S. (1989). Trophic structure of a neotropical frugivore community: is there competition between birds and bats? *Oecologia* **79**, 403-411.

- PANDIAN, S., SAENGCHJAN, S., RAMAN, T. S. (1981). An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochemical Journal* **196**, 675-681.
- PARK, B. S., SON, D. J., PARK, Y. H., KIM, T. W., LEE, S. E. (2007). Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. *Phytomedicine* **14**, 853-855.
- PARK, I. K., LEE, S. G., SHIN, S. C., PARK, J. D., AHN, Y. J. (2002). Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits against Three Mosquito Species. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1866-1870.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O. D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**, 597-673.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., GUPTA, S., TALWAR, S., RAJWANSHI, V. K., KUMAR, R., AZIM, A., MALHOTRA, S., KUMAR, N., JAIN, R., SHARMA, N. K., TYAGI, O. D., LAWRIE, S. J., ERRINGTON, W., HOWARTH, O. W., OLSEN, C. E., WENGEL, S. K. S. A. (1998). Polyphenols and alkaloids from piper species. *Phytochemistry* **49**, 1069-1078.
- PATHAN, R. U., PATIL, S. L. (2008). Synthesis and antimicrobial activity of N,N-dialkyl cinnamamides. *Oriental Journal of Chemistry* **24**, 709-712.
- PATRA, A., GHOSH, A. (1974). Amides of *Piper Chaba*. *Phytochemistry* **13**, 2889-2890.
- PEREDA-MIRANDA, R., BERNARD, C. B., DURST, T., ARNASON, J. T., SAÑCHEZ-VINDAS, P., POVEDA, L., SAN ROMÁN, L. (1997). Methyl 4-hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl)benzoate, major insecticidal principle from *Piper guanacastensis*. *Journal of Natural Products* **60**, 282-284.
- PESSINI, G. L., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V., CORTEZ, D. A. G. (2005). Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1130-1133.
- PETERSEN, M. (2007). Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2847-2860.
- PHILLIPSON, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* **68**, 2960-2972.
- PHUWAPRAISIRISAN, P., PUKSASOOK, T., JONG-ARAMRUANG, J., KOKPOL, U. (2008). Phenylethyl cinnamides: A new series of [alpha]-glucosidase inhibitors from the leaves of *Aegle marmelos*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 4956-4958.
- PICHERSKY, E., GANG, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* **5**, 439-445.
- PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. D. A. (2002).

- Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* **25**, 45-61.
- PIRIE, N. W. (1959). Leaf Proteins. *Annual Review of Plant Physiology* **10**, 33-52.
- PORTET, B., FABRE, N., ROZENBERG, R., HABIB-JIWAN, J. L., MOULIS, C., QUETIN-LECLERCQ, J. (2008). Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1210**, 45-54.
- PRADHAN, K. J., VARIYAR, P. S., BANDEKAR, J. R. (1999). Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *LWT - Food Science and Technology* **32**, 121-123.
- PRING, B. G. (1982). Isolation and identification of amides from *Piper callosum*. Synthesis of pipercallosine and pipercallosidine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1493-1498.
- RAFAEL, M. S., HEREIRA-ROJAS, W. J., ROPER, J. J., NUNOMURA, S. M., TADEI, W. P. (2008). Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and molecular research : GMR* **7**, 772-781.
- RAMOS, C. S., VANIN, S. A., KATO, M. J. (2008). Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. *Phytochemistry* **69**, 2157-2161.
- RAMOS, L. S., DA SILVA, M. L., LUZ, A. I. R., ZOGHBI, M. G. B., MAIA, J. G. S. (1986). Essential oil of *Piper marginatum*. *Journal of Natural Products* **49**, 712-713.
- REDDY, P. S., JAMIL, K., MADHUSUDHAN, P., ANJANI, G., DAS, B. (2001). Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. *Pharmaceutical Biology* **39**, 236-238.
- REIGADA, J. B., TCACENCO, C. M., ANDRADE, L. H., KATO, M. J., PORTO, A. L. M., LAGO, J. H. G. (2007). Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)-antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron Asymmetry* **18**, 1054-1058.
- RENDÓN, W., CHÁVEZ, G., MELÉNDEZ-RODRÍGUEZ, M., JOSEPH-NATHAN, P. (1998). Total assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of piperovatine. *Spectroscopy* **14**, 35-40.
- RHO, M. C., LEE, S. W., PARK, H. R., CHOI, J. H., KANG, J. Y., KIM, K., LEE, H. S., KIM, Y. K. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **68**, 899-903.
- RIBEIRO, T. S., FREIRE-DE-LIMA, L., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., HEISE, N., DE LIMA, M. E. F. (2004). Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **14**, 3555-3558.

