UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RENATA FOGAÇA DA SILVA

Metabólitos secundários das raízes de
***Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae)**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
28/11/2006

RENATA FOGAÇA DA SILVA

**Metabólitos secundários das raízes de
Piper crassinervium Kunth (Piperaceae)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Química (Química Orgânica).*

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
2006

AGRADECIMENTOS

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

À minha mãe, Izabel, por ser sempre o meu porto seguro e ao meu pai, Celso, pelas constantes palavras de incentivo.

Aos meus avós, Deborah e Celso, por toda ajuda que me deram durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Adalberto, Joca, Homero, Juliana, Karina, Felipe, Lucas e Lydia pelo agradável convívio e amizade durante esses anos.

Ao Prof. João H. G. Lago, por toda ajuda dada à interpretação dos resultados e amizade.

Aos meus companheiros e amigos de casa, Vanessa, Dilcelli e Thiago, pelo apoio, amizade e alegria que me trouxeram neste período.

À Rosane, por todo carinho, atenção e amizade. Por sempre dizer as palavras certas nas horas certas.

Aos meus grandes amigos, Wanessa e Cleiton, por todo incentivo e apoio.

Ao Fernando pela ajuda na obtenção dos dados de CLAE.

À Aline, Mariana, Grazi, Fernanda, Claudinei, Sidnei pelo carinho, amizade e momentos de descontração.

Ao Prof. Josef Wilhelm Baader por toda ajuda nas atividades de monitoria.

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

Aos funcionários da Central Analítica do IQ-USP pela ajuda na obtenção dos espectros.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

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

Albert Einstein

Dedico esta dissertação aos meus queridíssimos amigos Marisi, Denise e Alberto pela amizade, incentivo e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Por terem compartilhado comigo momentos de alegria e tristeza. Por me mostrarem o grande valor da palavra AMIZADE.

CONTEÚDO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A família Piperaceae	3
1.2. O Gênero <i>Piper</i>	3
1.3. Descrição de algumas classes de metabólitos secundários encontradas em espécies de <i>Piper</i>	9
1.4. <i>Piper crassinervium</i> Kunth	14
1.4.1. Classificação botânica geral	15
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Equipamentos	23
3.2. Material vegetal	24
3.3. Solventes	24
3.4. Materiais cromatográficos	24
3.5. Preparação do extrato bruto das raízes	25
3.6. Fracionamento do extrato bruto das raízes de <i>P. crassinervium</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Caracterização dos metabólitos secundários isolados do extrato das raízes de <i>Piper crassinervium</i>	32
4.1.1. Identificação estrutural da flavanona 1	35
4.1.2. Identificação estrutural das hidroquinonas preniladas 2 e 3	41

4.1.3. Identificação estrutural do cromeno 4	46
4.1.4. Identificação estrutural do derivado prenilado de ácido benzóico 5	50
4.1.5. Identificação estrutural da amida isobutílica 6	55
4.1.6. Identificação estrutural das amidas piperidínicas 7 e 8	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. SÚMULA CURRICULAR	76

Resumo

(Silva, R. F.) Metabólitos Secundários das Raízes de *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae). 2006, 76p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O extrato bruto (DCM:MeOH 2:1) das raízes de *Piper crassinervium* foi submetido a fracionamentos cromatográficos resultando no isolamento e identificação de oito substâncias, sendo estas uma flavanona (5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona [isosakuranetina]), duas hidroquinonas preniladas (1,4-diidroxí-2-[3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-*E*-6'-octadienil]-benzeno e 1,4-diidroxí-2-[3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-*Z*-6'-octadienil]-benzeno), um cromeno (ácido-2-metil-2-[4'-metil-3'-pentenil]2H-1-benzopirano-6-carboxílico), um derivado prenilado do ácido benzóico (ácido 4-hidroxí-3-[3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2'-*E*-6'-dienil]-benzóico), uma amida isobutílica (piperlonguminina) e duas amidas piperidínicas (piperina e diidropiperina). As substâncias isoladas tiveram suas estruturas químicas determinadas por experimentos de espectrometria de massas, RMN de ^1H e ^{13}C e comparadas com os dados da literatura.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper crassinervium*, cromeno, amidas, hidroquinonas preniladas e ácido benzóico prenilado.

Abstract

(Silva, R. F.) **Secondary compounds from roots of *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae).** 2006, 76p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The crude extracts of the roots of *Piper crassinervium* was submitted to chromatographic steps yielding eight compounds including a flavanone (5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone [isosakuranetin]), two prenylated hydroquinones (1,4-dihydroxy-2-[3',7'-dimethyl-1'-oxo-2'-*E*-6'-octadienyl]-benzene and 1,4-dihydroxy-2-[3',7'-dimethyl-1'-oxo-2'-*Z*-6'-octadienyl]-benzene), one chromene (2-methyl-2-[4'-methyl-3'-pentenyl]-2H-1-benzopyran-6-carboxylic acid), one prenylated derivative of benzoic acid (4-hydroxy-3-[3',7'-dimethyl-1'-oxo]2'-*E*-6'-octadienyl-benzoic acid), one isobutyl amide (piperlonguminine) and two piperidine amides (piperine and dihydropiperine). The structures of the isolated compounds were determined by mass spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR data by comparison with the literature data.

Keywords: Piperaceae, *Piper crassinervium*, chromene, amides, prenylated hydroquinone and prenylated benzoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas da salicinina, saligenina e ácido acetilsalicílico	1
Figura 2	Estrutura da vimblastina e da vincristina	2
Figura 3	Estrutura do safrol	4
Figura 4	Estruturas da neolignanas isoladas de <i>P. regnellii</i> com atividade tripanomicidal	5
Figura 5	Estruturas das lignanas tetraidrofurânicas ativas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 6	Algumas amidas isoladas de <i>P. tuberculatum</i> e <i>P. arboreum</i> com atividade biológica	7
Figura 7	Alguns cromenos e aduncamida isolados de <i>P. aduncum</i>	8
Figura 8	Espécies do gênero <i>Piper</i> (Piperaceae)	8
Figura 9	<i>P. crassinervium</i>	15
Figura 10	Metabólitos secundários isolados das folhas e frutos de <i>P. crassinervium</i>	17
Figura 11	Metabólitos secundários isolados de suspensão celular de <i>P. crassinervium</i>	18
Figura 12	Hidroquinonas preniladas e derivados isolados de <i>Aplidium californicum</i>	19
Figura 13	Hidroquinonas preniladas e derivados isolados de <i>Aplidium conicum</i>	20
Figura 14	Esquema de fracionamento cromatográfico do extrato bruto das raízes de <i>P. crassinervium</i>	26
Figura 15	Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc3	27
Figura 16	Esquema de fracionamento cromatográfico da fração A4	28

Figura 17	Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc4	29
Figura 18	Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc5	30
Figura 19	Cromatograma do extrato bruto das raízes e folhas de <i>P. crassinervium</i> .	33
Figura 20	Metabólitos secundários isolados das raízes de <i>P. crassinervium</i>	34
Figura 21	Espectro de massas da substância 1	36
Figura 22	Principais fragmentações de massas da substância 1	37
Figura 23	Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (200 MHz, MeOD)	39
Figura 24	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (75 MHz, MeOD)	40
Figura 25	Estruturas das hidroquinonas preniladas 2 e 3	42
Figura 26	Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (<i>E</i>) (300 MHz, CDCl_3)	44
Figura 27	Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (<i>Z</i>) (300 MHz, CDCl_3)	45
Figura 28	Estrutura do 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-2 <i>H</i> -1-benzopirano-6-carboxílico (4)	46
Figura 29	Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (200 MHz, CDCl_3)	48
Figura 30	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (75 MHz, CDCl_3)	49
Figura 31	Espectro de RMN de ^1H da substância 5 (200 MHz, CDCl_3)	52
Figura 32	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (50 MHz, CDCl_3)	53
Figura 33	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (75 MHz, CDCl_3)	54
Figura 34	Estrutura da piperlonguminina	55
Figura 35	Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (200 MHz, CDCl_3)	57
Figura 36	Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (200 MHz, CDCl_3)	58
Figura 37	Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (200	59

