UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LUCAS BERGAMO NAVARRO

**Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas
tetraidrofurânicas e aristolactamas em *Piper
solmsianum* C.DC.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/02/2009

LUCAS BERGAMO NAVARRO

**Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas
tetraidrofurânicas e aristolactamas em *Piper
solmsianum* C.DC.**

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

2009

(Ficha catalográfica - Biblioteca)

Lucas Bergamo Navarro

Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas em *Piper solmsianum* C.DC.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação para a Tati, companheira importantíssima dessa minha jornada, peça fundamental para a valorização e conscientização vital da necessidade de engajamento profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela grande amizade, companheirismo e orientação durante esses anos de convívio no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Eny Iochet Segal Floh, pela oportunidade e disponibilidade do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aos colegas do LQPN: Antonio, Daniel, Joaquim, Hiléia, João, Roberto, Diego, Mariko, Karina, Clécio, Adalberto, Renata, Alberto, Juliana, João Homero, Giovana, Edgard, Renata e Nídia.

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

À Vânia, ao Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani e ao Laboratório de Biomateriais, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo uso e manejo do fluorímetro.

À Profa. Dra. Silvia Maria Leite Agostinho, pela supervisão de meus estágios no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), realizado junto a alunos de graduação, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários da Central Analítica: Márcio, Fernando, Alessandra, Cristiane e Miriam pelo aprendizado e auxílio prestado.

Aos funcionários, professores e colegas do IQ, pela agradável convivência, formação, experiência e aprendizado.

Aos amigos sempre presentes, em especial Geraldo, Karen, Wolfgang, Beatriz, Edgar, Marcela, Bruno e Ricardo.

Aos familiares, que, sem dúvida, tiveram um papel fundamental para o apoio e suporte para a realização de toda a minha trajetória Odilon, Zilah, Thiago, Matheus, Júlia, Mario, Maria Augusta e Jim.

Aos outros grandes professores que a vida me deu...

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

O maior poder de invenção e construção existe primeiro na natureza.

Murilo Mendes

RESUMO

NAVARRO, L.B. **Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas em *Piper solmsianum* C. DC.** 2009. 104p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química (Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Foi realizada uma investigação fitoquímica envolvendo diversos órgãos de plantas adultas (raízes, caules, folhas, inflorescências e sementes), plântulas (cultivadas *in vivo* e *in vitro*) e suspensões celulares de *P. solmsianum*. Dos órgãos estudados de plantas adultas, as raízes apresentaram a maior complexidade e diversidade química da planta, abrangendo ácidos benzóicos e benzaldeídos substituídos, esteróides, fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas, enquanto que os outros órgãos acumulam principalmente fenilpropanóides e lignanas tetraidrofurânicas. As raízes de plântulas apresentaram semelhança qualitativa de metabólitos secundários quando comparadas às raízes de plantas adultas. No entanto, as partes aéreas apresentaram diferentes compostos como farnesol, fitol e α -tocoferol. Os extratos de plântulas separadas por tamanho foram comparados em relação à diversidade dos metabólitos encontrados, não sendo observada uma variação qualitativa muito significativa. Os extratos obtidos das células de suspensões celulares de *P. solmsianum* indicaram prevalência de ácidos graxos e esteróides, enquanto que o extrato obtido do meio de cultura apresentou como componente majoritário o ácido salicílico.

Palavras-chave: *Piper solmsianum*, fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas.

ABSTRACT

NAVARRO, L.B. **Variability of phenylpropanoids, tetrahydrofuran lignans and aristolactams of *Piper solmsianum* C. DC.** 2009. 104p. Master Thesis. Graduate Program in Chemistry (Organic Chemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The phytochemical investigation was carried out to describe the composition in organs of adult plants (roots, stems, leaves, inflorescences and seeds), plantlets (*in vivo* and *in vitro*) and cell suspensions of *Piper solmsianum*. The roots of adult plants presented highest chemical diversity including benzoic acids, benzaldehydes, sterols, phenylpropanoids, tetrahydrofuran lignans and aristolactams, whereas aerial organs accumulate mainly phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans. The roots from plantlets presented qualitative similarity of secondary metabolites when compared to the roots of adult plants. However, the aerial parts from plantlets presented different composition including farnesol, phytol and α -tocopherol in addition to phenylpropanoids, but the plantlets at different developmental stages showed no significant qualitative variation. The extracts of cell suspensions of *P. solmsianum* indicated a suppressed phenylpropanoid metabolism with fatty acids and sterols in the cells and salicylic acid as major excreted compound in the culture medium.

Keywords: *Piper solmsianum*, phenylpropanoids, tetrahydrofuran lignans and aristolactams.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Exemplos da diversidade química do metabolismo secundário de plantas.	4
Figura 1.2. Exemplos de produtos naturais encontrados em <i>Piper</i> .	7
Figura 1.3. Biossíntese do ácido cinâmico.	8
Figura 1.4. Biossíntese da tiramina.	15
Figura 1.5. <i>Piper solmsianum</i> .	18
Figura 1.6. Exemplares de <i>Piper solmsianum</i> em seu estado nativo.	19
Figura 3.1. Plântulas de <i>Piper solmsianum</i> com aproximadamente quatro meses de idade.	26
Figura 3.2. Plântulas de <i>Piper solmsianum</i> divididas em três grupos de acordo com os tamanhos dos caules.	26
Figura 3.3. Grupos de órgãos de plântulas de <i>Piper solmsianum</i> separados pelo tamanho.	27
Figura 3.4. Sementes de <i>Piper solmsianum</i> em início de germinação <i>in vitro</i> .	29
Figura 3.5. Plântulas <i>in vitro</i> de <i>Piper solmsianum</i> após repicagem.	30
Figura 3.6. Suspensões celulares de <i>Piper solmsianum</i> .	31
Figura 3.7. Fluxograma do fracionamento de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	32
Figura 3.8. Curva de gradiente de concentração do solvente orgânico na fase móvel utilizada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.	37
Figura 3.9. Curva de aquecimento utilizada nas análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.	38

	Página
Figura 4.1. Miristicina.	40
Figura 4.2. Espectro de massas da miristicina.	41
Figura 4.3. Apiol e dilapiol.	42
Figura 4.4. Espectro de massas do apiol.	42
Figura 4.5. Espectro de massas do dilapiol.	42
Figura 4.6. Ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico.	43
Figura 4.7. Espectro de massas do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico.	43
Figura 4.8. 3,4,5-Trimetóxi-benzaldeído.	44
Figura 4.9. Espectro de massas do 3,4,5-trimetóxi-benzaldeído	44
Figura 4.10. Elemicina e isoelemicina.	45
Figura 4.11. Espectro de massas da elemicina.	46
Figura 4.12. Espectro de massas da isoelemicina.	46
Figura 4.13. Cristais de (-)-grandisina obtidos por filtração de extrato bruto das inflorescências de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	47
Figura 4.14. (-)-Grandisina.	48
Figura 4.15. Espectro de massas da lignana 1 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	48
Figura 4.16. Espectro de RMN de ¹ H da lignana 1 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	49
Figura 4.17. Espectro de RMN de ¹³ C da lignana 1 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	50
Figura 4.18. (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-Metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana.	51
Figura 4.19. Espectro de massas da lignana 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	51

	Página
Figura 4.20. Espectro de RMN de ^1H da lignana 2 em mistura isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	53
Figura 4.21. (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-Metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana.	54
Figura 4.22. Espectro de massas da lignana 3 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	54
Figura 4.23. Espectro de RMN de ^1H lignana 3 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	56
Figura 4.24. (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3,4,3',4'-Dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana.	57
Figura 4.25. Espectro de RMN de ^1H da lignana 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	58
Figura 4.26. Detalhe do cromatograma da (-)-grandisina pura com a mistura de lignana 5 com (-)-grandisina isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	59
Figura 4.27. (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)-3,4,5,3',4',5'-Hexametóxi-7,7'-epoxilignana.	60
Figura 4.28. Espectro de massas da lignana 5 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	60
Figura 4.29. Espectro de RMN de ^1H da lignana 5 em mistura com (-)-grandisina isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	62
Figura 4.30. Espectro de RMN de ^{13}C da lignana 5 em mistura com (-)-grandisina isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	62
Figura 4.31. Fluorescência da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> sob irradiação de luz UV.	63
Figura 4.32. Curvas de fluorescência da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	64

	Página
Figura 4.33. Cefaranona B.	65
Figura 4.34. Espectro de massas da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	65
Figura 4.35. Espectro de RMN de ^1H da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	67
Figura 4.36. Detalhe do espectro de RMN de ^1H da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	67
Figura 4.37. Detalhe do espectro de RMN de ^1H da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	68
Figura 4.38. Espectro de RMN de ^{13}C da aristolactama 2 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	68
Figura 4.39. Fluorescência da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> sob irradiação de luz UV.	69
Figura 4.40. Curvas de fluorescência da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	70
Figura 4.41. Piperolactama C.	70
Figura 4.42. Espectro de massas de alta resolução da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	71
Figura 4.43. Espectro de massas da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	71
Figura 4.44. Espectro de RMN de ^1H da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	73
Figura 4.45. Detalhe do espectro de RMN de ^1H da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	73

	Página
Figura 4.46. Detalhe do espectro de RMN de ^1H da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	74
Figura 4.47. Espectro de RMN de ^{13}C da aristolactama 4 isolada das raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	74
Figura 4.48. Campesterol.	75
Figura 4.49. Espectro de massas do campesterol.	75
Figura 4.50. Sitosterol.	76
Figura 4.51. Espectro de massas do sitosterol.	76
Figura 4.52. Tremulona.	77
Figura 4.53. Espectro de massas da tremulona.	77
Figura 4.54. 5- α -3,6-Estigmastadiona.	78
Figura 4.55. Espectro de massas da 5- α -3,6-estigmastadiona.	78
Figura 4.56. Cromatograma do extrato bruto de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	79
Figura 4.57. Cromatograma do extrato bruto de caules de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	79
Figura 4.58. Cromatograma do extrato bruto de folhas de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	81
Figura 4.59. Cromatograma do extrato bruto de inflorescências de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	82
Figura 4.60. Cromatograma do extrato bruto de sementes de <i>Piper solmsianum</i> .	83
Figura 4.61. Cromatograma dos extratos dos diversos órgãos de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	84
Figura 4.62. Cromatograma dos extratos dos diversos órgãos de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	85

	Página
Figura 4.63. α -Tocoferol.	87
Figura 4.64. Espectro de massas do α -tocoferol.	88
Figura 4.65. Cromatograma dos extratos dos órgãos de plântulas <i>in vivo</i> de <i>Piper solmsianum</i> .	89
Figura 4.66. Cromatograma dos extratos dos órgãos de plântulas <i>in vivo</i> de <i>Piper solmsianum</i> .	89
Figura 4.67. Cromatograma dos extratos de raízes de plântulas <i>in vivo</i> de <i>Piper solmsianum</i> separadas por tamanho.	90
Figura 4.68. Cromatograma dos extratos de caules de plântulas <i>in vivo</i> de <i>Piper solmsianum</i> separada por tamanho.	91
Figura 4.69. Cromatograma dos extratos de folhas de plântulas <i>in vivo</i> de <i>Piper solmsianum</i> separada por tamanho.	91
Figura 4.70. Cromatograma do extrato de raízes de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Piper solmsianum</i> .	92
Figura 4.71. Cromatograma do extrato de suspensões celulares de <i>Piper solmsianum</i> .	93
Figura 4.72. Ácido salicílico.	94
Figura 4.73. Espectro de RMN de ^1H do ácido salicílico.	95
Figura 4.74. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido salicílico.	95