- RICE, M. J., LEGG, M., POWELL, K. A. (1998). Natural products in agriculture - a view from the industry. *Pesticide Science* **52**, 184-188.
- ROBINSON, R. **The Structural Relations of Natural Products**. . Oxford: Clarendon Press. 1955
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., BERENGUER, J., MARTINEZ-SUAREZ, J. V., SANCHEZ, R. (1996). Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1998-2003.
- ROHMER, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565-574.
- ROHMER, M., KNANI, M., SIMONIN, P., SUTTER, B., SAHM, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* **295**, 517-524.
- ROHMER, M., SEEMANN, M., HORBACH, S., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (1996). Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 2564-2566.
- ROSARIO, S. L., DA SILVA, A. R., PARENTE, J. P. (1996). Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Medica*, 376-377.
- RÜGHEIMER, L. (1882). Künstliches Piperin. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, 1390-1391.
- RUKACHAISIRIKUL, T., SIRIWATTANAKIT, P., SUKCHAROENPHOL, K., WONGVEIN, C., RUTTANAWEANG, P., WONGWATTANAVUCH, P., SUKSAMRARN, A. (2004). Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* **93**, 173-176.
- SACHS, J. **Lehrbuch der botanik nach dem gegenwärtigen stand der wissenschaft**. Leipzig: W. Engelmann. 1874
- SARTORELLI, P., BENEVIDES, P. J. C., ELLENZOHN, R. M., ROCHA, M. V. A. F., MORENO, P. R. H., KATO, M. J. (2001). Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Science* **161**, 1083-1088.
- SATO, F., INUI, T., TAKEMURA, T. (2007). Metabolic engineering in isoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**, 211-218.
- SCHMUTTERER, H. (1990). Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem

- Tree, *Azadirachta Indica*. *Annual Review of Entomology* **35**, 271-297.
- SCHOBERT, R., SIEGFRIED, S., GORDON, G. J. (2001). Three-component synthesis of (E)- α,β -unsaturated amides of the piperine family. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2393-2397.
- SCHOENHEIMER, R., RITTENBERG, D. (1935). DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM. I. *J. Biol. Chem.* **111**, 163-168.
- SCHREIBER, S. L. (2005). Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nature chemical biology*. **1**, 64-66.
- SCHWENDER, J., SEEMANN, M., LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochemical Journal* **316**, 73-80.
- SCOTT, I., JENSEN, H., PHILOGÈNE, B., ARNASON, J. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* **7**, 65-75.
- SCOTT, I. M., GAGNON, N., LESAGE, L., PHILOGÈNE, B. J. R., ARNASON, J. T. (2005). Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera : Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology* **98**, 845-855.
- SCOTT, I. M., HELSON, B. V., STRUNZ, G. M., FINLAY, H., SAÌ NCHEZ-VINDAS, P. E., POVEDA, L., LYONS, D. B., PHILOGÈNE, B. J. R., ARNASON, J. T. (2007). Efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extract for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. *Canadian Entomologist* **139**, 513-522.
- SCOTT, I. M., JENSEN, H., SCOTT, J. G., ISMAN, M. B., ARNASON, J. T., PHILOGÈNE, B. J. R. (2003). Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **54**, 212-225.
- SCOTT, I. M., PUNIANI, E., DURST, T., PHELPS, D., MERALI, S., ASSABGUI, R. A., SANCHEZ-VINDAS, P., POVEDA, L., PHILOGÈNE, B. J. R., ARNASON, J. T. (2002). Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology* **4**, 137-144.
- SEKHON, B. S. (2008). Chemical biology: Past, present and future. *Current Chemical Biology* **2**, 278-311.
- SENGUPTA, S., RAY, A. B. (1987). The chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia* **58**, 147-166.
- SEQUENCING PROJECT INTERNATIONAL RICE, G. (2005). The map-based sequence of the rice