	MHz, CDCl ₃)	
Figura 38	Espectro de RMN de ¹³ C da substância 7 (50 MHz, CDCl ₃)	60
Figura 39	Espectro de massas da substância 7	63
Figura 40	Espectro de massas da substância 8	63
Figura 41	Interpretação dos dados de EM da substância 7	64
Figura 42	Interpretação dos dados de EM da substância 8	64
Figura 43	Espectro de RMN de ¹ H das substâncias 7 e 8 (200 MHz, CDCl ₃)	65
Figura 44	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H das substâncias 7 e 8 (200 MHz, CDCl ₃)	66
Figura 45	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H das substâncias 7 e 8 (200 MHz, CDCl ₃)	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas amidas isoladas de espécies do gênero <i>Piper</i>	10
Tabela 2	Alguns cromenos isolados de espécies do gênero <i>Piper</i>	11
Tabela 3	Alguns derivados de ácido benzóico isolados de espécies do gênero <i>Piper</i>	12
Tabela 4	Alguns flavonóides isolados de espécies do gênero <i>Piper</i>	14
Tabela 5	Frações obtidas no fracionamento do extrato bruto das raízes	26
Tabela 6	Frações obtidas no fracionamento de Rpc3	27
Tabela 7	Frações obtidas no fracionamento de A4	28
Tabela 8	Frações obtidas no fracionamento de Rpc4	30
Tabela 9	Frações obtidas no fracionamento de Rpc5	31
Tabela 10	Dados de RMN de ^1H (MeOD, 200 MHz) e ^{13}C (MeOD, 75 MHz) para a substância 1	38
Tabela 11	Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para as substâncias 2 e 3	43
Tabela 12	Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para a substância 4	47
Tabela 13	Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para a substância 5	51
Tabela 14	Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para a substância 6	56
Tabela 15	Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para as substâncias 7 e 8	62

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CPC	Cromatografia planar comparativa
CPP	Cromatografia planar preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dubleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
EM	Espectrometria de massas
Hex	Hexano
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
λ	Comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

Há décadas muitos pesquisadores vêm se dedicando ao estudo de produtos naturais, principalmente voltado ao isolamento e determinação estrutural de substâncias pertencentes às mais diversas classes químicas. A descrição de tais produtos com potenciais atividades biológicas e farmacológicas, tem resultado em importantes descobertas para a humanidade. A exemplo disso tem-se *Salix alba* L. (Salicaceae) e *Filipendula ulmaria* (L.) Max. (Rosaceae), de onde foram isoladas a salicinina e a saligenina, respectivamente (Figura 1). Esses compostos, derivados do ácido salicílico, apresentam comprovadas propriedades analgésicas e antiinflamatórias e culminaram por dar origem à aspirina, um composto sintético comercializado inicialmente na Alemanha, pela Bayer (Hostettmann *et al.*, 2003).

Figura 1. Estruturas da (1) salicinina, (2) saligenina e (3) ácido acetil salicílico (aspirina).

Outro importante exemplo são os alcalóides vinblastina e vincristina (Figura 2), isolados de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae). Esses compostos foram descobertos no fim dos anos 60, e até os dias de hoje constituem-se num recurso indispensável para o tratamento da leucemia (Hostettmann *et al.*, 2003).

Figura 2. Estrutura da vinblastina e da vincristina.

Atualmente, o uso de princípios ativos de plantas tem avançado significativamente e, considerando o rápido desenvolvimento das diferentes áreas da ciência, como química, biologia, farmacologia e medicina bem como o progresso das técnicas de análise e separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas, as aplicações e os benefícios têm sido cada vez mais impactantes na saúde humana.

Estima-se que cerca de 200.000 produtos naturais tenham sido descritos (Tulp & Bohlin, 2005) e, considerando que por volta de 25% das substâncias utilizadas como medicamentos prescritos em países industrializados têm sua origem em ativos de plantas (Hostettmann *et al.*, 2003), os metabólitos secundários representam um fantástico universo a ser explorado. O Brasil, neste aspecto, encontra-se em uma posição de destaque, pois possui aproximadamente 22% da flora mundial (Moreira *et al.*, 2006), sendo assim, uma das maiores biodiversidades do planeta.

A importância da descoberta de produtos naturais biologicamente ativos, seu estudo descritivo bem como suas funções nos tecidos onde ocorrem é de grande importância para a compreensão de processos vitais.

1.1. A família Piperaceae

A família Piperaceae, pertencente à ordem das Piperales, é considerada uma das famílias mais primitivas entre as angiospermas. É composta por aproximadamente 14 gêneros e cerca de 2000 espécies (Mabberley, 1997). É pantropical com espécies distribuídas pelas Américas desde o México até o sudoeste da Argentina, encontrando-se plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo com mais de três metros de altura (Figueiredo & Sazima, 2000; Albiero *et al.*, 2005). Desta família, os gêneros *Piper* e *Peperomia* são os mais abundantes com aproximadamente 700 e 600 espécies respectivamente (Joly, 1985; Parmar *et al.*, 1997), e também os mais estudados quimicamente. A família Piperaceae vem sendo extensivamente investigada como fonte de novos produtos naturais com potenciais antitumoral, antimicrobiano, antifúngico e inseticida (Lago *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 1997).

1.2. O Gênero *Piper*

Grande parte das espécies do gênero *Piper* destaca-se pelo seu uso na medicina popular e por sua vasta importância econômica devido ao acúmulo de metabólitos fixos e voláteis de grande utilidade para a indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola (Silva & Machado, 1999; Parmar *et al.*, 1997).

As sementes dos frutos de *Piper nigrum* deram origem à pimenta do reino conhecida no Brasil (“pimenta” em Portugal e “pimenta redonda” em Moçambique). Dos diferentes estágios de maturação e colheita dos frutos de *P. nigrum*, é que se origina a pimenta-verde, pimenta-branca e pimenta-preta.

(Variyar *et al.*, 1988). Outra espécie que assumiu importância comercial importante é a *P. hispidinervium*, de onde passou a ser extraído o safrol (Figura 3). O safrol é utilizado na fabricação de fixadores, fragâncias e inseticidas naturais (Maia *et al.*, 1987) e foi por muito tempo extraído de *Ocotea pretiosa* (Lauraceae), que encontra-se em extinção devido a intensa exploração (Maia *et al.*, 1993).

Figura 3. Estrutura do safrol.

Estudos químicos realizados com espécies de *Piper* possibilitaram a identificação de uma grande variedade de novos compostos químicos pertencentes à diversas classes químicas, incluindo-se alcalóides, amidas, lignanas, neolignanas, propenilfenóis, terpenos, esteróides, chalconas, di-hidrochalconas, flavonas, flavanonas, kavapironas, piperolídeos, cromenos e derivados de ácidos benzóicos (Sengupta & Rao, 1987; Jensen *et al.*, 1993, Parmar *et al.*, 1997; Lago *et al.*, 2004). Muitas dessas são biologicamente ativas e têm apresentado potenciais antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, inseticida, larvicida e moluscicida entre outros (Silva *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2003; Isao, 1984; Lago *et al.*, 2004).

Dentre as inúmeras descrições da literatura acerca do potencial biológico das espécies deste gênero podem ser citados exemplos como *P. regnellii*, utilizada no tratamento da dor, afecções febris e/ou reumáticas e apresenta atividade analgésica positiva (Silva & Machado, 1999). Como resultado do estudo químico realizado com esta espécie, foram identificadas neolignanas ativas frente

à *Trypanosoma cruzi* (Figura 4), vetor de transmissão da doença de Chagas, uma doença de forte impacto na América latina, que atinge cerca de 18 milhões de pessoas, causando aproximadamente 45.000 mortes por ano (Luize *et al.*, 2006). Outra importante atividade biológica de *P. regnelli* está em seu óleo essencial que, juntamente com o de *P. cernuum*, apresenta potencial antimicrobiano frente à *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Costantin *et al.*, 2001).

Figura 4. Estruturas das neolignanas isoladas de *P. regnelli* com atividade tripanomicida.

P. solmsianum acumula lignanas tetraidrofurânicas (Figura 5), que também são ativas frente a *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2003), sendo a grandisina o seu metabólito secundário mais abundante. Desta espécie também foram isoladas neolignanas e um flavonóide que apresentaram atividade antifúngica (De Campos *et al.*, 2005).

Figura 5. Estruturas das lignanas tetraidrofurânicas ativas contra *Trypanosoma cruzi*.

De *P. tuberculatum*, e *P. arboreum* foram identificadas amidas com atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002) (Figura 6), sendo que amidas de *P. tuberculatum* também apresentaram atividade inseticida (Miranda *et al.*, 2003; Navickiene *et al.*, 2003) e também atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do vetor responsável pela doença de esquistossomose (Isao, 1984).

Figura 6. Algumas amidas isoladas de *P. tuberculatum* e *P. arboreum* com atividade biológica.

Piper aduncum é utilizada popularmente como repelente de insetos, analgésico para dores estomacais e também em banhos aromáticos (Asprey & Thorton, 1954). Desta espécie isolou-se a aduncamida (Figura 7) que apresenta atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (Orjala *et al.*, 1993). O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta atividade fungitóxica (Bastos & Albuquerque, 2004), e esta espécie também se destaca pelo acúmulo de cromenos (Figura 7) com potencial fungicida, moluscicida e com atividade antitumoral (Baldoqui *et al.*, 1999; Orjala *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 1998).

Figura 7. Alguns cromenos e a aduncamida isoladas de *P. aduncum*

A figura 8 demonstra alguns exemplares dentre as várias espécies do gênero *Piper* encontradas no Brasil.