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1 - Classificação de Piperaceae.	6
Tabela 1.2 - Lignanas tetraidrofurânicas identificadas em <i>Piper</i> .	11
Tabela 1.3 - Aristolactamas identificadas em <i>Piper</i> .	16
Tabela 3.1 - Nutrientes encontrados na solução do meio de cultura MS-62 utilizado para o cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Piper solmsianum</i> .	28
Tabela 3.2 - Massas das frações obtidas resultantes da coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	34
Tabela 3.3 - Massas das frações obtidas resultantes da coluna de gel de sílica do extrato metanólico particionado de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> .	35
Tabela 4.1 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da lignana 1 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	49
Tabela 4.2 - Dados do espectro de RMN de ^1H da lignana 2 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	52
Tabela 4.3 - Dados do espectro de RMN de ^1H da lignana 3 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	55
Tabela 4.4 - Dados do espectro de RMN de ^1H da lignana 4 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	57
Tabela 4.5 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da lignana 5 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	61
Tabela 4.6 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da aristolactama 2 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	66
Tabela 4.7 - Dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da aristolactama 4 isolada de raízes de plantas adultas de <i>Piper solmsianum</i> comparados à literatura.	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenóxi-acético
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BAP	6-Benzilaminopurina
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dubleto
Da	Dalton
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DCM	Diclorometano
Et	Radical etila
EtOH	Etanol
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
<i>m</i>	Multiplete
[M ⁺]	Íon molecular
Me	Radical metila
MeOH	Metanol
MS-62	Meio de cultura proposto por Murashige e Skoog em 1962
NIST	National Institute of Advanced Science and Technology
PAL	Enzima fenilalanina amônia liase
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
δ	Deslocamento químico
TYDC	Enzima tirosina descarboxilase
UV	Ultravioleta
WWS	Wiley Subscription Services

Sumário

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Introdução geral	1
1.2. Metabolismo secundário de Piperaceae	5
1.2.1. Fenilpropanóides e lignanas tetraidrofurânicas de <i>Piper</i>	8
1.2.2. Aristolactamas de <i>Piper</i>	14
1.3. <i>Piper solmsianum</i>	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Generalidades metodológicas	23
3.2. Material vegetal	24
3.2.1. Plantas adultas <i>in vivo</i>	24
3.2.2. Plântulas <i>in vivo</i>	25
3.2.3. Plântulas <i>in vitro</i>	27
3.2.4. Suspensões celulares	30
3.3. Obtenção dos extratos	31
3.4. Fracionamento cromatográfico	33
3.5. Purificações	36
3.6. Análises	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Plantas adultas	39
4.1.1. Metabólitos secundários de raízes	39

	Páginas
4.1.1.1. Miristicina	40
4.1.1.2. Apiol e dilapiol	41
4.1.1.3. Ácido-3,4,5-trimetóxi-benzóico	43
4.1.1.4. 3,4,5-Trimetóxi-benzaldeído	44
4.1.1.5. Elemicina e isoelemicina	45
4.1.1.6. Lignana 1	47
4.1.1.7. Lignana 2	49
4.1.1.8. Lignana 3	53
4.1.1.9. Lignana 4	56
4.1.1.10. Lignana 5	58
4.1.1.11. Aristolactama 2	63
4.1.1.12. Aristolactama 4	69
4.1.1.13. Campesterol	75
4.1.1.14. Sitosterol	76
4.1.1.15. Tremulona	77
4.1.1.16. 5 α -3,6-Estigmastadiona	78
4.1.1.17. Perfil cromatográfico dos metabólitos identificados	79
4.1.2. Metabólitos secundários de caules	80
4.1.3. Metabólitos secundários de folhas	81
4.1.4. Metabólitos secundários de inflorescências	82
4.1.5. Metabólitos secundários de sementes	83
4.1.6. Estudo comparativo dos órgãos	84
4.2. Plântulas	86

	Páginas
4.2.1. Metabólitos secundários	86
4.2.1.1. α -Tocoferol	87
4.2.2. Estudo comparativo dos órgãos	88
4.2.3. Estudo comparativo por tamanho	90
4.2.4. Estudo <i>in vitro</i>	92
4.3. Cultura de células	93
4.3.1. Ácido salicílico	94
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução geral

A química de produtos naturais é um ramo da química orgânica que estuda as estruturas e transformações das substâncias presentes nos seres vivos. Esses compostos podem ser divididos em dois grandes grupos de metabólitos, os primários e os secundários.

O metabolismo primário abrange 20 aminoácidos principais e proteínas (constituição dos seres vivos, peptídeos e enzimas), açúcares e carboidratos (responsáveis pela energia, combustão interna), ácidos graxos e gorduras (armazenamento de energia, sustentação), nucleotídeos e ácidos nucléicos (responsáveis por toda a informação genética dos seres vivos). Estas substâncias são comuns a todos os seres vivos, e desempenham um papel ubíquo e essencial para a ocorrência da vida (MANN, 1987).

O metabolismo secundário abrange uma grande diversidade de compostos orgânicos que aparentemente não participam diretamente do crescimento e desenvolvimento dos seres vivos e estão distribuídos diferencialmente entre espécies específicas e limitados a grupos taxonômicos. Desta forma, os metabólitos secundários consistem em uma expressão da individualidade das espécies (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

As plantas são grandes exemplos de seres vivos que sintetizam uma fantástica variedade de metabólitos secundários com diferentes níveis de

complexidade. A produção e acúmulo desses compostos estão relacionados principalmente com fatores ecológicos (interações da planta com herbívoros, insetos, outras plantas, microrganismos) e com o meio-ambiente em que a planta está inserida (incidência de luz, poluição, frequência de chuvas, salinidade, pH, altitude) (DEWICK, 1997).

Dessa forma, os metabólitos secundários podem ter sido desenvolvidos pelas plantas como resposta à predação (aumentando a toxicidade) e como proteção à radiação solar ou à salinidade do meio. Outras substâncias, porém, parecem possuir a finalidade de atrair polinizadores para a fecundação ou para a dispersão de sementes (DEWICK, 1997).

O relacionamento das plantas com o homem é tão antigo quanto a própria humanidade. Diversas plantas foram conhecidas e utilizadas das mais diversas formas: condimentos, venenos, medicamentos, em rituais de cura ou religiosos, e acabaram até mesmo sendo domesticadas pelo homem devido às atividades biológicas (LOBO, 1976).

O ópio, látex extraído da papoula (*Papaver somniferum*) era utilizado na Europa Oriental devido à atividade analgésica e sedativa desde, pelo menos, 1400 a 1200 a.C. Já as análises dos componentes do ópio que resultaram no isolamento da morfina só ocorreram em 1806 (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

O isolamento de substâncias provenientes de plantas intensificou-se nos meados do século XIX. Os estudos dos produtos naturais estimularam o desenvolvimento de técnicas de separação, espectroscopia e elucidação estrutural (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Além disso, esses estudos tiveram também uma significativa contribuição para o desenvolvimento da química sintética moderna, impulsionando a procura de

novas substâncias com potencial uso farmacológico (MONTANARI; BOLZANI, 2001). A coniina, principal componente da cicuta (*Conium maculatum*), planta altamente tóxica e amplamente conhecida desde a Antiguidade, foi o primeiro alcalóide a ser sintetizado em 1870 (MANN, 1987).

Nas folhas do chá (*Camellia sinensis*) encontramos, entre outros compostos, a catequina, um flavonóide que atua como antioxidante e fornece proteção contra doenças cardiovasculares (DEWICK, 1997).

O ácido oleanólico é um triterpeno amplamente distribuído em alimentos e plantas medicinais, por exemplo, no cambucá (*Plinia edulis*), apresentando muitas propriedades e atividades biológicas úteis ao homem. Entre essas atividades, podemos citar possíveis usos como hepatoprotetor, gastroprotetor e antitumoral (ISHIKAWA, 2008).

A colchicina, princípio ativo da planta tailandesa conhecida como “Dao Dueng” (*Gloriosa superba*), foi usada por muitas gerações no tratamento de artrite e atualmente é estudada por apresentar potencial anti-cancerígeno (MAHIDOL et al., 1998).

A cânfora é um monoterpeno de forte odor aromático produzido pela planta *Cinnamomum camphora*. Seu uso tópico devido às suas propriedades refrescantes, como leve anestésico local e como anti-séptico e antimicrobiano remonta à Antiguidade (DEWICK, 1997).

O tetraidrocanabinol, principal responsável pelos efeitos psicoativos da maconha (*Cannabis sativa*) planta conhecida e usada pelo homem desde tempos anteriores à sua primeira citação, na Farmacopéia Chinesa (2723 a.C.), também possui outros importantes usos farmacêuticos, como antiemético e no tratamento de glaucoma (DEWICK, 1997).

Os exemplos de produtos naturais descritos (e sua variedade estrutural) podem ser observados na figura 1.1.

Figura 1.1. Exemplos da diversidade química do metabolismo secundário de plantas.

A natureza tem sido provedora de agentes medicinais por milhares de anos e continua sendo uma fonte abundante de compostos químicos e farmacofóricos. Apenas cerca de 15% das plantas superiores foram estudadas cientificamente (CRAGG; NEWMAN, 2005).

O Brasil possui posição de destaque mundial em relação à biodiversidade encontrada no planeta. A existência de diferentes biomas, como a Mata Atlântica, o Cerrado e a Floresta Amazônica constituem uma grande fonte de riqueza

(GOTTLIEB et al., 1998). Para a conservação consciente e uso sustentável dessa riqueza, é necessário uma abordagem multidisciplinar, unindo a química, a biologia, a agronomia e a medicina, entre outras, para o desenvolvimento de novos conhecimentos ecológicos, sistemáticos e evolutivos (GOTTLIEB et al., 1998).

1.2. Metabolismo secundário de Piperaceae

A família Piperaceae situa-se na categoria das Angiospermas Basais. Trata-se de uma família de plantas que compreende ervas, arbustos, arvoretas, podendo ser epífitas, trepadeiras e lianas. É uma família encontrada principalmente nas regiões tropicais do mundo todo, possuindo cerca de 10 gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os mais representativos, com mais de 1000 espécies cada (GREIG, 2004).

Trata-se de uma família muito comum nas formações florestais brasileiras, principalmente na Mata Atlântica, onde encontramos 3 gêneros nativos: *Piper* (que atualmente engloba os antigos gêneros: *Ottonia* e *Pothomorphe*), *Peperomia* e *Sarcohachis*. A maior parte das espécies de *Piper* cresce em florestas quentes e úmidas e sua diversidade diminui com a elevação da altitude e com a diminuição da precipitação (SOUZA; LORENZI, 2005; GREIG, 2004).

A classificação da família Piperaceae encontra-se na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Classificação de Piperaceae.

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Piperales
Família:	Piperaceae

Piper e *Peperomia* são os gêneros mais conhecidos pelo homem, incluindo espécies utilizadas como medicinais, tais como falso-jaborandi (*Piper aduncum*), pariparoba (*Piper umbellatum*) e erva-jaboti (*Peperomia pellucida*), como condimentares: pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e como ornamentais: peperômia-zebra (*Peperomia argyreia*), peperômia-tricolor (*Peperomia magnoliifolia*), peperômia-filodendro (*Peperomia serpens*), peperômia-marrom, (*Peperomia caperata*) e arbusto-preto (*Piper magnificum*) (LORENZI; MATOS, 2008; LORENZI; SOUZA, 2008; SOUZA; LORENZI, 2005; LORENZI; MELLO FILHO, 2001).

O gênero *Piper* é o mais importante do ponto de vista econômico, sendo a pimenta-do-reino, *P. nigrum*, uma das especiarias mais conhecidas e utilizadas no mundo. A amida piperina foi a primeira substância isolada de *P. nigrum*, sendo a principal responsável pela pungência (DYER; RICHARDS; DODSON, 2004).