- genome. *Nature* **436**, 793-800.
- SERTÜNER, F. W. A. (1806). Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *Journal der Pharmacie Ärzte Apoth. Chem* **14**, 47-93.
- SEUNG, H. L., DONG, H. K., JEONG, A. K., JAHNG, Y. (2005). A simple synthesis of piperlonguminine. *Heterocyclic Communications* **11**, 407-410.
- SHAW, R. D., BAKER, J. A. (1966). The in vitro activity of supona against ticks. *Veterinary Record* **78**, 864-867.
- SIDDIQUI, B., GULZAR, T., BEGUM, S., AFSHAN, F., SULTANA, R. (2008). A new natural product and insecticidal amides from seeds of *Piper nigrum* Linn. *Natural Product Research* **22**, 1107-1111.
- SIDDIQUI, B. S., GULZAR, T., BEGUM, S., RASHEED, M., SATTAR, F. A., AFSHAN, F. (2003). Two new insecticidal amides and a new alcoholic amide from *Piper nigrum* LINN. *Helvetica Chimica Acta* **86**, 2760-2767.
- SIDDIQUI, Z. N., KHUWAJA, G., AHMAD, J. (2007). Antifungal activity of Cubebin from *Piper cubeba*. *Journal of the Indian Chemical Society* **84**, 823-824.
- SILVA, D. R., BARONI, S., SVIDZINSKI, A. E., BERSANI-AMADO, C. A., CORTEZ, D. A. G. (2008). Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **116**, 569-573.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2007
- SIMAS, N. K., LIMA, E. D. C., KUSTER, R. M., LAGE, C. L. S., DE OLIVEIRA FILHO, A. M. (2007). Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **40**, 405-407.
- SINGH, J., POTDAR, M. A., ATAL, C. K., DHAR, K. L. (1974). Structure of a new pyrrolidine alkaloid from *Piper trichostachyon*. *Phytochemistry* **13**, 677-678.
- SINGH, S. K., ASHOK, P. K., OLSEN, C. E., JHA, A., JAIN, S. C., PARMAR, V. S., WENGE, J. (1996). Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry* **43**, 1355-1360.
- SMETANSKA, I., 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: Stahl, U., Donalies, U. E. B., Nevoigt, E. (Eds.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 111, pp. 187-228.
- SMITH, K. K., DHARMARATNE, H. R. W., FELTENSTEIN, M. W., BROOM, S. L., ROACH, J. T., NANAYAKKARA, N. P. D., KHAN, I. A., SUFKA, K. J. (2001). Anxiolytic effects of kava

- extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. *Psychopharmacology* **155**, 86-90.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., CHASE, M. W., MORT, M. E., ALBACH, D. C., ZANIS, M., SAVOLAINEN, V., HAHN, W. H., HOOP, S. B., FAY, M. F., AXTELL, M., SWENSEN, S. M., W., L. M. P., KRESS, J., NISON, K. C., FARRIS, J. S. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, vbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**, 381-461.
- SOUMYANATH, A., VENKATASAMY, R., JOSHI, M., FAAS, L., ADEJUYIGBE, B., DRAKE, A. F., HIDER, R. C., YOUNG, A. R. (2006). UV irradiation affects melanocyte stimulatory activity and protein binding of piperine. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 1541-1548.
- SPRINGER, J. E., AZBILL, R. D., CARLSON, S. L. (1998). A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. *Brain Research Protocols* **2**, 259-263.
- SRINIVASA REDDY, P., JAMIL, K., MADHUSUDHAN, P., ANJANI, G., DAS, B. (2001). Antibacterial Activity of Isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* **39**, 236-238.
- SRINIVASAN, K. (2007). Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**, 735-748.
- SRIVASTAVA, S., VERMA, R. K., GUPTA, M. M., KUMAR, S. (1999). Reversed-phase liquid chromatography of 1,3-benzodioxanes in *Piper mullesua*. *Journal of Chromatography A* **841**, 123-126.
- STAHMANN, M. A. (1963). Plant Proteins. *Annual Review of Plant Physiology* **14**, 137-158.
- STÖHR, J. R., XIAO, P.-G., BAUER, R. (2001). Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* **75**, 133-139.
- STOHR, J. R., XIAO, P. G., BAUER, R. (1999). Isobutylamides and a new methylbutylamide from *Piper sarmentosum*. *Planta Medica* **65**, 175-177.
- STRICKLER, M. P., STONE, M. J., KENNINGTON, A. S., GOLDSTEIN, D. M. (1989). Strategy for the preparative-scale high-performance liquid chromatographic isolation of kadsurenone and futoquinol from the medicinal plant *Piper futokadsura*. *Journal of Chromatography* **484**, 369-379.
- STRUNZ, G. M., FINLAY, H. (1994). Concise, efficient new synthesis of pipericide, an insecticidal unsaturated amide from *Piper nigrum*, and related compounds. *Tetrahedron* **50**, 11113-11122.