Figura 8. Espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) (www.henriettesherbal.com/pictures)

1.3. Descrição de algumas classes de metabólitos secundários encontradas em espécies de *Piper*

Alcalóides e amidas são considerados os constituintes mais comuns em espécies de *Piper* e apresentam diversas atividades biológicas. A partir de espécies de *Piper* foram isoladas amidas piperidínicas, pirrolidínicas, isobutílicas e diidropiridonas com potencial inseticida, antifúngico, moluscicida, antitumoral entre outros (Miranda *et al.*, 2003; Navickiene *et al.*, 2003; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002; Isao, 1984). Na tabela 1 encontram-se descritos exemplos de amidas, sendo que algumas possuem importantes propriedades farmacológicas.

Tabela 1. Algumas amidas isoladas de espécies do gênero *Piper*.

Substância	Espécie	Atividade biológica	Referência
N-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(E),9(E)-pentadienoil]-pirrolidina	<i>P. arboreum</i>	antifúngica	Silva <i>et al.</i> , 2002
N-[2-(3',4'-metilenodioxi,6-metoxifenil)-2Z-propenoil]pirrolidina	<i>P. hispidum</i> <i>P. sarmentosum</i>	antifúngica	Navickiene <i>et al.</i> , 2000; Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006
pellitorina	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. nepalense</i> <i>P. Sylvaticum</i>	antifúngica e inseticida	Da Cunha & Chaves, 2001; Gupta & Atal, 1972; Nacickiene <i>et al.</i> , 2003
4,5-diidropiperlonguminina	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. longum</i>	moluscicida, inseticida e antifúngica	Nacickiene <i>et al.</i> , 2000
diidropiartina	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. rugosum</i> <i>P. guineense</i>	antifúngica	Silva <i>et al.</i> , 2002; Parmar <i>et al.</i> , 1997
piperovatina	<i>P. alatabaccum</i> <i>P. piscicatum</i>	piscicida e anestésica	Facundo <i>et al.</i> , 2005; McFerren & Rodriguez, 1998; McFerren <i>et al.</i> , 2002
<i>trans</i> -N-feruloiltiramina	<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. nigrum</i>	anti-PAF	Parma <i>et al.</i> , 1997; Singh <i>et al.</i> , 1996

Os cromenos compreendem uma classe de compostos não tão abundante em espécies de *Piper* quanto amidas, lignóides, fenilpropanóides e terpenos, porém estas substâncias são portadoras de potenciais farmacológicos. Os cromenos são comumente encontrados em folhas e caules, sendo raramente isolados a partir de raízes (Proksch & Rodriguez, 1983). Em espécies de *Piper* constata-se a ocorrência de cromenos em, por exemplo, *P. dilatatum*, *P. aduncum*, *P. hostmannianum* e *P. taboganum* (Baldoqui *et al.*, 1999; Orjala *et al.*, 1993; Diaz *et al.*, 1987; Lago *et al.*, 2004).

Tabela 2. Alguns cromenos isolados de espécies do gênero *Piper*.

Substância	Espécie	Atividade biológica	Referência
<p>ácido 2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>P. aduncum</i>	antifúngica e moluscicida	Orjala <i>et al.</i> , 1993
<p>2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p>	<i>P. hostmannianum</i> <i>P. dilatatum</i> <i>P. taboganum</i>	antifúngica	Diaz <i>et al.</i> , 1987; Terreaux <i>et al.</i> , 1998; Roussis <i>et al.</i> , 1990
<p>ácido 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>P. aduncum</i>	antitumoral	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999

Os derivados de ácido benzóico compreendem outra importante classe de substâncias dentro do gênero *Piper* devido aos potenciais farmacológicos

apresentados. De *P. lanceaefolium* foram isolados derivados prenilados de ácido benzóico que apresentaram atividade antifúngica (López *et al.*, 2002). *P. multiplinervium*, uma espécie encontrada nas regiões da Nicarágua ao Peru (Yuncker, 1950), acumula um derivado prenilado de ácido benzóico com atividade bactericida e antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Rüegg *et al.*, 2006). Demais exemplos de ocorrência e atividade biológica dos derivados de ácido encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3. Alguns derivados de ácido benzóico isolados de espécies do gênero *Piper*.

Substância	Espécie	Atividade biológica	Referência
ácido 3-farnesil-2-hidroxibenzóico	<i>P. multiplinervium</i>	Antimicrobiana e bactericida	Rüegg <i>et al.</i> , 2006
ácido taboganico	<i>P. dilatatum</i>	antufúngica	Terreaux <i>et al.</i> , 1998
3-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadienil)-4-metoxi-benzoato de metila	<i>P. aduncum</i>	moluscicida	Orjala <i>et al.</i> , 1993
3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-4-hidroxi-benzoato de metila	<i>P. hostmannianum</i> <i>P. aduncum</i>	moluscicida	Diaz <i>et al.</i> , 1987; Orjala <i>et al.</i> , 1993

Os flavonóides, amplamente distribuídos no reino vegetal, possuem inúmeras funções na natureza e diversas atividades biológicas, e estão principalmente relacionados com atividade fotoprotetora. Esta classe de produtos naturais pode ser subdividida em flavonas, flavanonas, flavonóis, auronas, isoflavanóis e outros compostos relacionados. Várias propriedades terapêuticas têm sido atribuídas à esses compostos polifenólicos como atividade antioxidante, antibacteriana, antidiarreica, inibição da carcinogênese pulmonar e antitumoral entre outras (Shan *et al.*, 2005; Cushnie *et al.*, 2003; Haïdara *et al.*, 2006). Tem-se descrito na literatura o acúmulo de flavonóides por espécies em *Piper*, por exemplo em *P. hostmannianum*, *P. Steerni*, *P. hispidum*, *P. aduncum* e *P. methysticum* (Parmar *et al.*, 1997).

Tabela 4. Alguns flavonóides isolados de espécies do gênero *Piper*.

Substância	Espécie
5,7-diidroxiflavanona	<i>P. hostmannianum</i> <i>P. steerni</i>
8-hidroxi-5,7-dimetoxiflavanona	<i>P. hispidum</i>
5-hidroxi-7-metoxiflavanona	<i>P. aduncum</i> <i>P. fadyeniii</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. steerni</i>
7-hidroxi-5-metoxiflavanona	<i>P. methysticum</i>

1.4 *Piper crassinervium* Kunth.

Piper crassinervium é um arbusto de 2-5 m de altura encontrada na América do Sul. No Brasil, é encontrada nos estados do Amazonas, Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Suas folhas possuem um formato ovalado com um ápice acuminado, medindo de 5 a 15 cm de largura e de 13 a 25 cm de comprimento (Yuncker, 1972).

Figura 9. *P. crassinervium*

1.4.1 Classificação botânica geral

O quadro abaixo mostra a classificação botânica geral, de acordo com o Sistema de Arranjos de Cronquist (1981).

Reino	Plantae
Divisão	Angiosperma A. Braun & Doill (Magnoliophyta)
Classe	Dicotyledonae
Subclasse	Magnolidae
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae Agardth
Gênero	<i>Piper</i>
Espécie	<i>Piper crassinervium</i>

Estudos químicos previamente realizados em folhas e frutos de *P. crassinervium* revelaram o acúmulo de flavanonas, derivados prenilados de ácidos benzóicos e hidroquinonas preniladas (Figura 10). Esta foi a primeira

descrição do isolamento de hidroquinonas preniladas em espécies de *Piper*. Estudos realizados com suspensão celular desta espécie mostraram um perfil diferenciado daquele observado na planta intacta ao se identificarem alcamidas como principais metabólitos secundários (Figura 11) (Danelutte *et al.*, 2003; Danelutte *et al.*, 2005).

As substâncias isoladas das folhas e frutos de *P. crassinervium* apresentaram potencial antioxidante (Yamaguchi *et al.*, 2006) e foram também ativas frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, sendo que as substâncias **1** e **8** (Figura 10) mostraram-se mais potentes que os padrões nistatina e miconazol (Lago *et al.*, 2004; Danelutte *et al.*, 2003).

Os constituintes do óleo essencial de *P. crassinervium* são majoritariamente monoterpenos, sendo rico em linalol, β -pireno, α -pireno e 1,8-cineol, segundo estudo feito com espécie do estado do Ceará (Cysne *et al.*, 2005). Contudo, uma outra análise realizada com uma espécie de *P. crassinervium* do Equador, mostrou β -pireno, α -pireno, limoneno e α -terpineno, como principais componentes, sendo descrito também o seu potencial antioxidante (Sacchetti *et al.*, 2005).

Figura 10. Metabólitos secundários isolados das folhas e frutos de *P. crassinervium*.

Figura 11. Metabólitos secundários isolados de suspensões celulares de *P. crassinervium*.

Dentre todos os metabólitos caracterizados nos diferentes tecidos estudados de *P. crassinervium*, as hidroquinonas preniladas foram as mais interessantes e diferenciadas, tanto pela sua ocorrência como pelo potencial biológico apresentado.