O metabolismo secundário de *Piper* é também bastante diversificado. A kava-kava (*P. methysticum*), muito utilizada como calmante e sedativo por grande parte da população da Polinésia e do Pacífico Sul, apresenta, em suas raízes, compostos da classe das kavapironas, como a kavaina e a metisticina (KATO; FURLAN, 2007; BRISKIN et al., 2004).

O betel, *P. betle*, é uma planta muito utilizada no sudeste asiático como fumo de mascar, para indigestão, halitose e problemas dentários. Seu estudo gerou o isolamento do fenilpropanóide chavibetol, entre outros compostos (NALINA; RAHIM, 2007).

Em *P. futokadsura*, usada por comunidades asiáticas para o tratamento de artrite e para aliviar os sintomas do reumatismo, foi encontrada a lignana kadsurina A (KOUL et al., 1996; JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993).

Em *P. acustileginum* foi observada a presença da cefaradiona A, uma alcanida cíclica da classe das dioxoaporfinas e em *P. aduncum*, a 2',6'-diidróxi-4'-metóxi-diidrochalcona foi isolada entre uma série de diferentes produtos naturais (PARMAR et al., 1998; 1997).

As diferenças e semelhanças das estruturas de metabólitos secundários encontrados em *Piper* podem ser observadas na figura 1.2.

Figura 1.2. Exemplos de produtos naturais encontrados em *Piper*.

1.2.1. Fenilpropanóides e lignanas tetraidrofurânicas em *Piper*

Pode-se observar que grande parte dos metabólitos secundários encontrados em *Piper* são provenientes da via do chiquimato. A via do chiquimato forma o ácido chiquímico como intermediário e é responsável pela biossíntese de compostos aromáticos, incluindo três importantes aminoácidos: a *L*-fenilalanina, a *L*-tirosina e o *L*-triptofano (HERRMANN; WEAVER, 1999).

A *L*-fenilalanina, além de fazer parte da constituição dos peptídeos, enzimas e proteínas (metabolismo primário), pode sofrer perda do grupo amino levando à formação do ácido cinâmico, mediada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL), catalisadora da eliminação *trans* da amônia (figura 1.3). Esta enzima atua também sobre a *L*-tirosina, formando o ácido *p*-cumárico (MANN, 1994).

Figura 1.3. Biossíntese do ácido cinâmico. PAL: fenilalanina liase.

O ácido cinâmico é o precursor de uma série de compostos, como fenilpropanóides (C_6C_3), acetofenonas (C_6C_2), ácidos benzóicos, benzaldeídos (C_6C_1) e outras substâncias fenólicas com diversos níveis de oxigenação (MANN, 1994).

Os fenilpropanóides, além de participarem da composição de óleos voláteis, podem gerar grande variedade de substâncias, entre as quais podem ser citadas as

lignanas, cumarinas, amidas, flavonóides, isoflavonóides, estruturas oligoméricas (como os taninos, responsáveis em parte pela adstringência de comidas e bebidas), além de estruturas poliméricas (como as ligninas, de caráter estrutural, que promovem a sustentação das plantas) (DEWICK, 1997).

As lignanas são formadas, em geral, por dimerização de grupos fenilpropânicos, através de condensações oxidativas. Trímeros e tetrâmeros de fenilpropanóides ocorrem mais raramente na natureza e são chamados de oligolignanas (WILLFÖR; SMEDS; HOLMBOM, 2006; LOPES; YOSHIDA; KATO, 2004).

Entre as lignanas de interesse, destacam-se as tetraidrofurânicas, que contém dois anéis aromáticos (com diversos padrões de substituição) ligados a um anel tetraidrofurânico, presentes em muitas espécies de *Piper* e que apresentam pronunciadas atividades biológicas, como por exemplo, a (-)-grandisina.

A (-)-grandisina é uma lignana tetraidrofurânica que apresenta os dois anéis aromáticos trimetoxilados e configuração toda *trans* em seu anel tetraidrofurânico. Foi primeiramente isolada de *Litsea grandis* (HOLLOWAY; SCHEINMANN, 1974) e posteriormente encontrada em *Cryptocarya crassinervia* (SAAD et al., 1991), *Virola surinamensis* (LOPES et al., 1996), *Piper solmsianum* (MARTINS et al., 2000) e *Rhaphidophora decursiva* (ZHANG et al., 2001).

A alta atividade da (-)-grandisina contra a forma tripomastigota do protozoário *Trypanossoma cruzi*, responsável pela Doença de Chagas, que, por sua vez, é transmitida pelo mosquito barbeiro, *Triatoma infestans*, (MARTINS et al., 2003; LOPES et al., 1998), gerou uma patente (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1999).

Esta atividade foi tão pronunciada que incentivou trabalhos de síntese de compostos análogos, onde se verificou que a maior atividade biológica encontrada pode estar relacionada com a configuração *trans* entre os anéis aromáticos (NIHEI et al., 2004). Em outro trabalho de síntese de análogos, foram obtidas substâncias de estruturas não-rígidas (1,4-diaril-1,4,-diol), simétricas e não-simétricas, com pronunciada atividade tripanocida (BERNARDES et al., 2006).

Foi constatada uma atividade discreta da (-)-grandisina contra a Malária, doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que é transmitida por picadas de mosquitos do gênero *Anopheles* e que causa cerca de 2 milhões de mortes por ano nas regiões tropicais (ZHANG et al., 2001).

Sua alta eficiência contra as larvas de mosquitos *Aedes Aegypti*, vetor da Dengue (CABRAL et al., 2009), também gerou uma patente (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

A (-)-grandisina produziu também um efeito ovicida e larvicida sobre a mosca varejeira, *Chrysomya megacephala*, muito conhecida por ser carregadora de patógenos ao homem e aos animais. Os efeitos incluíram a alteração do desenvolvimento pós-embrionário em todas as fases do ciclo de vida da mosca varejeira, apresentando redução no peso larval e do tamanho das moscas adultas (CABRAL et al., 2007).

A tabela 1.2 apresenta uma revisão das lignanas tetraidrofurânicas que ocorrem em *Piper*.

Tabela 1.2. Lignanas tetraidrofurânicas identificadas em *Piper* (continua).

Nome Trivial	Ar ₁	Ar ₂	Referência
(+)-calopiptina			JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993
futokadsurina-A			KONISHI et al., 2005
(+)-veraguensina			KONISHI et al., 2005

(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epóxi-lignana			MARTINS et al., 2000
futokadsurina-B			KONISHI et al., 2005

(-)-galbelgina			KONISHI et al., 2005
(+)-grandisina			JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993

Tabela 1.2. Lignanas tetraidrofurânicas identificadas em *Piper* (continuação).

Nome Trivial	Ar ₁	Ar ₂	Referência
(-)-galbacina			KONISHI et al., 2005

(+)-galbelgina			PRASAD et al., 1994
(-)-grandisina			MARTINS et al., 2000
(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epóxi-lignana			MARTINS et al., 2003
(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epóxi-lignana			MARTINS et al., 2003

galgravina			JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993
(-)-machilina-G			JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993

Tabela 1.2. Lignanas tetraidrofurânicas identificadas em *Piper* (conclusão).

Nome Trivial	Ar ₁	Ar ₂	Referência
machilina-F			KONISHI et al., 2005

(-)-zuionina-A			JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993
(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-diveratril-(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-dimetiltetraidrofurano			PRASAD et al., 1995
(-)-chicanina			KONISHI et al., 2005
(-)-machilusina			KONISHI et al., 2005

futokadsurina-C			KONISHI et al., 2005

1.2.2. Aristolactamas em *Piper*

As aristolactamas são compostos fenantrênicos, contendo um agrupamento amida ciclizado. Devido ao sistema π conjugado estendido, tais compostos apresentam fluorescência. A denominação desta classe de substâncias deriva do fato de terem sido inicialmente identificadas em espécies de *Aristolochia* (Aristolochiaceae), pertencente à ordem Piperales. Posteriormente, também foram encontradas em espécies de Annonaceae, Monimiaceae, Menispermaceae e Piperaceae (KUMAR et al., 2003).

Devido à ocorrência restrita e às semelhanças observadas entre essas famílias, esta pequena classe de compostos possui importância quimiotaxonômica, que aproxima Piperales de Magnoliales e Ranunculales (KUMAR et al., 2003).

Muitas atividades biológicas foram descritas para aristoloquiáceas. Na Índia, o extrato alcoólico de *Aristolochia indica* é usado como emenagogo (facilita a menstruação) e como abortofaciente (atividade anticoncepcional pós-coito). Também são utilizadas várias espécies do gênero na medicina popular brasileira e sul-americana principalmente como diurética, anti-séptica e emenagoga, sendo também empregadas na prisão de ventre, indigestão, dispepsia, diarreia, flatulência, asma, febre, palpitações e convulsões (LORENZI; MATOS, 2008; KUMAR et al., 2003).

Pode-se observar que na etapa inicial da biossíntese das aristolactamas, a *L*-tirosina sofre perda de uma molécula de CO₂, mediada pela enzima tirosina descarboxilase (TYDC), gerando a tiramina (figura 1.4).

Figura 1.4. Biossíntese da tiramina. TYDC: enzima tirosina descarboxilase.

Sabe-se muito pouco acerca da biossíntese das aristolactamas. Entretanto, são relacionadas biogeneticamente com alcalóides aporfínicos. A idéia mais aceita atualmente é que as 4,5-dioxoaporfinas são biossintetizadas por oxidação das aporfinas e podem funcionar como intermediárias para a biossíntese das aristolactamas, que por sua vez, são as precursoras dos ácidos aristolóquicos (KUMAR et al., 2003).

Evidências correlacionam o uso de plantas medicinais contendo ácidos aristolóquicos com a formação de neoplasias de órgãos como rins e uretra em seres humanos e animais (ARLT; STIBOROVA; SCHMEISER, 2002). Estudos *in vitro* corroboram com a hipótese, demonstrando alta toxicidade em células renais, no entanto, análogos dos ácidos aristolóquicos, tais como aristolactamas, não apresentaram citotoxicidade significativa (BALACHANDRAN et al., 2005).

As estruturas das aristolactamas encontradas em *Piper* estão representadas na tabela 1.3.

Tabela 1.3. Aristolactamas identificadas em *Piper* (continua).

Nome Trivial	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Referência
cefaranona B	OMe	OMe	H	H	H	DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988
aristolactama AII	OMe	OH	H	H	H	DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988
piperolactama A	OH	OMe	H	H	H	DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988
piperolactama B	OH	OMe	OMe	H	H	DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988
diacetato de piperolactama B	OAc	OMe	OMe	Ac	H	DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988
piperolactama C	OMe	OMe	OMe	H	H	KUMAR et al., 2003
piperolactama D	OMe	OMe	OH	H	H	DESAI; CHATURVEDI; MULCHANDANI, 1990
4-hidróxi-3-metóxi- <i>N</i> -metilaristolactama	OH	OMe	H	Me	H	RUANGRUNGSI et al., 1992
10-acetilamino-2-hidróxi-3,4-dimetóxi-fenantreno-1-ácido carboxílico-lactama	OMe	OMe	OH	Ac	H	SINGH et al., 1996
10-acetilamino-4-hidróxi-2,3-dimetóxi-fenantreno-1-ácido carboxílico-lactama	OH	OMe	OMe	Ac	H	SINGH et al., 1996
piperolactama S	OMe	OH	H	Me	H	KUMAR et al., 2003
piperolactama E	OH	OMe	OMe	Me	H	CHEN et al. 2004
caldensina	OMe	OMe	H	Me	H	CARDOZO-JÚNIOR; CHAVES, 2003
aristolactama AIII	OMe	OH	H	H	OMe	MIX; GUINAUDEAU; SHAMMA, 1982
aristolactama BIII	OMe	OMe	H	H	OMe	TSAI et al., 2005
goniotalactama	OMe	OMe	H	H	OH	TSAI et al., 2005
goniopetalina	OMe	OH	OMe	H	H	DANELUTTE et al., 2005
2,3,4-trimetóxi- <i>N</i> -metilaristolactama	OMe	OMe	OMe	Me	H	DANELUTTE et al., 2005
3-hidróxi-3-metóxi- <i>N</i> -metilaristolactama	H	OH	OMe	Me	H	DANELUTTE et al., 2005
piperumbelactama C	OH	OH	H	Me	H	TABOPDA et al., 2008

Tabela 1.3. Aristolactamas identificadas em *Piper* (conclusão).