- STRUNZ, G. M., FINLAY, H. J. (1996). Expedient synthesis of unsaturated amide alkaloids from *Piper* spp: Exploring the scope of recent methodology. *Canadian Journal of Chemistry* **74**, 419-432.
- SUNILA, E. S., KUTTAN, G. (2004). Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology* **90**, 339-346.
- SWAIN, T. (1977). Secondary Compounds as Protective Agents. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 479-501.
- TABOPDA, T. K., NGROUPAYO, J., LIU, J., MITAINE-OFFER, A. C., TANOLI, S. A. K., KHAN, S. N., ALI, M. S., NGADJUI, B. T., TSAMO, E., LACAILLE-DUBOIS, M.-A., LUU, B. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* **69**, 1726-1731.
- TATON, M., RAHIER, A. (1996). Plant Sterol Biosynthesis: Identification and Characterization of Higher Plant Delta 7 -Sterol C5(6)-Desaturase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **325**, 279-288.
- TAYLOR, D. W., HICKEY, L. J. (1992). Phylogenetic Evidence for the Herbaceous Origin of Angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* **180**, 137-156.
- THEIS, N., LERDAU, M. (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences* **164**, S93-S102.
- THOMAS, R. (2004). Biogenetic speculation and biosynthetic advances. *Natural Product Reports* **21**, 224-248.
- THORPE, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* **37**, 169-180.
- TSAI, I. L., LEE, F. P., WU, C. C., DUH, C. Y., ISHIKAWA, T., CHEN, J. J., CHEN, Y. C., SEKI, H., CHEN, I. S. (2005). New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. *Planta Medica* **71**, 535-542.
- TSUBOI, S., TAKEDA, A. (1979). A new synthesis of piperine and isochavicine. *Tetrahedron Letters* **NO 12**, 1043-1044.
- TUNTIWACHWUTTIKUL, P., PHANSA, P., POOTAENG-ON, Y., TAYLOR, W. C. (2006). Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**, 149-151.
- TYAGI, O. D., JENSEN, S., BOLL, P. M., SHARMA, N. K., BISHT, K. S., PARMAR, V. S. (1993). Lignans and neolignans from *Piper schmidtii*. *Phytochemistry* **32**, 445-448.
- ULLAH, N., ARAFEH, K. M. (2009). The first total synthesis of aplysamine 6, an inhibitor of isoprenylcysteine carboxy methyltransferase. *Tetrahedron Letters* **50**, 158-160.
- VAN DER HEIJDEN, R., JACOBS, D. I., SNOEIJER, W., HALLARD, D., VERPOORTE, R. (2004). The

- Catharanthus alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 607-628.
- VANIN, S. A., RAMOS, C. S., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. (2008). Insect feeding preferences on Piperaceae species observed in São Paulo city, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* **52**, 72-77.
- VENKATASAMY, R., FAAS, L., YOUNG, A. R., RAMAN, A., HIDER, R. C. (2004). Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 1905-1920.
- VERPOORTE, R., CONTIN, A., MEMELINK, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* **1**, 13-25.
- VOGEL, A. I. **Química Orgânica. Análise Orgânica Qualitativa**. 2a ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S.A., v. 1, 2 e 3. 1988
- VYVYAN, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **58**, 1631-1646.
- WADSWORTH, W. S., EMMONS, W. D. (1961). The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **83**, 1733-1738.
- WALTERS, D., MEURER-GRIMES, B., ROVIRA, I. (2001). Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 255-258.
- WANG, X., ZOU, X., LI, J., HU, Q. (2005). Efficient syntheses of β -amino-*N*-acylbenzotriazoles and cinnamides through regioselective 1,4- or 1,2-addition of amines to *N*-cinnamoylbenzotriazoles. *Synlett*, 3042-3046.
- WANKE, S., JARAMILLO, M. A., BORSCH, T., SAMAIN, M.-S., QUANDT, D., NEINHUIS, C. (2007). Evolution of Piperales--matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 477-497.
- WATERMAN, P. G., GRAY, A. I. (1987). Chemical systematics. *Nat. Prod. Rep.* **4**, 175-203.
- WATKINS, R. W., MOSSON, H. J., GURNEY, J. E., COWAN, D. P., EDWARDS, J. P. (1996). Cinnamic acid derivatives: Novel repellent seed dressings for the protection of wheat seed against damage by the field slug, *Deroceras reticulatum*. *Crop Protection* **15**, 77-83.
- WEI, K., DOU, D. Q., PEI, Y. P., CHEN, Y. J. (2002). Comparison of the chemical constituents and pharmacological action of *Piper nigrum* Linn. with *P. methysticum* forst. *Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* **27**, 328-333.
- WEI, K., LI, W., KOIKE, K., PEI, Y., CHEN, Y., NIKAIDO, T. (2004). New Amide Alkaloids from the