As hidroquinonas e benzoquinonas preniladas constituem-se uma classe de metabólitos secundários que têm apresentado diversas atividades biológicas. Em um estudo feito acerca da relação estrutura-atividade dessas hidroquinonas preniladas apontou-se a forte dependência entre o comprimento da cadeia lateral carbônica e o potencial antimicrobiano desses compostos. Triprenil- e tetraprenilhidroquinonas são os mais abundantes compostos desta classe de metabólitos, contudo, diprenil- e triprenilhidroquinonas são as mais estudadas (De Rosa *et al.*, 1994).

As hidroquinonas e benzoquinonas preniladas são de rara ocorrência em plantas superiores, sendo comum o acúmulo em organismos marinhos. Em *Aplidium californicum*, um tunicado marinho, foram identificadas hidroquinonas preniladas e derivados com atividade anticancer (Figura 12). (Howard & Clarkson, 1979; Cotellet *et al.*, 1991)

Figura 12. Hidroquinonas preniladas e derivados isolados de *Aplidium californicum*.

Ainda deste gênero, de *Aplidium conicum* (Figura 13), foram isoladas outras hidroquinonas preniladas com esqueleto carbônico muito semelhante às que foram identificadas em *Piper crassinervium* (Garrido *et al.*, 2002).

geranyl-hidroquinona

2-[(2'E)-7'-hidroxi-3',7'-dimetilocta-2'-enil]benzeno-1,4-diol

2-[(1'E)-3'-metoxi-3',7'-dimetilocta-1',6'-dienil]benzeno-1,4-diol

2-(3'-hidroxi-3',7'-dimetilocta-6'-enil]benzeno-1,4-diol

cordiacromeno A

conitriol

Figura 13. Hidroquinonas preniladas e derivados isolados de *Aplidium conicum*.

Verifica-se a ocorrência desta classe de compostos em esponjas marinhas, como em *Dysidea arenaria* Bergquist de onde foram isoladas duas hidroquinonas preniladas com potente e seletiva inibição *in vitro* de proteína quinase e outras com esqueleto semelhante (Yoo *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 1984). Deste mesmo gênero de esponjas, foram identificadas em *Dysidea avara*, uma hidroquinona prenilada e um derivado com atividade anti-inflamatória (Ferrándiz *et al.*, 1994). Em *Reniera fulva*, uma outra espécie de esponja, foram também identificadas

hidroquinonas com esqueleto sesquiterpênico onde, algumas delas, já haviam sido isoladas de *Halichondria panicea* (Casapullo *et al.*, 1993; Cimino *et al.*, 1973)

Em plantas superiores, um exemplo de acúmulo desta classe de substâncias e seus derivados foi observado nas raízes de *Garcinia atroviridis* (Guttiferae) (Permana *et al.*, 2003) e de *Cordia alliodora* (Boraginaceae), cujas apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* (Loiset *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Os estudos fitoquímicos anteriormente realizados com folhas de *Piper crassinervium* Kunth haviam demonstrado a presença de flavonóides e de hidroquinonas preniladas (Danelutte *et al.*, 2003; Lago *et al.*, 2004) com potencial atividades antifúngicas e antioxidantes (Yamaguchi *et al.*, 2005). As suspensões celulares, por sua vez, produziram alcanidas e nenhum dos metabólitos secundários descritos pela planta diferenciada (Danelutte *et al.*, 2005).

Assim, a presente dissertação objetivou a caracterização dos principais metabólitos secundários das raízes de *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae) através do isolamento e identificação estrutural dos mesmos.

Espera-se, assim, através da descrição do perfil metabólico em espécies de Piperaceae, contribuir para o entendimento das funções ecofisiológicas dos metabólitos secundários e também para a quimiosistemática da família Piperaceae.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker AC-200 operando a 200 e 50 MHz e Varian Inova operando a 300 e 75 MHz para as frequências de ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando-se clorofórmio e metanol deuterados da Aldrich como solventes. Como referências internas foram utilizados TMS para ^1H e pico central do solvente.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos através do sistema CG-EM da Shimadzu modelo CG-17A juntamente com espectrômetro de massas MS-QP-5050A com analisador quadrupolo, ambos operando via impacto eletrônico (IE) a 70eV, equipado com coluna capilar DB-5 de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro, 0,25m de fase estacionária de fenil 5% em 95% de metil-silicone. Utilizou-se gás hélio como gás de arraste (1mL/min.) e as temperaturas do injetor e detector foram de 220 e 280°C, respectivamente. A rampa de temperatura variou de 100 a 260°C com taxa de 5°C/min.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD VP munido de detector espectrofotométrico na região do UV/VIS (SPD-M10A VP). Utilizou-se coluna Phenomenex-Synergi C12, iniciando-se análise com ACN:H₂O na proporção 5,6:4,4 seguindo em gradiente de 35 minutos até ACN pura, com $\lambda=276$ e fluxo de 1mL/min.

3.2. Material vegetal

As raízes de *Piper crassinervium* foram coletadas em abril de 2005 na casa de vegetação do IQ-USP, local onde a espécie em questão e demais outras do gênero *Piper* e *Peperomia* são cultivadas. Esta espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidade Pedro Ruiz Gallo, Tambayeque, Peru) e a exsicata (k-091) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica.

3.3. Solventes

Os solventes (grau P.A., Synth) utilizados nas extrações, eluições cromatográficas e etapas de purificação foram destilados na Central de solventes do IQ-USP.

Nas análises via CLAE foram utilizados solventes grau cromatográfico. Os mesmos foram previamente deaerados a vácuo, com gás hélio e submetidos a banho de ultrassom.

3.4. Materiais cromatográficos

Foram utilizadas placas em folhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 mm de espessura (Merck) para as análises cromatográficas comparativas. A revelação das mesmas foi efetuada através de inspeção em luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm e uso de sulfato cérico aspergido e posterior aquecimento.

Nas análises cromatográficas de escala preparativa foram placas de 1,0 mm de espessura com sílica GF 254 (Merck).

Para cromatografia em coluna utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck.

3.5. Preparação do extrato bruto das raízes

As raízes de *P. crassinervium* foram coletadas, secas em estufa a 50°C, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com DCM:MeOH (2:1). Após o procedimento de extração, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório.

3.6 Fracionamento do extrato bruto das raízes de *P. crassinervium*

O extrato bruto de raízes de *P. crassinervium* (15,3g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica. O mesmo foi eluído com mistura de solventes Hex:AcOEt, em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 15 subfrações. (Figura 14). Após análise comparativa por cromatografia planar, as subfrações foram agrupadas em 6 novas frações nomeadas Rpc (Tabela 5). Todas as frações estudadas foram previamente submetidas à análise do espectro de RMN de ¹H.

Figura 14. Esquema de fracionamento cromatográfico do extrato bruto das raízes de *P. crassinervium*.

Tabela 5. Frações obtidas no fracionamento do extrato bruto das raízes.

Fração	Massa (g)
Rpc1	2,13
Rpc2	1,78
Rpc3	1,56
Rpc4	1,75
Rpc5	1,98
Rpc6	1,17

Fração Rpc3

A fração Rpc3 foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica (figura 15), utilizando-se como eluente uma mistura de Hex:AcOEt em gradiente de polaridade e obtendo-se 21 frações posteriormente reagrupadas em 6 frações nomeadas A1-A6 (tabela 6).

Figura 15. Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc3.

Tabela 6. Frações obtidas no fracionamento de Rpc3

Fração	Massa (mg)
A1	82,7
A2	50,4
A3	91,3
A4	690,2
A5	175,4
A6	128,7

A análise dos espectros de RMN de ^1H das frações A1-A6 mostrou a presença de hidroquinonas preniladas na fração A2. As substâncias 1 e 2 (12,6mg e 4,8mg) foram purificadas por CPP eluindo-se com mistura de Hex:AcOEt (7:3).

A fração A4 (figura 16) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica. O sistema eluente utilizado foi, inicialmente, uma mistura ternária de Hex:DCM:AcOEt (7:2:1) seguindo em gradiente de polaridade até AcOEt puro.

Deste procedimento foram obtidas 20 frações, agrupadas em 5 e nomeadas de A4r (tabela 7).

Figura 16. Esquema de fracionamento cromatográfico da fração A4.

Tabela 7. Frações obtidas no fracionamento de A4.

Fração	Massa (mg)
A4r1	88,7
A4r2	121,5
A4r3	117,1
A4r4	93,3
A4r5	100,7

A partir da fração A4r1 foi isolada a substância 1 (88,7mg), da fração A4r2 foram isoladas as substâncias 1 (41,7mg) e 6 (62,3mg) que foram posteriormente purificadas por CPP (Hex:DCM:AcOEt - 7:2:1) e a fração A4r3 forneceu a substância 6 (117,1mg).