Nome Trivial	R ₁	Referência
piperumbelactama D	Me	TABOPDA et al., 2008
N-hidróxi-aristolactama II	H	TABOPDA et al., 2008

1.3. *Piper solmsianum*

Piper solmsianum C. DC. é uma espécie nativa da Mata Atlântica, muito comum na Serra do Mar, na região entre os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (sudeste brasileiro) e possui as seguintes sinonímias científicas: *Piper leucathum* C. DC. e *Piper santosanum* C. DC. É encontrada principalmente em matas de encostas, áreas de iluminação difusa, quente e úmida, mas também pode ocorrer em capoeiras e restingas (RAMOS; VANIN; KATO, 2008; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1995).

Trata-se de um arbusto de até três metros de altura (figura 1.6). Possui folhas cordiformes de superfície lisa, com cerca de 20 cm de diâmetro (figura 1.5). Sua multiplicação se dá principalmente por sementes, mas pode ocorrer também a mergulhia (MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1995).

Figura 1.5. *Piper solmsianum*: hábito em seu habitat natural.

A planta é conhecida popularmente como pariparoba (SOUZA; VANIN; KATO, 2008), mas essa nomeação é genérica e inclui outras espécies de piperáceas como *Piper umbellatum* (antiga *Pothomorphe umbellata*) (SOUZA; LORENZI, 2005; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1995).

As sementes podem ser dispersas através da ação de morcegos, em especial *Carollia perspicillata*, espécie muito comum na Mata Atlântica, que se alimenta principalmente de frutos ou inflorescências de piperáceas, os quais chegam a fazer parte de 70% de sua dieta. A relação ecológica que ocorre entre espécies de *Piper* com morcegos é chamada de quiropterocoria (relação de mutualismo) (MELLO et al., 2004; FLEMING, 2004).

A dispersão de sementes por morcegos costuma ser muito eficiente, pois além desses mamíferos percorrerem grandes distâncias em seus vôos noturnos, geralmente não danificam as sementes e até podem acelerar o processo de germinação (FLEMING, 2004).

Figura 1.6. Exemplos de *Piper solmsianum* em seu estado nativo, na Mata Atlântica.

Moreira, Kaplan e Guimarães (1995) publicaram o primeiro trabalho com *P. solmsianum* pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde descreveram o isolamento de uma lignana benzofurânica (eupomatenóide-6), um flavonóide e 11 sesquiterpenos em extratos aéreos.

Martins (2002) iniciou os estudos com a espécie no Laboratório de Química dos Produtos Naturais (LQPN) do Instituto de Química na Universidade de São Paulo. Estudou principalmente o metabolismo secundário das folhas e caules de plantas adultas de *P. solmsianum*, encontrando fenilpropanóides e lignanas tetraidrofurânicas, em especial, a (-)-grandisina, produzida em grande quantidade. Além disso, estudos envolvendo a PAL foram realizados de forma a estabelecer um comparativo da atividade enzimática em diversos órgãos da planta.

Em inflorescências, outras lignanas tetraidrofurânicas foram isoladas e caracterizadas, com predominância marcante da (-)-grandisina. Foi verificada

também pronunciada atividade tripanocida do extrato feito com essa parte da planta (MARTINS et al., 2003).

Ao comparar trabalhos produzidos em São Paulo (grupo LQPN) com trabalhos concomitantes produzidos no Rio de Janeiro (MOREIRA et al., 2001; MOREIRA; GUIMARÃES; KAPLAN, 1998) constata-se que são variedades diferentes de *P. solmsianum*, tanto que em trabalhos posteriores (CAMPOS et al., 2005), o nome científico da planta é apresentado como *P. solmsianum* C. DC. var. *solmsianum*.

Ramos (2006) realizou estudos ecológicos envolvendo plantas do gênero *Piper* e insetos e larvas de borboletas. Uma das observações foi a biotransformação da (-)-grandisina em suas formas mono e di-desmetilada através da digestão da planta pelos insetos *Naupactus bipes*, *Heraclides hectorides* e *Quadrus u-lucida* (RAMOS; VANIN; KATO, 2008).

Balbuena (2006) realizou estudos para o estabelecimento e caracterização de culturas de células vegetais *in vitro* de *P. aduncum* e *P. solmsianum* e Amaral (2008) fez estudos preliminares acerca das variações circadianas (ao longo das horas do dia), sazonais (épocas do ano) e intra-específicas (entre diferentes populações) em *P. solmsianum*.

Silva (2008) fez estudos de caracterização das ligninas de várias espécies de *Piper*, entre elas, *P. solmsianum* e procurou estabelecer relações entre o padrão de oxigenação de anéis benzênicos da estrutura polimérica das ligninas com a das lignanas acumuladas.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Na área de produtos naturais, o objetivo maior é conhecer melhor as espécies que ocorrem no Brasil sob os aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e agrônômicos.

Estudos anteriores envolvendo *P. solmsianum* foram voltados ao estudo de aspectos morfogênicos, fitoquímicos e ecológicos. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo aprofundar o conhecimento de *P. solmsianum* sob objetivos específicos de:

- Promover a investigação fitoquímica das raízes de plantas adultas (*in vivo*);
- Comparar dos metabólitos secundários presentes em folhas, caules, raízes, inflorescências e sementes nas plantas adultas (*in vivo*);
- Avaliar o perfil fitoquímico de órgãos de plântulas (*in vivo*);
- Comparar o acúmulo de metabólitos secundários de plântulas em ambientes diferentes (*in vivo* e *in vitro*);
- Caracterizar a composição de metabólitos secundários em suspensões celulares (*in vitro*).

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 foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Tedia) e água MilliQ. Para a obtenção dos espectros de RMN, as amostras foram dissolvidas em CDCl_3 da Acros.

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizados sílica gel do tipo 60, partículas 63-200 μm e para tipo “flash”, sílica gel 60 com partículas de 40-63 μm da marca Merck.

Para cromatografia em camada delgada comparativa, CCDC, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F254 para cromatografia de camada fina, sobre suporte de alumínio da Merck. As placas de CCDC foram reveladas com aspersão de solução a 2% de sulfato cérico em ácido sulfúrico (2 mol L^{-1}) sobre as mesmas, após terem sido observadas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

As placas para cromatografia em camada delgada preparativa, CCDP, foram confeccionadas utilizando-se sílica 60 PF254 (5-40 μm). Estas placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador “Quickfit”, regulado para produzir camadas de 1,0 mm de espessura. Após a secagem, a ativação do adsorvente foi feita por aquecimento em estufa a 100 °C por, pelo menos, 1 hora.

As placas preparativas, após serem eluidas, foram observadas através de visualização no ultravioleta (254 e 365 nm). As áreas correspondentes a cada componente foram demarcadas com lápis e seu adsorvente foi raspado da placa. Em seguida, o componente purificado foi extraído com solventes orgânicos.

Todo material *in vitro* foi ajustado o pH a 5,70 com auxílio de um pHmetro da marca Mettler Toledo, modelo SevenEasy. O ajuste foi realizado com adição de soluções 1,0 M e 0,1 M de HCl e NaOH.

Para a esterilização de meio de cultura, o material foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C e 1,5 kgf/cm² em um aparelho de autoclave horizontal da marca Luferco. Para vidraria e outros instrumentos para manipulação em fluxo laminar o tempo foi de 40 minutos, nas mesmas condições.

Os procedimentos sob condições estéreis foram realizados em fluxo laminar horizontal da marca Veco. O material líquido foi manipulado com o auxílio do aparelho EasyPet, da Eppendorf. Todo o material e instrumental usados foram esterilizados através de borrifação de solução aquosa de EtOH 70%.

3.2. Material vegetal

3.2.1 Plantas adultas *in vivo*

As raízes de espécimes adultos (entre 1,5 e 2,5 m de altura) foram coletadas em Dezembro de 2005 no Núcleo Picinguaba, Ubatuba (SP), em

Fevereiro de 2007 de plantas cultivadas no próprio Instituto de Química da USP, São Paulo (SP) e em Dezembro de 2007 em Trindade, Paraty (RJ). As amostras de caules, folhas, inflorescências e sementes de exemplares adultos (com a mesma faixa de tamanho) de *P. solmsianum* foram coletadas na Barra do Sahí, São Sebastião (SP) em Janeiro de 2006.

Essa espécie foi identificada pela profa. Dra. Elsie Franklin Guimarães e a exsicata (KATO-027) foi depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ).

3.2.2 Plântulas *in vivo*

As sementes de *P. solmsianum* obtidas de coleta em Barra do Sahí, São Sebastião (SP) foram usadas para a germinação de plântulas *in vivo*. As plântulas foram cultivadas em terra comum (mistura de partes iguais de terra vermelha, areia e adubo orgânico) e mantidas sob um fotoperíodo de 16 horas (com lâmpadas fluorescentes de 85 W). O plantio foi realizado no início do mês de Fevereiro (meados do Verão). A germinação ocorreu em cerca de 3 a 6 semanas.

As plântulas foram regadas em uma frequência de duas vezes por semana e acondicionadas sob proteção de filme plástico de PVC, para manutenção da umidade (figura 3.1).

Figura 3.1. Plântulas de *Piper solmsianum* com aproximadamente 4 meses de idade.

O desenvolvimento das plântulas ao longo do tempo foi heterogêneo, ou seja, com velocidades diferentes, e após um período de 8-9 meses do início do plantio, foram recolhidas para a preparação dos extratos (figura 3.2).

Figura 3.2. Plântulas de *Piper solmsianum* divididas em três grupos de acordo com os tamanhos dos caules.

A partir desses grupos de órgãos separados foram preparados extratos brutos para a posterior comparação dos perfis químicos (figura 3.3).

Figura 3.3. Grupos de órgãos de plântulas de *Piper solmsianum* separados pelo tamanho: raízes, caules e folhas.

3.2.3 Plântulas *in vitro*

As sementes das plantas coletadas no Núcleo de Picinguaba, Ubatuba (SP) foram lavadas com solução aquosa 40% de NaOCl (hipoclorito de sódio) por 15 minutos, lavadas com solução etanólica 70% e, posteriormente, lavadas com água destilada esterilizada em condições assépticas. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura Murashige e Skoog (1962), ou MS-62, suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de fitagel.

O meio de cultura MS-62 preparado está expresso em termos de quantidade de nutrientes na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Nutrientes encontrados na solução do meio de cultura MS-62 utilizado para o cultivo *in vitro* de plântulas de *Piper solmsianum*.

Nutriente	Concentração (g/L)
NH_4NO_3	82,5
KNO_3	95,0
H_3BO_3	1,24
KH_2PO_4	34,0
KI	0,166
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,050
$\text{Co}_2\text{Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	88,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,38
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	74,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,72
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,72
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,78
Tiamina	0,01
Piridoxina	0,05
Glicina	0,20
Ácido Nicotínico	0,05

Figura 3.4. Sementes de *Piper solmsianum* em início de germinação *in vitro*.