- Roots of *Piper nigrum*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1005-1009.
- WEISSHAAR, B., JENKINS, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 251-257.
- WHITTON, P. A., LAU, A., SALISBURY, A., WHITEHOUSE, J., EVANS, C. S. (2003). Kava lactones and the kava-kava controversy. *Phytochemistry* **64**, 673-679.
- WILLIAMS, D. H., STONE, M. J., HAUCK, P. R., RAHMAN, S. K. (1989). Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *J. Nat. Prod.* **52**, 1189-1208.
- WINK, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- WINK, M., MOHAMED, G. I. A. (2003). Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**, 897-917.
- WINK, M., SCHMELLER, T., LATZ, B., UUML, NING, B. (1998). Modes of Action of Allelochemical Alkaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA, and Other Molecular Targets. *Journal of Chemical Ecology* **24**, 1881-1937.
- WINK, M., WITTE, L. (1983). Evidence for a wide-spread occurrence of the genes of quinolizidine alkaloid biosynthesis. Induction of alkaloid accumulation in cell suspension cultures of alkaloid-'free' species. *Febs Letters* **159**, 196-200.
- WITTIG, G., HAAG, W. (1955). Über Triphenyl-phosphinmethylen als olefinbildende Reagenzien (II. Mitteil.). *Chemische Berichte* **88**, 1654-1666.
- WITTIG, G., SCHÖLLKOPF, U. (1954). Über Triphenyl-phosphin-methylen als olefinbildende Reagenzien (I. Mitteil.). *Chemische Berichte* **87**, 1318-1330.
- WONG, C. C., CHEN, K. W., HE, Q.-Y., CHEN, F. (2008). Unraveling the molecular targets of natural products: Insights from genomic and proteomic analyses. *PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS* **2**, 338-354.
- WU, Q. L., WANG, S. P., TU, G. Z., FENG, Y. X., YANG, J. S. (1997). Alkaloids from *Piper puberulum*. *Phytochemistry* **44**, 727-730.
- XIA, W., ZENG, J. P., CHEN, L. B., JIANG, A. L., XIANG, L., XU, J., CUI, X., HAN, E. J. (2007). Inhibition of β -amyloid precursor protein gene in SK-N-SH cells by piperlonguminine/dihydropiperlonguminine components separated from Chinese herbal medicine *Futokadsura* stem. *Chinese Journal of Physiology* **50**, 157-163.
- XIAO, X., QIAN, F., XIE, J., PAN, S. (2005). Amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. *Zhongcaoyao* **36**, 508-510.

- XIAO, X. X., PAN, S. L. (2004). Pharmacological studies on extracts from *Piper boehmeriaefolium* var. *tonkinense*. *Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* **29**, 578-580.
- XUAN, T. D., ELZAAWELY, A. A., FUKUTA, M., TAWATA, S. (2006). Herbicidal and fungicidal activities of lactones in Kava (*Piper methysticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 720-725.
- XUAN, T. D., FUKUTA, M., WEI, A. C., ELZAAWELY, A. A., KHANH, T. D., TAWATA, S. (2008). Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. *Journal of Natural Medicines* **62**, 188-194.
- ZANON, C. M. V., REIS, N. R. D. (2007). Bats (Mammalia, Chiroptera) in the Ponta Grossa region, Campos Gerais, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **24**, 327-332.
- ZENK, M. H. (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861-3863.
- ZENK, M. H., RUEFFER, M., AMANN, M., DEUS-NEUMANN, B., NAGAKURA, N. (1985). Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *Journal of Natural Products* **48**, 725-738.
- ZHANG, H., MATSUDA, H., NAKAMURA, S., YOSHIKAWA, M. (2008). Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 3272-3277.
- ZHI-JUN, Y., SRIRANGANATHAN, N., VAUGHT, T., ARASTU, S. K., ANSAR AHMED, S. (1997). A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. *Journal of Immunological Methods* **210**, 25-39.
- ZHONG, J. J., YUE, C. J., 2005. Plant cells: Secondary metabolite heterogeneity and its manipulation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 100, pp. 53-88.
- ZHOU, L., XU, X. D., YANG, J. S. (2002). Research progress on alkaloids and lignans from Piper plants. *Chinese Pharmaceutical Journal* **37**, 161-164.