Fração Rpc4

A fração Rpc4 foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna utilizando-se como eluente Hex:AcOEt em gradiente de polaridade. Deste fracionamento foram obtidas 28 frações, agrupadas em 8 após análise de CPC, nomeadas B1-8.

Figura 17. Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc4.

A fração B2 foi purificada através CPP (Hex:DCM:AcOEt - 7:2:1) e forneceu a substância 6. As frações B3 - B5 foram purificadas em coluna de sílica (Hex:AcOEt - 7:3) e forneceram substâncias 7 e 8.

Tabela 8. Frações obtidas no fracionamento de Rpc4.

Fração	Massa/mg
B1	124,9
B2	51,9
B3	201,5
B4	120,2
B5	108,5
B6	255,9
B7	193,4
B8	161,8

Fração Rpc5

A fração Rpc5 foi fracionada em coluna de sílica, eluindo-se com mistura inicial de Hex:DCM:AcOEt (5:2:3) aumentando-se a polaridade até AcOEt puro (figura 18). Deste fracionamento foram obtidas 19 frações, agrupadas em 7 subfrações (tabela 9). As frações C2-C3 e C6 foram purificadas por CPP nos sistemas Hex:DCM:AcOEt (5:2:3) e DCM:MeOH (8:2), respectivamente. Destes procedimentos foram isoladas as substâncias 4 (212,7mg) e 5.(8,4mg).

Figura 18. Esquema de fracionamento cromatográfico da fração Rpc5.

Tabela 9. Frações obtidas no fracionamento de Rpc5.

Fração	Massa (mg)
C1	224,8
C2	354,1
C3	141,6
C4	197,6
C5	132,7
C6	70,1
C7	237,9

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico das raízes de *P. crassinervium* resultou no isolamento e caracterização de metabólitos secundários pertencentes a diferentes classes químicas, compreendendo hidroquinonas preniladas, flavanonas, derivados de ácido benzóico, cromenos e amidas.

Para as purificações das substâncias foram empregadas técnicas cromatográficas, já para as determinações estruturais foram utilizadas técnicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de massas, além da comparação com os dados da literatura, uma vez que estas são substâncias conhecidas.

4.1 Caracterização dos metabólitos secundários isolados do extrato das raízes de *Piper crassinervium*.

Inicialmente comparou-se o perfil cromatográfico do extrato das raízes de *P. crassinervium*, obtido via CLAE, com perfil das folhas. A análise comparativa dos cromatogramas (figura 19) revelou a presença de substâncias nas raízes com tempos de retenção diferentes daquelas encontradas nas folhas desta espécie vegetal, tornando este um interessante tecido a ser estudado.

(1)

(2)

(3)

Figura 19. Cromatogramas do extrato bruto das raízes (1), folhas (2) e de ambos tecidos (3) de *P. crassinervium*.

Após as etapas de fracionamento e purificação do extrato bruto das raízes, foram identificadas uma flavanona [4'-metoxi-5,7-diidroxiflavona (1)], duas hidroquinonas preniladas [1,4-diidrox-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-*E*-6'-octadienil)-benzeno (2) e 1,4-diidrox-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-*Z*-6'-octadienil)-benzeno (3)], um cromeno [ácido-2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)2H-1-benzopirano-6-carboxílico (4)], um derivado do ácido benzóico [ácido 4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2'-*E*-6'-dienil)-benzóico (5)] e três amidas, sendo uma isobutílica (piperlonguminina (6), e duas piperidínicas [(piperina) (7) e (diidropiperina) (8)] (Figura 20).

Figura 20. Metabólitos secundários isolados das raízes de *P. crassinervium*

4.1.1. Identificação estrutural da flavanona 1

O espectro de RMN de ^1H da substância **1** (figura 23, tabela 10) apresentou dois duplos dubletos, um em δ 7,24 com $J = 2,0$ e $7,0$ Hz relativo aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-6' e outro em δ 6,79 com $J = 2,0$ e $7,0$ Hz relativo aos hidrogênios H-3' e H-5'. A magnitude das constantes de acoplamento entre os sinais revela a relação *orto* entre H-2'/H-6' e H-3'/H-5'. Esses conjuntos de sinais caracterizam o anel B de um flavonóide com a posição 4'substituída, essa substituição envolveria o grupo metoxílico devido ao singlete em δ 3,65.

Em δ 5,74 observou-se a presença de dois dubletos, com um acoplamento *meta* ($J = 2,2$ Hz) entre dois hidrogênios aromáticos pertencentes ao anel A, que foram atribuídos a H-6 e H-8. O valor de δ em frequência elevada para hidrogênios aromáticos é compatível com substituintes oxigenados em *orto* a esses hidrogênios.

A presença de três duplos dubletos em δ 5,20 com $J = 3,0$ e $13,0$ Hz, δ 2,93 com $J = 13,0$ e $17,1$ Hz e δ 2,54 com $J = 3,0$ e $17,1$ Hz indicam a estrutura de uma flavanona, sendo o primeiro duplo dubleto atribuído ao H-2 e os outros dois duplos dubletos aos hidrogênios H-3.

Para se confirmar o padrão de substituição da flavanona, esta substância foi submetida a análise por espectrometria de massas (figura 21), cujo espectro mostrou um pico relativo ao íon molecular em m/z 286 encontra-se de acordo com a fórmula molecular determinada como sendo $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$, uma fragmentação retro Diels-Alder indicada pelos íons em m/z 152 e m/z 134 (figura 22), o que permitiu identificar esta substância como sendo uma flavanona isosakuranetina.

Isosakuranetina

Figura 21. Espectro de massas da substância **1**.

Figura 22. Principais fragmentações da substância **1** no espectro de massas.

Os dados de RMN de ^{13}C (figura 24, tabela 10) obtidos para a isosakuranetina são coincidentes com os dados da literatura (Wagner *et al.*, 1976). A isosakuranetina foi anteriormente isolada de *Wyethia angustifolia* e *W. helenioides* (McCormik, 1986).

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (MeOD, 200 MHz) e ^{13}C (MeOD, 50 MHz) para a substância **1**

Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^{13}C
2	5,20 1H (<i>dd</i> , 13,0; 3,0)	80,1
3	2,54 1H (<i>dd</i> , 17,1; 3,0) 2,93 1H (<i>dd</i> , 17,1; 13,0)	43,9
4	-----	197,5
5	-----	165,3
6	5,74 1H (<i>d</i> , 2,2)	97,0
7	-----	168,2
8	5,74 1H (<i>d</i> , 2,2)	96,1
8a	-----	164,7
4a	-----	103,2
1'	-----	132,1
4'	-----	161,4
2'/6'	7,24 2H (<i>dd</i> , 2,0; 7,0)	128,8
3'/5'	6,79 2H (<i>dd</i> , 2,0; 7,0)	114,9
OMe-4'	3,65 (s)	55,7

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (200 MHz, MeOD).

Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (75 MHz, MeOD).

4.1.2. Identificação estrutural das hidroquinonas preniladas **2** e **3**.

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **2** (figura 26, tabela 11) e **3** (figura 27, tabela 11) apresentaram sinais de hidroxilas fenólicas quelatadas com grupo carbonílico na forma de um singlete em δ 12,3. Observou-se um dubleto em δ 6,89 com $J = 9,0$ Hz referente ao hidrogênio aromático H-3. O sinal hidrogênio H-4 apresenta-se na forma de um duplo dubleto em δ 7,02 com $J = 3,0$ e $9,0$ Hz, acoplando em *orto* com H-3 e em *meta* com H-6, que apresenta-se como um dubleto em δ 7,23 com $J = 3,0$ Hz.

Observou-se também nos sinais dos espectros de RMN de ^1H sinais de grupos prenilicos. O hidrogênio H-8 apresenta-se na forma de um singlete em δ 6,68 e os hidrogênios metilênicos H-10 e H-11 estão na forma de multipletos em δ 2,29-2,24 para a substância **2** e em δ 2,59-2,67 e em δ 2,21-2,26, respectivamente para a substância **3**. Nota-se que o H-10 encontra-se mais desprotegido na substância **3** do que na **2**, efeito este causado pela diferença de configuração da substância **2** em relação a **3**, visto estarem nas formas *E* e *Z* respectivamente.

O hidrogênio H-12 revela-se como um multiplete em δ 5,13, e os sinais dos grupos metílicos da cadeia lateral apresentam-se como singletos em δ 1,72 δ 1,63 e δ 2,16 referentes aos hidrogênios H-14, H-15 e H-16 para a substância **2** e em δ 1,65 δ 1,63 e δ 2,03 para os iguais hidrogênios da substância **3**. Nota-se o efeito de desproteção da carbonila sobre H-16 na substância **2**, que encontra-se na forma *E*.

Os dados obtidos pelos espectros de RMN de ^1H das substâncias **2** e **3** (figura 26 e 27) foram comparados com os dados da literatura (Danelutte *et al.*, 2003).