As plântulas resultantes foram submetidas à repicagem, através de cultivo de nós simples de 1 cm de comprimento, no mesmo meio de cultura. As plântulas foram incubadas em uma temperatura de 27 ± 2 °C em um fotoperíodo de 16 h (com lâmpadas fluorescentes Philips com $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância).

As plântulas foram micropropagadas e mantidas através de repicagens periódicas em intervalos de 4 meses (120 dias), como anteriormente descrito no estabelecimento de culturas *in vitro* (figura 3.5) (BALBUENA, 2006).

Figura 3.5. Plântulas *in vitro* de *Piper solmsianum* após repicagem.

3.2.4 Suspensões celulares

Para a indução de calos foram utilizados os nós provenientes de plantas axênicas cultivadas *in vitro*, que serviram como fonte de explantes, que foram mantidos nas mesmas condições ambientais de incubação já descritas. O meio de cultura utilizado foi o MS-62 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de fitagel e com a adição dos reguladores de crescimento: 2,4-D (0,2 mg/L), BAP (2,0 mg/L) (BALBUENA, 2006).

As suspensões celulares foram iniciadas a partir dos calos friáveis, utilizando-se o meio de cultura idêntico ao descrito para os calos, porém sem a adição de fitagel.

As culturas de suspensões celulares foram mantidas em agitadores mecânicos orbitais da marca Ética a 100 rpm sob luz.

As repicagens foram efetuadas periodicamente a cada 30 dias com a inoculação de cerca de 2 mL da suspensão anterior em cerca de 50 mL de solução do meio de cultura esterilizado já descrito anteriormente (BALBUENA, 2006).

As culturas de suspensões celulares podem ser visualizadas na figura 3.6.

Figura 3.6. Suspensões celulares de *Piper solmsianum*.

3.3. Obtenção de extratos

Após a coleta, as partes vegetais de plantas adultas: raízes, caules, folhas, inflorescências e sementes, foram separadas manualmente, secas à temperatura ambiente por 48 horas e, em seguida, em estufa a 40 °C por mais 48 horas. O material seco foi triturado em moinho de facas e extraído a frio com AcOEt, exaustivamente.

Outros extratos das raízes de plantas adultas foram preparados para investigar a composição minoritária de seu metabolismo secundário. Cerca de 200g

do material vegetal seco foi extraído com o auxílio de aparato Soxhlet com DCM (2 dias), MeOH (3 dias) e, por fim, acetona (lavagem). O extrato metanólico foi submetido a uma partição com CHCl_3 e AcOEt.

O fluxograma que representa esta separação está na figura 3.7.

Figura 3.7. Fluxograma do fracionamento de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Folhas, caules e raízes de plântulas *in vivo* e raízes de plântulas *in vitro* foram extraídas em mistura de solventes DCM:MeOH (2:1) com o auxílio do aparelho Ultra-Turrax T25 Basic da marca IKA-WERKE.

Os extratos de suspensões celulares foram preparados a partir de células filtradas em um funil de Büchner. As amostras foram liofilizadas e, na sequência, extraídas com a mistura de solventes DCM:MeOH (2:1) com o auxílio do mesmo

aparelho utilizado para as extrações anteriores. Os extratos do meio de cultura foram obtidos por partição da solução aquosa do meio de cultura com CHCl_3 .

Todos os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo em temperatura constante de 40°C.

3.4. Fracionamento cromatográfico

Por ter sido brevemente estudado em tese de doutorado (MARTINS, 2002) e apresentado uma maior diversidade química em análise preliminar em CCDC e CLAE, o extrato bruto das raízes de plantas adultas foi fracionado por cromatografia em coluna de gel de sílica. O perfil fitoquímico de todos os extratos de raízes foi comparado por CCDC e foram realizados 2 fracionamentos principais que estão descritos a seguir.

Uma alíquota de 4,5 g do extrato bruto diclorometânico (obtido por extração em aparelhagem Soxhlet) foi submetido a uma coluna filtrante de sílica utilizando como eluente um gradiente de polaridade crescente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gerando 30 frações.

Tabela 3.2 - Massas das frações obtidas resultantes da coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1	83,2	16	683,5
2	1242,3	17	164,1
3	233,9	18	125,8
4	148,0	19	11,7
5	53,2	20	8,9
6	43,3	21	6,3
7	57,9	22	8,2
8	94,3	23	4,5
9	26,6	24	18,4
10	30,9	25	223,0
11	20,1	26	295,3
12	39,6	27	126,3
13	46,7	28	54,5
14	63,1	29	72,1
15	229,9	30	38,8

As frações recolhidas foram analisadas por CCDC e as que apresentavam estreita semelhança de coloração e R_f quando visualizadas em luz UV (com comprimentos de onda de 254 e 365 nm) foram reunidas. Assim, as frações 6-8; 9-12, 13-15, 16-18, 19-24, 27-29 foram reunidas devido a semelhanças de CDCC e R_f.

A amostra de extrato metanólico particionado com CHCl₃ das raízes de plantas adultas (1,5 g) também foi submetido a uma coluna de sílica gel. Foi utilizado

como eluente um gradiente de polaridade crescente de mistura de hexano/AcOEt gerando 24 frações.

Tabela 3.3 - Massas das frações obtidas resultantes da coluna de gel de sílica do extrato metanólico particionado de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1	91,5	13	28,0
2	70,7	14	8,7
3	3,5	15	10,0
4	4,5	16	4,5
5	2,5	17	2,6
6	1,7	18	12,0
7	1,6	19	7,1
8	3,1	20	13,9
9	12,7	21	449,2
10	24,7	22	310,0
11	10,4	23	67,5
12	67,1	24	11,2

Após observação em CCDC, as frações 5-7; 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, 16-18, 19-20 foram reunidas da mesma forma que as frações da coluna filtrante descrita anteriormente.

3.5. Purificações

As substâncias presentes em algumas frações, em especial, nas frações 3, 4-5, 9-11, 16-18, 19-24, da primeira coluna e nos conjuntos 5-7, 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, 16-18 resultantes da segunda coluna, foram submetidas à purificação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como sistemas de eluição hexano/AcOEt, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e DCM/EtOH em proporções variáveis de acordo com a polaridade das mesmas.

3.6. Análises

Os extratos brutos, as frações e as substâncias isoladas foram analisados por técnicas CCDC, CLAE, CG-EM, espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta, fluorescência e RMN de ^1H e de ^{13}C .

As análises em CLAE foram obtidas em um sistema da Shimadzu que consistiu de duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector de fluorescência RF-10A e um detector ultravioleta modelo SPD-10A, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e tratados pelo programa de computador LC-10. Foram utilizadas duas colunas cromatográficas comerciais: a Supelco Fusion RP1 e a Luna C18.

Para todas as análises aqui descritas, foi utilizado o sistema de solventes ACN/ H_2O , no modo gradiente (descrição na figura abaixo). O detector de

fluorescência foi ajustado com λ de excitação em 360 nm e λ de emissão em 470 nm de acordo com os valores propostos na literatura (YUAN et al., 2008). O detector de UV-Vis foi ajustado com λ em 254 nm. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL/min. O tempo total de análise foi 60 min e o tempo de equilíbrio estabelecido antes de cada injeção foi de 15 min (figura 3.8).

Figura 3.8. Curva de gradiente de concentração do solvente orgânico na fase móvel utilizada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises de cromatografia gasosa e seus espectros de massas (EM) foram obtidos em um espectrômetro CG-EM SHIMADZU modelo GCMS-QP5050A, equipado com coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μ m) a 70 eV. As condições empregadas nas análises foram: temperatura do injetor: 280 °C, gás de arraste: Hélio, fluxo da coluna: 1,6 mL min⁻¹, temperaturas programadas: 60 °C (1 min), 60 para 280 °C (5 °C min⁻¹) e 280 °C (até 55 ou 60 min) (figura 3.9).

Figura 3.9. Curva de aquecimento utilizada nas análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Para a obtenção de espectro de massas de alta resolução por infusão direta foi utilizado um aparelho Bruker Daltonics MICRO-TOF com analisador de tempo de voo.

As curvas de fluorescência foram obtidas através de um fluorímetro SPEX – FLUOROLOG 1681 0,22m Spectrometer.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros da Bruker AC200 (operando em 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C) e Bruker DRX500 (operando em 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Plantas adultas

4.1.1. Metabólitos secundários de raízes

A partir do fracionamento dos extratos provenientes das raízes de *P. solmsianum* e sua posterior análise através de diversas técnicas, foi possível a identificação de 18 substâncias: 4 esteróides (campesterol, sitosterol, tremulona e 3,6-estigmastadiona), 1 ácido benzóico substituído (ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico), 1 benzaldeído substituído (3,4,5-trimetóxi-benzaldeído), 5 fenilpropanóides (miristicina, elemicina, isoelemicina, apiol e dilapiol), 5 lignanas [(-)-grandisina, (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana, (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana, (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana e (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana] e 2 aristolactamas (cefaranona B e piperolactama C).

4.1.1.1. Miristicina

A partir da fração 2 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) foi isolado como principal componente a miristicina (massa superior a 1 g), um composto oleoso amarelado com forte aroma.

A identificação foi feita por meio de análises de CG-EM e pela comparação do espectro de massas (figura 4.2) com dados na literatura (BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999). A massa ($M^+ = 192$ Da) corresponde à fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$.

A miristicina é um fenilpropanóide trioxigenado contendo um grupo metilenodióxi e um grupo metoxila ligados ao anel aromático (figura 4.1).

Foi primeiramente isolada da noz-moscada (*Myristica fragans*, Myristicaceae) em 1903, sendo também encontrada em outros condimentos utilizados na culinária (DEWICK, 1997).

Figura 4.1. Miristicina.

Figura 4.2. Espectro de massas da miristicina obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.2. Apiol e dilapiol

A partir das frações 3 e 4-5 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) e fração 1 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*) foram isolados o apiol e o dilapiol.

A identificação do apiol e o dilapiol se deu por comparação dos espectros de massas obtidos por CG-EM (figuras 4.4 e 4.5) com dados da literatura (BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999) e de bancos de dados (NIST e WWS) (SCIFINDER, 2008).

O apiol e o dilapiol são dois fenilpropanóides tetraoxigenados, de fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$ ($M^+ = 222$ Da), contendo 2 metoxilas e 1 grupo metilenodioxílico ligados ao anel. A diferença dos dois compostos é a posição de uma das metoxilas (figura 4.3).

Figura 4.3. Apiol (esquerda) e dilapiol (direita).

Figura 4.4. Espectro de massas do apiol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Figura 4.5. Espectro de massas do dilapiol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.3. Ácido-3,4,5-trimetóxi-benzóico

O ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (figura 4.6) foi identificado a partir da fração 4-5 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) e fração 4 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*) por meio de análises de CG-EM e comparação dos espectros de massas obtidos (figura 4.7) com dados da literatura (BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999). A massa ($M^+ = 212$ Da) corresponde a fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_5$.

Figura 4.6. Ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico.

Figura 4.7. Espectro de massas do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.4. 3,4,5-Trimetóxi-benzaldeído

O 3,4,5-trimetóxi-benzaldeído (figura 4.8) foi identificado nas frações 4-5 e 6-8 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) e da fração 5 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*) por meio de análises de CG-EM e comparação dos espectros de massas obtidos (figura 4.9) com dados da literatura (BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999). A massa ($M^+ = 196$ Da) corresponde à fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_4$.

Figura 4.8. 3,4,5-Trimetóxi-benzaldeído.

Figura 4.9. Espectro de massas do 3,4,5-trimetóxi-benzaldeído obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.5. Elemicina e isoelemicina

A elemicina e a isoelemicina foram isoladas das frações 9-11 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) e das frações 2 e 3 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*).

A identificação se deu por meio de análises de CG-EM e comparação dos espectros de massas obtidos (figura 4.11) com dados da literatura (ENRIQUEZ; CHÁVEZ; JÁUREGUI, 1980).