7 APÊNDICE-A: ESPECTROS DE PRODUTOS NATURAIS

Figura 7.1 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de piperovatina

Figura 7.2 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de piperovatina

Figura 7.3 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de piperovatina

Figura 7.4 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de piperlonguminina

Figura 7.5 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de piperlonguminina

Figura 7.6 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de piperlonguminina

Figura 7.7 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de isopiperlonguminina

Figura 7.8 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de isopiperlonguminina

Figura 7.9 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de isopiperlonguminina

Figura 7.10 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da corcovadina

Figura 7.11 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da corcovadina

Figura 7.12 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da corcovadina

Figura 7.13 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de scutifoliamida A

Figura 7.14 Ampliação de espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de scutifoliamida A

Figura 7.15 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de scutifoliamida A

Figura 7.16 Espectro no IV de scutifoliamida A

Figura 7.17 Espectro de massas de scutifoliamida A

Figura 7.18 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de scutifoliamida B

Figura 7.19 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de scutifoliamida B

Figura 7.20 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de scutifoliamida B

Figura 7.21 Espectro no IV de scutifoliamida B

Figura 7.22 Espectro de massas de scutifoliamida B

Figura 7.23 Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) de estigmalactama

Figura 7.24 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) de estigmalactama

Figura 7.25 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) de estigmalactama

Figura 7.26 Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD, 75 MHz) de estigmalactama

Figura 7.27 Espectro de massas de stigmalactama

Figura 7.28 Espectro no IV de stigmalactama

Figura 7.29 Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) de piperolactama C

Figura 7.30 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300 MHz) de piperolactama C

Figura 7.31 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de piperolactama C

Figura 7.32 Espectro de massas de piperolactama C

Figura 7.33 Espectro no IV de piperolactama C

Figura 7.34 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de piplartina

Figura 7.35 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de piplartina

Figura 7.36 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de pelitorina

Figura 7.37 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de pelitorina Figura 7.38 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 11

Figura 7.39 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 11

Figura 7.40 Espectro no IV de 11

Figura 7.41 Espectro de massas de 11

Figura 7.42 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de 12

Figura 7.43 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de 12

Figura 7.44 Espectro de RMN 2-D (HSQC, CDCl₃, 300 MHz) de 12

Figura 7.45 Espectro no IV de 12

Figura 7.46 Espectro de massas de 12

8 APÊNDICE-B: ESPECTROS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

8.1 DIENAMIDAS

Figura 8.1 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de 1

Figura 8.2 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de 1

Figura 8.3 Espectro no IV de 1

Figura 8.4 Espectro de massas de 1

Figura 8.5 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 1a

Figura 8.6 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 1a

Figura 8.7 Espectro no IV de 1a

Figura 8.8 Espectro de 1a

Figura 8.9 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 1b

Figura 8.10 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 1b

Figura 8.11 Espectro no IV de 1b

Figura 8.12 Espectro de massas de 1b

Figura 8.13 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 1c

Figura 8.14 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 1c

Figura 8.15 Espectro no IV de 1c

Figura 8.16 Espectro de massas de 1c

Figura 8.17 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300MHz) de 2

Figura 8.18 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de 2

Figura 8.19 Espectro no IV de 2

Figura 8.20 Espectro de massas de 2

Figura 8.21 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 2a Figura 8.22 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 2a

Figura 8.23 Espectro no IV de 2a

Figura 8.24 Espectro de massas de 2a

Figura 8.25 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 2b

Figura 8.26 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 2b

Figura 8.27 Espectro no IV de 2b

Figura 8.28 Espectro de massas de 2b

Figura 8.29 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- D_6 , 300 MHz) de 3

Figura 8.30 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , 75 MHz) de 3

Transmittance/Wavenumber (cm⁻¹)

Figura 8.31 Espectro no IV de 3

Figura 8.32 Espectro de massas de 3

Figura 8.33 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 3b

Figura 8.34 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 3b

Figura 8.35 Espectro no IV de 3b

Figura 8.36 Espectro de massas de 3b

Figura 8.37 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 3c Figura 8.38 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 3c