Figura 25. Estruturas das hidroquinonas preniladas **2** e **3**.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para as substâncias **2** e **3**.

	hidroquinona 2	hidroquinona 3
Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)
1	-----	-----
2	-----	-----
3	6,89 1H (<i>d</i> , 9,0)	6,89 1H (<i>d</i> , 9,0)
4	7,02 1H (<i>dd</i> , 9,0;3,0)	7,01 1H (<i>dd</i> , 9,0;3,0)
5	-----	-----
6	7,23 1H (<i>d</i> , 3,0)	7,24 1H (<i>d</i> , 3,0)
7	-----	-----
8	6,68 1H (<i>s</i>)	6,68 1H (<i>s</i>)
9	-----	-----
10	2,29-2,24 2H (<i>m</i>)	2,59-2,67 2H (<i>m</i>)
11	2,29-2,24 2H (<i>m</i>)	2,21-2,26 2H (<i>m</i>)
12	5,13 1H (<i>m</i>)	5,14 1H (<i>m</i>)
13	-----	-----
14	1,72 3H (<i>s</i>)	1,65 3H (<i>s</i>)
15	1,63 3H (<i>s</i>)	1,63 3H (<i>s</i>)
16	2,16 3H (<i>s</i>)	2,03 3H (<i>s</i>)
OH	12,3 (<i>s</i>)	12,3 (<i>s</i>)

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da substância **2 (E)** (300 MHz, CDCl_3).

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância **3 (Z)** (300 MHz, CDCl_3).

4.1.3. Identificação estrutural do cromeno 4

O espectro de RMN de ^1H da substância **4** (figura 29, tabela 12) apresenta sinais característicos de hidrogênios de sistema aromático, onde observa-se um duplo dubleto δ 7,87 com $J = 1,75$ e $8,7$ Hz atribuído para o hidrogênio H-7. O valor das constantes de acoplamento deste sinal indica um acoplamento *orto* entre os hidrogênios H-7 e H-8 do anel aromático, sendo que H-8 se apresenta na forma de um dubleto em δ 6,79 com $J = 8,7$ Hz. Observa-se também o acoplamento *meta* entre os hidrogênios H-7 e H-5 (*d*, δ 7,73 e $J = 1,75$ Hz).

O espectro também apresentou sinais na forma de dois dubletos em δ 5,61 e δ 6,40, ambos com $J = 10,0$ Hz atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, indicando se tratar de uma estrutura de cromenos.

Os dois grupos metílicos da cadeia lateral e o grupo metílico, diretamente ligado ao C2 do benzopirano, estão representados pelos singletos em δ 1,56, δ 1,43 e δ 1,65, respectivamente. Os hidrogênios metilênicos H-1' e H-2' revelam-se como multipletos em δ 1,79 e δ 2,10, respectivamente. Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (figura 30, tabela 12) e a comparação com os dados da literatura corroboram para a determinação da substância **4** como sendo o cromeno indicado na figura 28.

Figura 28. Estrutura do 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-2H-1-benzopirano-6-carboxílico (**4**).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para a substância **4**.

Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^{13}C
2	-----	80,08
3	5,61 1H (<i>d</i> , 10,0)	129,93
4	6,40 1H (<i>d</i> , 10,0)	122,18
4a	-----	120,52
5	7,73 1H (<i>d</i> , 1,75)	128,75
6	-----	121,30
7	7,87 1H (<i>dd</i> , 1,75; 8,7)	131,96
8	6,79 1H (<i>d</i> , 8,7)	116,03
8a	-----	158,37
1'	1,79 2H (<i>m</i>)	41,72
2'	2,10 2H (<i>m</i>)	22,66
3'	5,10 1H (<i>t</i> , 7,0)	123,73
4'	-----	131,90
5'	1,65 3H (<i>s</i>)	25,62
6'	1,56 3H (<i>s</i>)	17,59
1''	1,43 3H (<i>s</i>)	27,18
COOH	-----	171,62

O ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-2*H*-1-benzopirano-6-carboxílico (**4**), lhotzcromeno, foi previamente isolado e identificado na fração hexânica do extrato bruto das folhas de *Piper lhotzkyanum*, sendo esta a única ocorrência desta substância descrita na literatura (Moreira *et al.*, 1998). Recentemente, muitos cromenos e derivados de ácidos benzóicos vêm sendo isolados e identificados em espécies de Piperaceae. Esta é a primeira descrição desta substância em raízes de espécies de Piperaceae.

Figura 29. Espectro de RMN de ¹H da substância 4 (200 MHz, CDCl₃).

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (50 MHz, CDCl_3).

4.1.4. Identificação estrutural do derivado prenulado de ácido benzóico **5**

O derivado prenulado do ácido benzóico (**5**) um sólido de cor branca, foi caracterizado através da análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados foram bastante semelhantes com aqueles descritos na literatura (Moreira *et al.*, 1998).

Através da análise do espectro de RMN de ^1H de **5** (figura 31, tabela 13) foi possível observar o sinal característico fenol em δ 13,46 quelatado com o oxigênio da carbonila. Foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos fortemente desblindados em δ 8,59 com $J=2,0$ Hz (H-6), característico de acoplamento *meta*, e o sinal do H-4 em δ 8,18 como duplo dubleto $J=2,0$ e 8,7 Hz e o sinal do H-3 em δ 7,05 como dubleto com $J=8,7\text{Hz}$.

A cadeia lateral foi identificada através dos sinais com deslocamentos químicos característicos de duplas ligações e seus vizinhos. O sinal de H-8 em δ 6,86 apresenta-se como um singleto largo e H-12 como multiplete indicando um hidrogênio de ligação dupla vizinha a outros hidrogênios que foram caracterizados como grupos CH_2 em H-10 em δ 2,25 $J=7,0$ Hz e H-11 em δ 2,34 (*m*).

Os hidrogênios com deslocamento químicos característicos de metilas ligadas a duplas ligações foram observadas em δ 1,65 (H-14 e H-16) e δ 1,72 (H-15).

As atribuições foram confirmadas através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (figura 32). O sinal do carbono carbonílico (C-7) foi observado em $\delta 195,8$. O sinal do carbono relativo ao grupo ácido carboxílico foi visualizado em $\delta 170,9$ e o sinal do carbono ligado ao grupo hidroxila (C-2) foi visualizado em $\delta 167,8$. Os demais sinais dos carbonos que confirmam a estrutura estão listados na tabela 13

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para a substância **5**.

Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^{13}C
1	-----	119,7
2	-----	167,8
3	7,05 1H (<i>d</i> , 8,7)	118,9
4	8,18 1H (<i>dd</i> , 2,0 e 8,7)	137,1
5	-----	120,2
6	8,59 1H (<i>d</i> , 2,0)	133,1
7	-----	195,8
8	6,86 1H (<i>s</i>)	118,8
9	-----	163,8
10	2,25 2H (<i>d</i> , 7,0)	41,9
11	2,34 2H (<i>m</i>)	26,2
12	5,15 1H (<i>m</i>)	122,7
13	-----	131,9
14	1,65 3H (<i>s</i>)	25,7
15	1,72 3H (<i>s</i>)	17,8
16	1,65 3H (<i>s</i>)	20,4
OH	13,46 (<i>s</i>)	-----
COOH	-----	170,9

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da substância **5** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (75 MHz, CDCl_3).

Figura 33. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (75 MHz, CDCl_3)

4.1.5. Identificação estrutural da amida isobutílica 6

O espectro de RMN de ^1H da substância **6** (figura 35, tabela 14) apresentou sinais de hidrogênio característicos do grupo $-\text{NH}$ de amida em δ 5,67 e grupos de sinais de hidrogênios olefínicos (δ 5,93; 7,35; 6,66; 6,76) com $J = 14,8$ e $15,3$ Hz, indicando uma configuração *trans-trans* para as ligações duplas desta substância. Observaram-se sinais de hidrogênios aromáticos na forma de duplete em δ 6,76 com $J = 8,0$ Hz atribuído ao hidrogênio H-7'', indicando um acoplamento em *orto* com H-6'' em δ 6,88, um duplo duplete com $J = 1,6$ e $8,0$ Hz características de acoplamentos *orto* e *meta*, respectivamente. O acoplamento *meta* observado em H-6'' ocorre com H-4'', que se apresenta como um duplete em δ 6,96 com $J = 1,6$ Hz.

O sinal do grupo metilenodioxi fenílico revela-se como um singlete em δ 5,97. A isobutila foi identificada através da presença de dois dubletos intensos (6H) em δ 0,93 bem como pelos sinais correspondentes ao H-3 (δ 1,82, *m*) e H-2 (δ 3,18, *t*).

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C (figura 38, tabela 14) e a comparação com os dados da literatura (Costa & Mors, 1981), confirmaram a estrutura proposta para a substância **6** (figura 33).