As substâncias possuem fórmula molecular $C_{12}H_{16}O_3$, correspondente a massa de 208 Da, sendo, portanto, isômeros. Os compostos apresentam três grupos metoxila ligados ao anel aromático (nas posições 3,4,5) e o que difere as duas substâncias é a posição da dupla ligação da cadeia alifática (figura 4.10).

Figura 4.10. Elemicina (esquerda) e isoelemicina (direita).

Figura 4.11. Espectro de massas da elemicina obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Figura 4.12. Espectro de massas da isoelemicina obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.6. Lignana 1: (-)-grandisina

A (-)-grandisina, lignana **1**, foi isolada das frações 16-18 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*). Trata-se da principal substância acumulada na espécie, sendo encontrada em grande quantidade em todas as partes da planta adulta, isolada como um sólido cristalino (figura 4.13).

Figura 4.13. Cristais de (-)-grandisina obtidos por filtração de extrato bruto das inflorescências de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

A identificação se deu por comparação dos dados obtidos por espectrometria de massas (figura 4.15) e obtidos por de RMN de ^1H (tabela 4.1; figura 4.16) e de ^{13}C (figura 4.17) com os dados da literatura (RAMOS, 2006; MARTINS, 2002; LOPES, 1997).

A (-)-grandisina é uma lignana tetraidrofurânica de massa 432 Da, correspondente a uma fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$, que apresenta dois anéis

benzênicos trimetoxilados (nas posições 3,4,5) e a configuração toda *trans* para os substituintes do anel tetraidrofurânico (figura 4.14).

Figura 4.14. (-)-Grandisina.

Figura 4.15: Espectro de massas da lignana **1**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV)

Figura 4.17: Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz; CDCl_3) da lignana **1**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.7. Lignana **2**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana

A lignana **2**, (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodioxí-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana, foi identificada em mistura nas frações 12-15 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) por comparação dos dados obtidos por CG-EM (figura 4.19) e obtidos por de RMN de ^1H (tabela 4.2; figura 4.20) com os dados da literatura (MARTINS et al., 2000).

O íon molecular de massas $\text{M}^+ = 416$ Da corresponde à fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$. A estrutura possui um grupo metilenodioxílico e um grupo metoxílico em um dos anéis aromáticos, substituição semelhante ao fenilpropanóide miristicina, e

três grupos metoxila em outro anel, semelhante aos fenilpropanóides elemicina e isoelemicina. A configuração do anel tetraidrofurânico da lignana **2** é *trans* (7-8), *trans* (8-8') e *cis* (8'-9'), semelhante a da lignana (+)-veraguensina (BARATA et al., 1978) (figura 4.18).

Figura 4.18. (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-Metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana.

Figura 4.19: Espectro de massas da lignana **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Tabela 4.2 - Dados (δ) do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 da lignana **2** isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum* comparados à literatura.

Posição	^1H , δ lignana 2 *	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-metilenodióxi- 3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epóxi-lignana (MARTINS et al., 2000)
1	-	-
2	6,70 <i>d</i> (2,8)	6,73 <i>d</i> (2,2)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,70 <i>d</i> (2,8)	6,73 <i>d</i> (2,2)
7	4,38 <i>d</i> (9,7)	4,38 <i>d</i> (6,6)
8	1,68 <i>m</i>	1,78 <i>m</i>
9	1,06 <i>d</i> (6,8)	1,07 <i>d</i> (6,6)
1'	-	-
2'	6,55 <i>d</i> (2,6)	6,55 <i>d</i> (2,1)
3'	-	-
4'	-	-
5'	-	-
6'	6,60 <i>d</i> (2,6)	6,60 <i>d</i> (2,1)
7'	5,09 <i>d</i> (8,3)	5,08 <i>d</i> (6,6)
8'	2,25 <i>m</i>	2,23 <i>m</i>
9'	0,68 <i>d</i> (6,6)	0,69 <i>d</i> (6,9)
O ₂ CH ₂	5,96 <i>s</i>	5,91 <i>s</i>
MeO-3	3,88 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>
MeO-4	3,85 <i>s</i>	3,84 <i>s</i>
MeO-5	3,88 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>
MeO-3'	3,92 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); *s* = singlete; *d* = dublete; *m* = multiplete.

Figura 4.20: Espectro de RMN de ^1H (200MHz; CDCl_3) da lignana **2** em mistura, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.8. Lignana **3**: (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana

A lignana **3** foi obtida a partir de purificação por CCDP da fração 5-7 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*). Trata-se de um isômero da lignana **2** que possui a mesma configuração do anel tetraidrofurânico da grandisina, ou seja, toda *trans*. O íon molecular em $\text{M}^+ = 416$ Da corresponde à fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$.

O composto foi identificado por comparação dos dados obtidos por CG-EM (figura 4.22) e por RMN de ^1H (figura 4.23) com os dados da literatura (tabela 4.3)

(MARTINS et al., 2003), recebendo a seguinte nomenclatura: (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana (figura 4.21).

Figura 4.21. (7*R*, 8*R*, 7'*R*, 8'*R*)-3',4'-Metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana.

Figura 4.22. Espectro de massas da lignana **3**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Tabela 4.3 - Dados (δ) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) em CDCl_3 da lignana **3**, isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, comparados à literatura.

Posição	^1H , δ lignana 3 *	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3',4'-metilenodióxi- 3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana (MARTINS et al., 2003)
1	-	-
2	6,61 s	6,54 s
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,61 s	6,54 s
7	4,62 <i>d</i> (7,9)	4,52 <i>d</i> (7,2)
8	1,77 <i>m</i>	1,67 <i>m</i>
9	1,06 <i>d</i> (4,0)	0,96 <i>d</i> (4,5)
1'	-	-
2'	6,59 s	6,52 s
3'	-	-
4'	-	-
5'	-	-
6'	6,59 s	6,52 s
7'	4,62 <i>d</i> (7,9)	4,52 <i>d</i> (7,2)
8'	1,77 <i>m</i>	1,67 <i>m</i>
9'	1,06 <i>d</i> (4,0)	0,96 <i>d</i> (4,5)
O ₂ CH ₂	5,96 s	5,87 s
MeO-3	3,88 s	3,80 s
MeO-4	3,83 s	3,76 s
MeO-5	3,88 s	3,80 s
MeO-3'	3,92 s	3,84 s

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); s = singlete; *d* = dublete; *m* = multiplete.

Figura 4.23. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3) da lignana **3**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.9. Lignana **4**: (7*R*, 8*R*, 7'*R*, 8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana

A lignana **4** foi obtida a partir de purificação por CCDP da fração 5-7 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*). Trata-se de outra lignana tetraidrofurânica com um grupo metilenodioxílico e um grupo metoxílico em cada anel. A configuração do anel tetraidrofurânico é toda *trans*, análoga às lignanas **1** (grandisina) e **3** [(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana)] (figura 4.24).

O íon molecular $[\text{M}^+]$ 416 Da corresponde à fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$.

A identificação se deu por comparação dos dados de RMN de ^1H (figura 4.24) com os valores encontrados na literatura (tabela 4.4) (MARTINS et al., 2003), recebendo a seguinte nomenclatura: (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana.

Figura 4.24. (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-Dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana.

Tabela 4.4 - Dados (δ) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) em CDCl_3 da lignana **4**, isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, comparados à literatura.

Posição	^1H , δ lignana 4 *	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi- 5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana (MARTINS et al., 2003)
1 e 1'	-	-
2 e 2'	6,58 s	6,51 s
3 e 3'	-	-
4 e 4'	-	-
5 e 5'	-	-
6 e 6'	6,58 s	6,51 s
7 e 7'	4,58 d (8,8)	4,50 d (9,0)
8 e 8'	1,72 m	1,68 m
9 e 9'	1,04 d (5,3)	0,96 d (6,3)
O_2CH_2	5,96 s	5,88 s
MeO	3,92 s	3,85 s

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); s = singlete; d = dublete; m = multiplete.

Figura 4.25: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3) da lignana **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.10. Lignana **5**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana

A lignana **5** foi obtida a partir de purificação por CCDP das frações 8-9 e 10-11 da coluna B (a partir da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*) em mistura com a (-)-grandisina. Em cromatograma de CLAE pode-se observar a estreita semelhança de R_f entre as duas substâncias (figura 4.26).

Figura 4.26. Detalhe do cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência da (-)-grandisina pura (vermelho) com a mistura de lignana **5** com (-)-grandisina, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum* (preto).

A identificação estrutural foi obtida por comparação dos dados espectroscópicos da lignana **5** com a literatura (RAMOS, 2006). Foi obtido o espectro de massas (figura 4.28), bem como os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras 4.29 e 4.30; tabela 4.5).

A lignana **5**, (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana, é uma lignana tetraidrofurânica com íon molecular $[\text{M}^+]$ 432 Da, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$, sendo, portanto, um isômero da (-)-grandisina. Apresenta a configuração do anel tetraidrofurânico *trans* (C7/C8), *trans* (C8/C8') e *cis* (C8'/C7') (figura 4.27) semelhante à lignana **2** e à (+)-veraguensina (BARATA et al., 1978).

Figura 4.27. (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-Hexametóxi-7,7'-epoxilignana.

Figura 4.28. Espectro de massas da lignana **5**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Tabela 4.5 - Dados (δ) dos espectros de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) em CDCl_3 da lignana **5** isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum* comparados à literatura.

Posição	^1H , δ lignana 5 *	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)- 3,4,5,3',4',5'-hexametóxi- 7,7'-epoxilignana (RAMOS, 2006)	^{13}C , δ lignana 5	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>R</i>)- 3,4,5,3',4',5'-hexametóxi- 7,7'-epoxilignana (RAMOS, 2006)
1	-	-	136,7	137,8
2	6,63 s	6,66 s	104,0	103,5
3	-	-	153,2	153,2
4	-	-	138,0	137,9
5	-	-	153,2	153,2
6	6,63 s	6,66 s	104,0	103,5
7	5,12 d (8,3)	5,13 d (6,7)	87,3	87,4
8	2,29 m	2,71 m	47,7	44,2
9	1,13 d (6,1)	0,85 d (6,7)	14,8	13,1
1'	-	-	136,7	136,8
2'	6,56 s	6,66 s	103,4	103,5
3'	-	-	152,9	153,0
4'	-	-	136,6	136,2
5'	-	-	152,9	153,0
6'	6,56 s	6,66 s	103,4	103,5
7'	4,43 d (9,2)	4,53 d (6,7)	83,2	82,9
8'	1,69 m	2,34 m	46,0	41,5
9'	0,70 d (7,0)	0,64 d (6,7)	13,9	11,6
MeO-3	3,84 s	3,87 s	56,1	56,0
MeO-4	3,89 s	3,95 s	60,8	60,9
MeO-5	3,84 s	3,87 s	56,1	56,0
MeO-3'	3,86 s	3,87 s	56,0	56,0
MeO-4'	3,89 s	3,95 s	60,8	60,9
MeO-5'	3,86 s	3,87 s	56,0	56,0

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); s = singleto; d = dubleto; m = multipeto.

4.1.1.11. Aristolactama 2: Cefaranona B

A aristolactama **2** foi isolada a partir da fração 19-24 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) somada à fração 14-15 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*), na forma de cristais amarelados em forma de agulhas. A massa obtida após as purificações em CCDP foi cerca de 6 mg.

Em solução, apresentou forte fluorescência de coloração azul intensa quando irradiada por lâmpadas UV (254 nm e 365 nm) (figura 4.31).

Figura 4.31. Fluorescência da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, sob irradiação de luz UV ($\lambda = 365$ nm).