Figura 8.39 Espectro no IV de 3c

Figura 8.40 Espectro de massas de 3c

Figura 8.41 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 3d

Figura 8.42 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 3d

Figura 8.43 Espectro no IV de 3d

Figura 8.44 Espectro de massas de 3d

Figura 8.45 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 3e Figura 8.46 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 3e

Figura 8.47 Espectro no IV de 3e

Figura 8.48 Espectro de massas de 3e

Figura 8.49 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-D₆, 200 MHz) de 4 Figura 8.50 Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-D₆, 50 MHz) de 4

Figura 8.51 Espectro no IV de 4

Figura 8.52 Espectro de massas de 4

Figura 8.53 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 4a Figura 8.54 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 4a

Figura 8.55 Espectro no IV de 4a

Figura 8.56 Espectro de massas de 4a

Figura 8.57 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 4c Figura 8.58 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 4c

Figura 8.59 Espectro no IV de 4c

Figura 8.60 Espectro de massas de 4c

Figura 8.61 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 4d Figura 8.62 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 4d

Figura 8.63 Espectro no IV de 4d

Figura 8.64 Espectro de massas de 4d

8.2 CINAMAMIDAS

Figura 8.65 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 5a Figura 8.66 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 5a

Figura 8.67 Espectro no IV de 5a

Figura 8.68 Espectro de massas de 5a

Figura 8.69 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 5b

Figura 8.70 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 5b

Figura 8.71 Espectro no IV de 5b

Figura 8.72 Espectro de massas de 5b

Figura 8.73 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 5c Figura 8.74 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 5c

Figura 8.75 Espectro no IV de 5c

Figura 8.76 Espectro de massas de 5c

Figura 8.77 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 5d Figura 8.78 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 5d

Figura 8.79 Espectro no IV de 5d

Figura 8.80 Espectro de massas de 5d

Figura 8.81 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 5e Figura 8.82 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 5e

Figura 8.83 Espectro no IV de 5e

Figura 8.84 Espectro de massas de 5e

Figura 8.85 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-D₆, 200 MHz) de 6

Figura 8.86 Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-D₆, 50 MHz) de 6

Figura 8.87 Espectro no IV de 6

Figura 8.88 Espectro de massas de 6

Figura 8.89 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 6a Figura 8.90 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 6a

Figura 8.91 Espectro no IV de 6a

Figura 8.92 Espectro de massas de 6a

Figura 8.93 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 6b

Figura 8.94 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 6b

Figura 8.95 Espectro no IV de 6b

Figura 8.96 Espectro de massas de 6b

Figura 8.97 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 6c Figura 8.98 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 6c

Figura 8.99 Espectro no IV de 6c

Figura 8.100 Espectro de massas de 6c

Figura 8.101 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 6d Figura 8.102 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 6d

Figura 8.103 Espectro no IV de 6d

Figura 8.104 Espectro de massas de 6d

Figura 8.105 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 6e

Figura 8.106 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 6e

Figura 8.107 Espectro no IV de 6e

Figura 8.108 Espectro de massas de 6e

Figura 8.109 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-D₆, 200 MHz) de 7

Figura 8.110 Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-D₆, 50 MHz) de 7

Figura 8.111 Espectro no IV de 7

Figura 8.112 Espectro de massas de 7

Figura 8.113 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 7a Figura 8.114 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 7a

Figura 8.115 Espectro no IV de 7a

Figura 8.116 Espectro de massas de 7a

Figura 8.117 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 7c Figura 8.118 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 7c

Figura 8.119 Espectro no IV de 7c

Figura 8.120 Espectro de massas de 7c

Figura 8.121 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-D₆, 200 MHz) de 8

Figura 8.122 Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-D₆, 50 MHz) de 8

Figura 8.123 Espectro no IV de 8

Figura 8.124 Espectro de massas de 8

Figura 8.125 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 8a Figura 8.126 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 8a

Figura 8.127 Espectro no IV de 8a

Figura 8.128 Espectro de massas de 8a

Figura 8.129 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 8b Figura 8.130 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 8b

Figura 8.131 Espectro no IV de 8b

Figura 8.132 Espectro de massas de 8b

Figura 8.133 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 8c

Figura 8.134 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de 8c

Figura 8.135 Espectro no IV de 8c

Figura 8.136 Espectro de massas de 8c

Figura 8.137 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 8d Figura 8.138 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 8d

Figura 8.139 Espectro no IV de 8d

Figura 8.140 Espectro de massas de 8d

Figura 8.141 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-D₆, 200 MHz) de 9

Figura 8.142 Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-D₆, 50 MHz) de 9