Figura 34. Estrutura da piperlonguminina (**6**).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para a substância **6**.

Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^{13}C
2	3,18 2H (<i>t</i> , 6,3)	46,9
3	1,82 1H (<i>m</i>)	28,6
4	0,93 3H (<i>d</i> , 6,6)	20,1
5	0,93 3H (<i>d</i> , 6,6)	20,1
1'	-----	----
2'	5,93 1H (<i>d</i> , 14,8)	122,6
3'	7,35 1H (<i>m</i>)	141,0
4'	6,66 1H (<i>dd</i> , 10,3; 15,3)	124,6
5'	6,76 1H (<i>d</i> , 15,3)	138,8
2''	5,97 2H (<i>s</i>)	101,2
3a''	-----	148,2
4''	6,96 1H (<i>d</i> , 1,6)	105,7
5''	-----	130,8
6''	6,88 1H (<i>dd</i> , 1,6; 8,0)	123,2
7''	6,76 1H (<i>d</i> , 8,0)	108,4
7a''	-----	148,2

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da substância **6** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 36. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **6** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 37. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **6** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 7 (50 MHz, CDCl_3).

4.1.6 Identificação estrutural das amidas piperidínicas 7 e 8

No espectro de RMN de ^1H da substância **7** (figura 43) observam-se sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,91 na forma de um duplo dubleto, com $J = 1,3$ e 7,9 Hz referente ao hidrogênio H-6'', que apresenta um acoplamento em *orto* com o hidrogênio H-7'' (*d*, δ 6,79 com $J = 7,9$ Hz). O hidrogênio H-6'' também apresenta acoplamento *meta* com o hidrogênio H-4'' que, por sua vez, revela-se como um dubleto em δ 6,98 com $J = 1,3$ Hz. O sinal dos hidrogênios do grupo metilenodioxifenílico estão representados por um singlete em δ 5,97.

Os hidrogênios do anel piperidínico H-3, H-4 e H-5 estão representados pelo multipeto em δ 1,58-1,63 e os hidrogênios H-2 e H-6 são identificados pelo singlete largo em δ 3,57.

O hidrogênio olefínico H-2' consiste em um dubleto em δ 6,47 com $J = 14,5$ Hz, indicando uma configuração *trans* para a ligação dupla entre os hidrogênios H-2' e H-3'. Esse, por sua vez apresenta-se como um multipeto em δ 7,41. Os demais hidrogênios olefínicos H-4' e H-5' consistem de multipetos em δ 6,74 e também possuem configuração *trans* para a ligação dupla.

A substância **8** possui estrutura muito semelhante à estrutura da substância **7**, diferindo apenas pela ausência de uma ligação dupla entre os carbonos C-4' e C-5' (figura 43) (Araújo-Junior *et al.*, 1997), que foi corroborada pela análise do espectro de massas (figura 39 e 40). O esquema de fragmentação proposto para

a substância **7** está representado na figura 41, já a substância **8** por não possuir a dupla ligação vizinha ao anel aromático favorece a formação do rearranjo levando ao íon tropilium m/z 135 (figura 42), que é também o pico base.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para as substâncias **7** e **8**

	Piperina	diidropiperina
Posição	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)	^1H (multiplicidade, δ e J em Hz)
2	3,57 2H <i>br(s)</i>	3,57 2H <i>br(s)</i>
3	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)
4	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)
5	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)	1,58-1,63 2H (<i>m</i>)
6	3,57 2H <i>br(s)</i>	3,57 2H <i>br(s)</i>
1'	-----	-----
2'	6,47 1H (<i>d</i> , 14,5)	6,24 1H (<i>dt</i> , 1,3, 14,9)
3'	7,41 1H (<i>m</i>)	
4'	6,74 1H (<i>m</i>)	2,44 1H (<i>m</i>)
5'	6,74 1H (<i>m</i>)	2,68 1H (<i>m</i>)
6'	-----	-----
7'	-----	-----
2''	5,97 2H (<i>s</i>)	5,91 2H (<i>s</i>)
4''	6,98 1H (<i>d</i> , 1,3)	6,66 1H (<i>d</i> , 1,3)
5''	-----	-----
6''	6,91 1H (<i>dd</i> , 1,3;7,9)	6,63 1H (<i>dd</i> , 1,3, 7,9)
7''	6,79 1H (<i>d</i> , 7,9)	6,72 1H (<i>d</i> , 7,9)

Figura 39. Espectro de massas da substância 7.

Figura 40. Espectro de massas da substância 8.

Figura 41. Interpretação dos dados de EM da substância 7. (Bajad *et al.*, 2003)

Figura 42. Interpretação dos dados de EM da substância 8.

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H das substâncias **7** e **8** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 44. Ampliação do espectro de RMN de ^1H das substâncias **7** e **8** (200 MHz, CDCl_3).

Figura 45. Ampliação do espectro de RMN de ^1H das substâncias **7** e **8** (200 MHz, CDCl_3)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho descreve o estudo químico das raízes de *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae) que foi inicialmente submetido à análise cromatográfica que indicou diferenças substanciais com relação aos constituintes das folhas (figura 19). Assim, o fracionamento cromatográfico do extrato bruto das raízes resultou no isolamento de oito substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, compreendendo uma flavanona, duas hidroquinonas preniladas, um cromeno, um derivado prenilado do ácido benzóico, uma amida isobutílica e duas amidas piperidínicas.

Apesar de todas as substâncias serem conhecidas e já terem sido isoladas de espécies de *Piper*, o cromeno e as amidas não haviam sido descritas em *P. crassinervium* Kunth. Das flavanonas identificadas nas folhas (sakuranetina e isosakuranetina), apenas a isosakuranetina foi encontrada nas raízes. A ocorrência desses flavonóides em raízes é relativamente comum, sendo que em diversos casos participam do estabelecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio e também atuam como antifúngicos (Steele *et al.*, 1999). Sabe-se que a sakuranetina possui atividade fitoalexínica em culturas de folhas de arroz e tem seu nível aumentado após tratamento dessas folhas com luz UV (Kodama *et al.*, 1992). As raízes de *P. crassinervium* acumulam ainda amidas e cromenos, classes de compostos que não haviam sido encontradas nas folhas e frutos desta espécie vegetal e que também tiveram a atividade antifúngica anteriormente descrita (Lago *et al.*, 2004). Tais atividades observadas para amidas e cromenos e sua ocorrência de forma específica em raízes podem ser indicativos de seu potencial, considerando a elevada concentração de microorganismos na rizosfera

quando comparado com as partes aéreas. Por outro lado, amidas e cromenos também foram isolados de folhas, frutos e caules de outras espécies de *Piper* e, portanto, essas inferências seriam motivo de investigação.

Assim, os estudos fitoquímicos descritivos constituem-se em um ponto de partida para outros nos quais onde se objetivaria conhecer as possíveis funções biológicas, a regulação da biossíntese e o significado evolutivo dos principais metabólitos secundários de *P. crassinervium*.

6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albiero, A. L. M., Paoli, A. A. S., Souza, L. A., Mourão, K. S. M. (2005) Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). *Acta Bot. Bras.*, **19**(2), 305-312.
- Araujo Junior, J. X., Da Cunha, E. V., Chaves, M. C. O., Gray, A. J. (1997) Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **44**(3), 559-561.
- Bajad, S., Coumar, M., Khajuria, R., Suri, O. P., Bedi, K. L. (2003) Characterization of a new rat urinary metabolite of piperine by LC/NMR/MS studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **19**, 413-421.
- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Furlan, M. (1999) A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **51**, 899-902.
- Bastos, C. N., Albuquerque, P. S. B. (2004) Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*, **29**, 555-557.
- Campos, M. P., Filho, V. C., Da Silva, R. Z., Yunes, R. A., Zacchino, S., Juarez, S., Cruz, R. C. B., Cruz, A. B. (2005) Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(8), 1527-1530.
- Casapullo, A., Minale, L., Zollo, F. (1993) Paniceins and related sesquiterpenoids from the mediterranean sponge *Reniera fulva*. *Journal of Natural Products*, **56**(4), 527-533.
- Cimino, G., De Stefano, S., Minale, L. (1973) Paniceins, unusual aromatic sesquiterpenoids linked to a quinol or quinone system from the marine sponge *Halichondria panicea*. *Tetrahedron*, **29**, 2565-2570.
- Costa, S. S., e Mors, W. B. (1981) Amides of *Ottonia corcovadensis*. *Phytochemistry*, **20** (6), 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 cernnum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Medica*, **67**, 771-773.
- Cotelle, N., Moreau, S., Cotelle, P., Catteau, J. P., Bernier, J. L., Hénichart, J. P. (1991) Generation of free radicals by simple prenylated hydroquinone derivatives, natural antitumor agents from the marine urochordate *Aplidium californicum*. *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 300-305.