Devido às características observadas, a amostra foi submetida para análise por um fluorímetro na qual foi obtida a curva de fluorescência da substância (figura 4.32), que apresentou um comprimento de onda máximo correspondente a excitação ($\lambda_{\text{máx}} = 390$ nm) e outro correspondente a emissão ($\lambda_{\text{máx}} = 470$ nm).

Figura 4.32. Curvas de fluorescência da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

A aristolactama **2** foi identificada como cefaranona B (Figura 4.33), por comparação dos dados de CG-EM e RMN de ^1H e de ^{13}C com a literatura (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 1999; DESAI; PRABHU; MULCHANDANI, 1988; MIX; GUINAUDEAU; SHAMMA, 1982). A cefaranona B apresentou íon molecular de 279 Da, correspondente a fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (figura 4.34).

Através da análise por RMN de ^1H (figuras 4.35 a 4.37), pode-se observar sinais referentes hidrogênios aromáticos e a duas metoxilas altamente desprotegidas (tabela 4.6) que foram confirmadas através dos espectros de RMN de ^{13}C (figura 4.38).

Figura 4.33. Cefaranona B.

Figura 4.34. Espectro de massas da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Tabela 4.6 - Dados (δ) dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 da aristolactama **2**, isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, comparados à literatura.

Posição	^1H , δ aristolactama 2 * (CDCl_3)	cefaranona B (DESAI et al., 1988) ($\text{DMSO}-d_6$)	^{13}C , δ aristolactama 2 (CDCl_3)	cefaranona B (ARAÚJO-JUNIOR et al., 1999) (piridina- d_5)
1	-	-	124,4	125,6
2	7,75 s	7,88 s	112,1	110,8
3	-	-	154,5	155,5
4	-	-	151,7	152,2
4a	-	-	127,0	127,8
4b	-	-	116,2	121,7
5	9,18 dd (2; 5)	9,13 d	127,6	128,4
6	7,50-7,52 m	7,59 m	121,0	126,2
7	7,50-7,52 m	7,59 m	126,0	128,3
8	7,74 dd (2; 5)	7,98 d	129,0	129,8
8a	-	-	133,9	136,5
9	7,02 s	7,16 s	104,9	105,6
10	-	-	134,7	137,1
MeO-3	4,01 s	4,05 s	56,9	57,4
MeO-4	4,06 s	4,06 s	60,4	60,7
N-H	8,01 s	10,87 s	-	-
C=O	-	-	170,7	170,3

* δ_{H} multiplicidade (J em Hz); s = singleto; d = dubleto; dd = duplo dubleto; m = multipeto.

Figura 4.35. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.36. Detalhe do espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.37. Detalhe do espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.38. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) da aristolactama **2**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.12. Aristolactama 4: Piperolactama C

A aristolactama **4** foi isolada a partir da fração 19-24 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) somada à fração 10-11 da coluna B (coluna purificante da fração clorofórmica de raízes de *P. solmsianum*). A massa obtida, ainda com algumas impurezas, foi de 10 mg. A aparência é semelhante à da cefaranona B (cristais amarelados em forma de agulhas em estado sólido) e, em solução, o composto apresenta uma forte fluorescência de coloração azul intensa quando irradiada por lâmpadas UV (254 nm e 365 nm) (figura 4.39).

Figura 4.39. Fluorescência da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, sob irradiação de luz UV ($\lambda = 365$ nm).

A aristolactama **4** foi também submetida à análise por fluorímetro e foi então obtida a curva de fluorescência da substância que apresentou um comprimento de onda máximo correspondente a excitação ($\lambda_{\text{máx}} = 390$ nm) e outro correspondente a emissão ($\lambda_{\text{máx}} = 465$ nm) (figura 4.40).

Figura 4.40. Curvas de fluorescência da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

A aristolactama **4** foi identificada como piperolactama C por comparação dos dados de CG-EM e RMN de ^1H e de ^{13}C com a literatura (DANELUTTE et al., 2005; DANELUTTE, 2001; OLSEN et al., 1993). A estrutura possui a fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$, correspondente a uma massa de 309 Da, e está representada na figura 4.41.

Figura 4.41. Piperolactama C.

O espectro de massas em alta resolução, obtido por infusão direta, indicou íon molecular em 310,1075 Da (figura 4.42), enquanto que o espectro de massas de

baixa resolução, proveniente da análise por CG-EM confirmou esse íon e indicou outros resultantes da fragmentação (figura 4.43).

Figura 4.42. Espectro de massas de alta resolução da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum* (acima) e detalhe do pico principal (abaixo) obtido por infusão direta.

Figura 4.43. Espectro de massas da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, obtido por impacto eletrônico (70 eV).

Através da análise por RMN de ^1H (figuras 4.44 a 4.46), observou-se sinais referentes a hidrogênios aromáticos e a três metoxilas altamente desprotegidas. O espectro de RMN de ^{13}C confirmou sua estrutura (tabela 4.7; figura 4.47).

Tabela 4.7 - Dados (δ) dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 da aristolactama **4**, isolada de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*, comparados à literatura.

Posição	^1H , δ aristolactama 4 *	piperolactama C (DANELUTTE et al., 2005)	^{13}C , δ aristolactama 4	piperolactama C (DANELUTTE et al., 2005)
1	-	-	167,8	167,2
2	-	-	157,4	157,3
3	-	-	153,0	154,3
4	-	-	146,3	146,4
4a	-	-	116,4	116,5
4b	-	-	126,6	126,6
5	9,13 <i>dd</i> (2; 8)	9,19 <i>m</i>	126,6	126,6
6	7,46-7,49 <i>m</i>	7,52-7,58 <i>m</i>	125,9	125,9
7	7,46-7,49 <i>m</i>	7,52-7,58 <i>m</i>	126,8	126,8
8	7,76 <i>dd</i> (3; 7)	7,82 <i>m</i>	128,8	128,7
8a	-	-	133,2	133,3
9	7,13 <i>s</i>	7,18 <i>s</i>	106,4	106,1
10	-	-	133,3	n.o.
11	-	-	167,4	n.o.
MeO-2	4,45 <i>s</i>	4,52 <i>s</i>	63,0	63,0
MeO-3	3,93 <i>s</i>	4,00 <i>s</i>	60,9	60,9
MeO-4	4,13 <i>s</i>	4,20 <i>s</i>	61,6	61,6
N-H	8,22 <i>s</i>	-	-	-
C=O	-	-	177,4	n.o.

* δ_{H} multiplicidade (*J* em Hz); *s* = singlete; *d* = dublete; *dd* = duplo dublete; *m* = multiplete. n.o.: não observado.

Figura 4.44. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.45. Detalhe do espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.46. Detalhe do espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

Figura 4.47. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) da aristolactama **4**, isolada das raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*.

4.1.1.13. Campesterol

O campesterol ($C_{28}H_{48}O$, $M^+ = 400$ Da) foi identificado a partir das frações 25 e 26 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*). A identificação se deu por comparação dos dados obtidos por CG-EM com a literatura (figura 4.49) (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL-RÍO, 2008).

Trata-se de um esteróide muito comum em plantas e sua estrutura está representada na figura 4.48.

Figura 4.48. Campesterol.

Figura 4.49. Espectro de massas do campesterol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.14. Sitosterol

O sitosterol ($C_{29}H_{50}O$, $M^+ = 414$ Da) (figura 4.50) foi identificado a partir das frações 25 e 26 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*). A identificação se deu por comparação dos dados obtidos por CG-EM com a literatura (figura 4.51) (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL-RÍO, 2008).

Figura 4.50. Sitosterol.

Figura 4.51. Espectro de massas do sitosterol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.15. Tremulona

A tremulona, ou 3,5-stigmastadien-7-ona (figura 4.52), é uma cetona esteroidal, possui íon molecular com massa $[M]^+$ 410 Da, que corresponde à fórmula estrutural $C_{29}H_{46}O$. Foi identificada a partir das frações 25 e 26 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) por comparação dos dados obtidos por CG-EM com a literatura (figura 4.53) (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL-RÍO, 2008).

Figura 4.52. Tremulona.

Figura 4.53. Espectro de massas da tremulona obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.16. 5 α -3,6-Estigmastadiona

A 5- α -3,6-estigmastadiona é outra cetona esteroidal, possui 2 grupos cetônicos e massa de 428 Da, que corresponde à fórmula estrutural C₂₉H₄₈O₂. Foi identificada a partir das frações 25 e 26 da coluna A (coluna filtrante do extrato bruto diclorometânico de raízes de *P. solmsianum*) por comparação dos dados obtidos por CG-EM (figura 4.55) com a literatura (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL-RÍO, 2008). A estrutura da 5- α -3,6-estigmastadiona está representada na figura 4.54.

Figura 4.54. 5- α -3,6-Estigmastadiona.

Figura 4.8. Espectro de massas da 5- α -3,6-estigmastadiona obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.1.1.17. Perfil cromatográfico dos metabólitos identificados

Foi delineado o perfil cromatográfico do extrato bruto de acetato de etila de raízes de *P. solmsianum* por CLAE por meio da comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas.

As substâncias presentes no extrato que puderam ser identificadas (fenilpropanóides, lignanas e alcanoides), estão assinaladas na figura 4.56.

Figura 4.56. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto de raízes de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. **1:** elemicina, **2:** isoelemicina, **3:** (-)-grandisina, **4:** (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana, **5:** apiol, **6:** dilapiol, **7:** miristicina, **8:** cefaranona B, **9:** piperolactama C, **10:** (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana e (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana e **11:** (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana.

Além das 16 substâncias identificadas, foi também observada a presença de ácidos graxos, entre eles, palmítico (C₁₆H₃₂O₂), oléico (C₁₈H₃₄O₂) e linoléico (C₁₈H₃₂O₂) no extrato bruto das raízes.

4.1.2. Metabólitos secundários de caules

A análise cromatográfica (CLAE) do extrato bruto de acetato de etila proveniente de caules de plantas adultas de *P. solmsianum* e comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas permitiram a identificação da elemicina, isoelemicina e (-)-grandisina (lignana **1**). Esteróides e ácidos graxos também foram encontrados, porém em quantidade bem menos expressivas.

O perfil cromatográfico apresentou 3 picos intensos, sendo que um deles não foi identificado (figura 4.57).

Figura 4.57. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto de caules de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. **1**: (-) - grandisina, **2**: elemicina, **3**: isoelemicina.

4.1.3. Metabólitos secundários de folhas

A análise cromatográfica (CLAE) do extrato bruto de acetato de etila proveniente de folhas de plantas adultas de *P. solmsianum* e comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas permitiram a identificação da lignana **1** [(-)-grandisina], lignana **5** [(7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana], lignana **2** [(7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana], lignana **3** [(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana], elemicina e isoelemicina (figura 4.58). Esteróides e ácidos graxos também foram encontrados.

Figura 4.58: Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto de folhas de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. **1**: (-)-grandisina, **2**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana, **3**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana e (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana, **4**: elemicina e isoelemicina.

4.1.4. Metabólitos secundários de inflorescências

A análise cromatográfica (CLAE) do extrato bruto de acetato de etila proveniente de inflorescências de plantas adultas de *P. solmsianum* e comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas permitiram observar a presença maciça da lignana **1** [(-)-grandisina] e de seu isômero, a lignana **5** [(7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana] (figura 4.59). Em quantidades bem inferiores estão lignana **2** [(7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana], lignana **3** [(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana], lignana **4** [(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana], campesterol, sitosterol e alguns fenilpropanóides, como miristicina, elemicina e isoelemicina.

Figura 4.59: Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto de inflorescências de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm.
1: (-)-grandisina, **2:** (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epóxi-lignana.