Figura 8.143 Espectro no IV de 9

Figura 8.144 Espectro de massas de 9

Figura 8.145 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 9a Figura 8.146 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 9a

Figura 8.147 Espectro no IV de 9a

Figura 8.148 Espectro de massas de 9a

Figura 8.149 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 9b Figura 8.150 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 9b

Figura 8.151 Espectro no IV de 9b

Figura 8.152 Espectro de massas de 9b

Figura 8.153 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 9c Figura 8.154 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 9c

Figura 8.155 Espectro no IV de 9c

Figura 8.156 Espectro de massas de 9c

Figura 8.157 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 9d Figura 8.158 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 9d

Figura 8.159 Espectro no IV de 9d

Figura 8.160 Espectro de massas de 9d

Figura 8.161 Espectro de RMN ^1H (DMSO- D_6 , 200 MHz) de 10

Figura 8.162 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , 50 MHz) de 10

Figura 8.163 Espectro no IV de 10

Figura 8.164 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 10a

Figura 8.165 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 10a

Figura 8.166 Espectro no IV de 10a

Figura 8.167 Espectro de massas de 10a

Figura 8.168 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 10b Figura 8.169 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 10b

Figura 8.170 Espectro no IV de 10b

Figura 8.171 Espectro de massas de 10b

Figura 8.172 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 10d Figura 8.173 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 10d

Figura 8.174 Espectro no IV de 10d

Figura 8.175 Espectro de massas de 10d

Figura 8.176 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 10e

Figura 8.177 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) de 10e

Figura 8.178 Espectro no IV de 10e

Figura 8.179 Espectro de massas de 10e

9 SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Joaquim Vogt Marques
Local de nascimento: São Paulo, SP
Data de nascimento: 6 de agosto de 1980
Nacionalidade: Brasileiro

Educação

1984-1998 Escola Vera Cruz , São Paulo ,

1999-2002: Bacharelado em Química/Especialização em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.

2003-2009: Doutorado (Química Orgânica). Universidade de São Paulo.

Ocupação

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Doutorado Direto em Química Orgânica, 2003-atual

Profissão: Pesquisador

Atuação profissional

1999-1999: Estagiário: Laboratório de Espectroscopia molecular, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

2000-2000: Técnico de Laboratório de Controle de Qualidade, Quimicryl S.A.

2001-2002: Iniciação Científica: Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

2003-presente: Aluno de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

2007-2007: Pesquisador Visitante, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, EUA.

Produção bibliográfica

Marques, J. V., Kitamura, Rodrigo O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., Kato, M. J. Antifungal Amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of Natural Products*. , v.70, p.2036 - 2039, 2007.

- Marques, J. V., de Oliveira, A., Young, M. C. M., Kato, M. J. Antifungal piperolides, coumarins, pyrones and amides from *Piper* species and synthetic analogs In: 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF, 2008, Atenas. *Planta Med.* v.74. p.1169 – 1169 2008.
- Marques, J. V., Kato, M.J., Vassão, D.G., Davin, L.D., Lewis, N.G. Partial purification and characterization of eupomatenoid-6 synthase from *Piper regnellii*. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Resem, 2007, São Pedro.
Livro de Resumos do 1st BCNP and XXVII RESEM. , 2007.
- Marques, J. V., de Oliveira, A., Raggi, L., Young, M. C. M., KATO, M. J. Atividade de amidas isoladas de *P. scutifolium* e analogos sinteticos. In: 29 REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUIMICA, 2006, Águas de Lindóia.
- Kato, M. J. ; Furlan, M. ; Murata, A.T. ; Bortoli, S. A. ; Miranda, J. E. ; Bebonsi, H. M. ; Marques, J. V. ; Kawano, T. ; Teixeira, E. ; Bolzani, V. S. ; Mendes, M. C. ; Young, M. C. M. Composição inseticida, carrapaticida, moluscicida e/ou fungicida e uso. P.I. 0.703.109-2, *Revista da Propriedade Industrial - RPI* Nº 1921, pág. 121, o item 2.1 2007.

Produção técnica:

- Kato, Massuo Jorge ; Furlan, M. ; Murata, A.T. ; Bortoli, S. A. ; Miranda, J. E. ; Bebonsi, H. M. ; Marques, J. V.; Kawano, T. ; Teixeira, E. ; Bolzani, V. S. ; Mendes, M. C. ; Young, Maria Claudia Max . Composição inseticida, carrapaticida, moluscicida e/ou fungicida e uso.. 2007.