- Cronquist, A. (1981) *An integral system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, New York.
- Cushnie, T. P. T., Vivienne, E. S., Lamb, A. J. (2003) Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.*, **158**, 281–289.
- Cysne, J. B., Canuto, K. M., Pessoa, O. D. L., Nunes, E. P., Silveira, E. R. (2005) Leaf essential oils of four *Piper* species from the state of Ceara - northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**(6B), 1378-1381.
- Da Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. O. (2001) Two anides from *Piper tuberculatum* fruits. *Fitoterapia*, **72**, 197-199.
- 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**(2), 555-559.
- Danelutte, A. P., Costantin, M. B., Delgado, G. E., Braz-Filho, R., Kato, M.J. (2005) Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16**(6B), 1425-1430.
- De Rosa, S., De Giulio, A., Iodice, C. (1994) Biological effects os prenylated hydroquinones:Structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp and fish lethality assays. *Journal of Natural Products*, **57**(12), 1711-1716.
- Diaz, P. P., Arias, T., Joseph-Nathan, P. (1987) A chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and a C-methyl flavanone from the bark *Piper hostmannianum*. *Phytochemistry*, **26**, 809-811.
- Facundo, V. A., Silveira A. S. P., Morais S. M. (2006) Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 753–756.
- Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Payá, M., Alcaraz, M. J., De Rosa, S. (1994) Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin. *European Journal of Pharmacology*, **253**, 75-82.
- Figueiredo, R. A., Sazima, M. (2000) Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany*, **85**, 455-460.
- Garrido, L., Zubía, E., Ortega, M. J., Salvá, J. (2002) New meroterpenoids from the Ascidian *Aplidium conicum*. *Journal of Natural Products*, **65**, 1328-1331.
- Gupta, O. P., Atal, C. K. (1972) Constituents of *Piper nepalense*. *Phytochemistry*, **11**, 2646.

- Haïdara, K., Zamir, L., Shi, Q. W., Batist, G. (2006) The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. *Cancer Letters*, **342**, 180-190.
- Hostettmann, K., Queiroz, E. F., Vieira, P. C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*, Edufscar; 2003, 152p.
- Howard, B. M., Clarkson, K. (1979) Simple prenylated hydroquinone derivatives from the marine urochordate *Aplidium californicum*. Natural anticancer and antimutagenic agents. *Tetrahedron Letters*, **46**, 4449-4452.
- Isao, K. (1984) Molluscicidal and insecticidal activities of isobutylamides isolated from *Fagara macrophylla*. *Experientia*, **40**, 340-341.
- Jensen, S., Hansen, J., Boll, P.M. (1993) Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry*, **33**(3), 523-530.
- Joly, A. B. *Introdução à taxonomia vegetal*, Ed. Nacional, 1985, São Paulo.
- Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T., Kiyosawa, S. (1992) Sakuranetin, a flavone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, **31**, 3807-3809.
- Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. A., Bergamo, D. C. B., Cavaleiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M., Guimarães, E. F., Young, M. C. M., Kato, M. J. (2004) Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*, **67**(11), 1783-1788.
- López, A. Ming, D. S., Towers, G. H. N., 2002, Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*, *Journal of Natural Products*, **65**, 62-64.
- Loiset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P., Hostettman, K. (2000) Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. *Journal of Natural Products*, **63**, 424-426.
- Luize, P. S., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, P. B., 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*. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(10), 2126-2130.
- Mabberley, D. J. *The Plant-book. A Portable dictionary of the higher plants*. Cambridge Univ. Press. New York, 1997.
- Maia, J. G. S., Da Silva, M. L., Luz, A. I. R., Zoghbi, M. das G. B., Ramos, L. Scott. (1987) Species of *Piper* of the Amazon region rich in safrole. *Quimica Nova* **10**(3), 200-204
- Maia, J. G., Green, C. L., Milchard, M. J. (1993) New source of natural safrole. *Perfumer & Flavorist*, **18**, 19-20.

- 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.
- McCormick, S., Robson, K., Bohm, B. (1986) Flavonoids of *Wyethia angustifolia* and *W. helenioides*. *Phytochemistry* **25**(7), 1723-1726.
- McFerren, M. A., Cordova, D., Rodriguez, E., Rauh, J. J. (2002) In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **83**, 201-207.
- McFerren, M. A. e Rodriguez, E. (1998) Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **60** 183–187.
- Miranda, J. E., Navickiene, H. M. D., Nogueira-Couto, R. H., De Bortoli, S. A., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Furlan, M. (2003) Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie*, **34**, 409-415.
- Moreira, A. C., Müller, A. C. A., Pereira-Junior, N., Antunes A. M. S. (2006) Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. *World Patent Information*, **28**, 34-42.
- Moreira, D. de L., Guimarães, E. F., Kaplan, M.A. C. (1998) A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **48** (6), 1075-1077.
- Moreira, D.L., Guimarães, E.F. Kaplan, M.A.C. (1998) Non-polar constituents from leaves of *Piper lhotzkyanum*, *Phytochemistry* **49** (5) 1339-1342.
- Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Young, M. C. M., Cavaleiro, A. J., Furlan, M. (2000) Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **55**, 621-626.
- Navickiene, H. M. D., Bolzani, V. da S., Kato, M. J., Pereira, A. M. S., Bertoni, B. W., França, S. C., Furlan, M. (2003) Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, **14**, 281-284.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T., Sticher, O. (1993) Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **34**(3), 813-818.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. M., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., Boll, P. M. (1997) Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry*, **46**, 597-673.

- Permana, D., Lajis, N. Hj., Shaari, K., Ali, A. M., Mackeen, M. M., Kitajima, M., Takayama, H., Aimi, N. (2003) A new prenylated hidroquinon from the roots of *Garcinia atroviridis* Griff ex T. Anders (Guttiferae). *Z. Naturforsch.*, **58b**, 332-335.
- Proksch, P. and Rodriguez, E. (1983), Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochemistry*, **22** (11) 2335-2348.
- Rüegg, T., Calderón, A. I., Queiroz, E. F., Solis, P. N., Marston, A., Rivas, F., Ortega-Barría, E., Hostettmann, K., Gupta, M. P. (2006) 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, 461-467.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, **91**, 621-632.
- Schmitz, F. J., Lakshmi, V., Powell, D. R., Helm, D. van der (1984) Arenarol and arenarone: Sesquiterpenoids with rearranged drimane skeletons from the marine sponge *Dysidea arenaria*. *J. Org. Chem.*, **49**, 241-244.
- Sengupta, S. e Rao, A. B. (1987) The chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia*, LVIII, 147.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7749-7759.
- Silva, E. M. J., Machado, S. R. (1999) Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**(2), 117-124.
- Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Méda, C. I., Young, M. C. M., Furlan, M. (2002) Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **59**, 521-527.
- Singh, S. K., Prasad, A. K., Olsen, C. E., Jha, S. C., Parmar, V. S., Wengel, J. (1996) Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry*, **43**, 1355-1360.
- Steele, H. L., Werner, D., Cooper, J. E. (1999) Flavonoids in seed and root exudates of *Lotus pedunculatus* and their biotransformation by *Mesorhizobium loti*. *Physiologia Plantarum*, **107**, 251-258.
- Terreaux, C., Gupta, M. P., Hostettmann, K. (1998) Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*, **49**(2), 461-464.

- Tulp, M., Bohlin, L. (2005) Rediscovery of known natural compounds: Nuisance or goldmine? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**, 5274-5282.
- Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y., Taylor, W. C. (2006) Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Biol. Pharm. Bull.*, **54**(2), 149-151.
- Variyar, P. S., Pendharkar, M. B., Banerjee, A., Bandyopadhyay, C. (1988) Blackening in green pepper berries. *Phytochemistry* **27**, 715-717.
- Wagner, H., Chari, V.M. (1976) ¹³C-NMR-Spektren Natürlich vollkommender flavonoide. *Tetrahedron Letters*, **21**, 1799-1802.
- Yamaguchi, L. F., Lago, Joao Henrique G., Tanizaki, Tatiane M., Di Mascio, Paolo, Kato, M. J. (2006) Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, **67**(16), 1838-1843.
- Yuncker, T. G. (1972) The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, **2**, 19.
- Yuncker, T. G., 1950, Flora of Panamá, Part IV. Fascicle 1. Piperaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **37**, 1-120.

7. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Renata Fogaça da Silva

Local de nascimento: Santo André-SP

Data de nascimento: 17/07/1981

FORMAÇÃO

1996 – 1998 Colégio Objetivo, Itatiba-SP

1999 – 2002 Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” UNESP

Araraquara-SP (Bacharel em Química)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CAPES, 08/2004 – 07/2006.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

Silva, R. F., Ramos, C. S. e Kato, M. J. Especificidade de Thysanoptera em espécimes alopátricas de *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae). 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG, maio 2005.

Silva, R. F. e Kato, M. J. Análise da variabilidade de hidroquinona prenilada em tecidos “*in vivo*” e “*in vitro*” de *Piper crassinervium* (Piperaceae). 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, maio 2006.