4.1.5. Metabólitos secundários de sementes

A análise cromatográfica (CLAE) do extrato bruto de acetato de etila proveniente de sementes de *P. solmsianum* e comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas permitiram identificar a lignana **1** [(-)-grandisina] e a lignana **2** [7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana] (figura 4.60).

O extrato apresentou um perfil mais diversificado em relação aos outros órgãos aéreos da planta, embora prevaleçam ácidos graxos.

Figura 4.60. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto de sementes de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. **1**: (-)-grandisina, **2**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana.

4.1.6. Estudo comparativo dos órgãos

Todos os órgãos apresentaram o acúmulo de (-)-grandisina, além de esteróides e ácidos graxos. Pode-se observar as semelhanças qualitativas em relação à composição química dos extratos obtidos (figura 4.61). Além disso, o estudo comparativo dos órgãos evidenciou que as raízes apresentam maior complexidade fitoquímica em relação aos demais órgãos.

Figura 4.61. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos diversos órgãos de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. Lignana **2**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana; lignana **3**: (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana e lignana **5**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana.

Uma outra análise por CLAE dos extratos dos diferentes órgãos com detecção por fluorescência (figura 4.62) revelou que a aristolactama **2** ou cefaranona B e a aristolactama **4** ou piperolactama C estão presentes em todos os órgãos das plantas adultas, variando-se as concentrações.

Figura 4.62. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos diversos órgãos de plantas adultas de *Piper solmsianum*. Detector de fluorescência: $\lambda_{\text{ex.}} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em.}} = 470 \text{ nm}$.

4.2. Plântulas

4.2.1. Metabólitos secundários

Os extratos (DCM/MeOH) de órgãos de plântulas (raízes, caules e folhas) *in vivo* apresentaram concentrações muito inferiores de metabólitos secundários comparativamente aos respectivos extratos obtidos de plantas adultas, evidenciando o acúmulo de esteróides e outros compostos majoritários do metabolismo primário, tais como ácidos graxos.

A partir das análises cromatográficas e comparação dos tempos de retenção das substâncias previamente isoladas foram identificadas 16 substâncias em raízes de plântulas: campesterol, sitosterol, tremulona, 3,6-estigmastadiona, miristicina, elemicina, isoelemicina, apiol, dilapiol, lignana **1** ou (-)-grandisina, lignana **2** ou (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana, lignana **3** ou (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodióxi-3,4,5,5'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana, lignana **4** ou (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-5,5'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana, lignana **5** ou (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana, aristolactama **2** ou cefaranona B e aristolactama **4** ou piperolactama C.

Além disso, a análise cromatográfica (CLAE) dos extratos de plântulas de *P. solmsianum* *in vivo* permitiu observar que o perfil do metabolismo secundário de raízes de plântulas é muito semelhante ao encontrado em raízes adultas, enquanto que os perfis das partes aéreas apresentam menor complexidade.

Nos caules foi evidenciada a presença apenas de apiol e dilapiol e nas folhas foram identificadas, além desses fenilpropanóides, grandes quantidades de fitol, de farnesol e de α -tocoferol.

4.2.1.1. α -Tocoferol

Encontrado em folhas de plântulas *in vivo* de *P. solmsianum*, o α -tocoferol, é um composto que pertence ao grupo dos tocoferóis, uma classe de vitaminas lipossolúveis conhecida como vitamina E. A vitamina E é conhecida por sua atividade antioxidante em sistemas biológicos, sendo o α -tocoferol o possuidor da mais alta atividade. Também é utilizada como conservante de alimentos. Os tocoferóis são grandemente distribuídos em plantas, tais como trigo, cevada e centeio. Uma fonte natural rica em α -tocoferol é o óleo de girassol (DEWICK, 1997).

A estrutura desta substância (figura 4.63), de fórmula $C_{29}H_{50}O_2$ ($M^+ = 430$ Da), foi identificada através da comparação de seu espectro de massas (figura 4.64), obtido por CG-EM, com a biblioteca do banco de dados (SCIFINDER, 2008).

Figura 4.63. α -Tocoferol.

Figura 4.64. Espectro de massas do α -tocoferol obtido por impacto eletrônico (70 eV).

4.2.2. Estudo comparativo dos órgãos

Todos os órgãos apresentaram o acúmulo de apiol e dilapiol, além de esteróides e ácidos graxos. Pode-se observar a diferença qualitativa em relação à composição dos extratos obtidos no cromatograma representado na figura 4.65, evidenciando a maior complexidade fitoquímica das raízes em relação aos demais órgãos.

A análise dos extratos por CLAE acoplado ao detector de fluorescência (figura 4.66), revelou que a aristolactama **2** (cefaranona B) e a aristolactama **4** (piperolactama C) estão presentes em todos os órgãos das plântulas, com concentrações variáveis.

Figura 4.65. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos dos órgãos de plântulas *in vivo* de *Piper solmsianum*: raízes, caules e folhas. Detector UV-Vis: 254 nm.

Figura 4.66. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos dos órgãos de plântulas *in vivo* de *Piper solmsianum*: raízes, caules e folhas. Detector de fluorescência: $\lambda_{ex} = 360$ nm e $\lambda_{em} = 470$ nm.

4.2.3. Estudo comparativo por tamanho

Os extratos de raízes, caules e folhas de plântulas separadas por tamanho foram comparados em relação à diversidade dos metabólitos encontrados (figuras 4.67 a 4.69). Não foi observada uma variação qualitativa muito significativa para entre os diferentes tamanhos.

Martins (2002), em sua tese de doutorado, menciona que a mudança de metabolismo de plântula para planta adulta ocorria em um período de cerca de nove meses de idade, porém, para esse experimento realizado não foi observada essa mudança de metabolismo.

Figura 4.67. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos de raízes de plântulas *in vivo* de *Piper solmsianum* separadas por tamanho. Detector UV-Vis: 254 nm.

Figura 4.68. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos de caules de plântulas *in vivo* de *Piper solmsianum* separada por tamanho. Detector UV-Vis: 254 nm.

Figura 4.69. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos de folhas de plântulas *in vivo* de *Piper solmsianum* separada por tamanho. Detector UV-Vis: 254 nm.

4.2.4. Estudo *in vitro*

Um estudo acerca do estabelecimento, micropropagação e acúmulo de metabólitos secundários presentes nos diversos órgãos de plântulas de *P. solmsianum* cultivadas *in vitro* foi anteriormente realizado (BALBUENA, 2006). Foram detectados em extratos de folhas e de caules a presença majoritária de dois fenilpropanóides tetraoxigenados, o apiol e o dilapiol.

No presente trabalho, o extrato de raízes de plântulas *in vitro* de *P. solmsianum* revelou a presença de elemicina, isoelemicina, miristicina, apiol, dilapiol, lignana **1** ou (-)-grandisina e lignana **5** ou (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana, além de esteróides e ácidos graxos. O cromatograma CLAE encontra-se na figura 4.70. Em relação às plântulas *in vivo*, o estudo de raízes *in vitro* evidenciou menor diversidade de metabólitos secundários.

Figura 4.70. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato de raízes de plântulas *in vitro* de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm. Lignana **5**: (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4,5,3',4',5'-hexametóxi-7,7'-epoxilignana.

4.3. Cultura de células

Os extratos (DCM/MeOH) obtidos das células em dois métodos de secagem (estufa e liofilizador) e o extrato clorofórmico obtido do meio de cultura de suspensões celulares de *P. solmsianum* foram submetidos à análises por CLAE, CG-EM e RMN que indicaram prevalência de ácidos graxos e esteróides em todos os extratos de suspensões celulares, especialmente naqueles obtidos de células (estufa e liofilizador). O extrato obtido do meio de cultura apresentou como componente majoritário o ácido salicílico (figura 4.71).

Figura 4.71. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos de suspensões celulares (meio de cultura, células secas em estufa, células secas em liofilizador) de *Piper solmsianum*. Detector UV-Vis: 254 nm.

4.3.1. Ácido salicílico

O ácido salicílico foi a principal substância isolada do extrato bruto clorofórmico obtido do meio de cultura das suspensões celulares de *P. solmsianum*. Trata-se de um ácido benzóico que possui uma hidroxila no anel em posição *orto*. A massa é de 138 Da, correspondendo à fórmula $C_7H_6O_3$ (figura 4.72).

Figura 4.72. Ácido salicílico.

A identificação se deu por comparação com os dados obtidos por RMN de 1H (figura 4.73) e de ^{13}C (figura 4.74) com os valores descritos em bancos de dados (NIST e WWS) (SCIFINDER, 2008).

Trata-se de uma substância derivada da salicina, presente na casca do tronco do salgueiro, *Salix alba*, que era conhecida desde 400 a.C. devido a sua atividade analgésica. A salicina foi isolada em 1827 e a síntese do ácido acetil-salicílico em 1897 gerou a aspirina (uma análogo mais potente), que foi o primeiro fármaco a ser sintetizado na história da farmácia (DEWICK, 1997; MANN, 1987).

Nas plantas, o ácido salicílico desempenha um interessante papel de sinalização e defesa, podendo funcionar como um eliciador para a produção de metabólitos da via do chiquimato, com foi comprovado em trabalhos com salsa, *Petroselinum crispum* (THULKE; CONRATH, 1998).

Figura 4.73. Espectro RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3) do ácido salicílico.

Figura 4.74. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz; CDCl_3) do ácido salicílico.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico com diferentes órgãos de *Piper solmsianum* foi realizado através de análises cromatográficas e também através de isolamentos e identificações estruturais, cujos resultados podem ser resumidos como se seguem:

- Dos órgãos estudados, as raízes apresentaram a maior complexidade e diversidade química da planta, abrangendo ácidos benzóicos e benzaldeídos substituídos, esteróides, fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas, enquanto que os outros órgãos, tais como folhas, caules e inflorescências acumulam principalmente lignanas tetraidrofurânicas e fenilpropanóides;
- As alcanidas estão presentes em todos os órgãos, embora suas concentrações em outras partes, excetuando-se raízes, sejam ínfimas; no entanto, através da metodologia desenvolvida, espera-se determinar a presença de outras alcanidas em extratos de espécies de Piperaceae;
- As raízes de plântulas (tanto *in vivo* quanto *in vitro*) apresentaram semelhança qualitativa de metabólitos quando comparadas às raízes de plantas adultas. No entanto, as partes aéreas de plântulas apresentaram um diferente acúmulo de metabólitos secundários, incluindo compostos como farnesol, fitol e α -tocoferol, que sugerem que nessa fase de desenvolvimento está voltada para o metabolismo primário, ou seja, para o crescimento do vegetal;

- As suspensões celulares não produzem ou não acumulam fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas, mas demonstraram acumular ácido salicílico, que poderia ser associado à defesa da planta;
- A maior parte do metabolismo secundário da planta está voltada para a produção de produtos naturais provenientes da via do chiquimato.

Espera-se com este trabalho contribuir para o conhecimento de *P. solmsianum*, espécie nativa muito presente na Mata Atlântica brasileira e ainda, despertar o interesse sobre a fitoquímica de uma planta com inúmeras atividades biológicas.

Outro aspecto de grande importância é o estudo da compreensão dos fatores que contribuem para a diversidade molecular e, nesse sentido, o estudo dos metabólitos secundários em diferentes idades, diferentes órgãos e diferentes condições de cultivo para a mesma planta constitui-se num ponto de partida para um melhor entendimento dessa variabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J.H., **Variações diárias, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum***. São Paulo, 2008. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CHAVES, M.C.O.; DA-CUNHA, E.V.L.; GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 325-327, 1999.

ARLT, V.M.; STIBOROVA, M.; SCHMEISER, H.H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. **Mutagenesis**, v. 17, p. 265-277, 2002.

BALACHANDRAN, P.; WEI, F.; LIN, R.; KHAN, I.A.; PASCO, D.S. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells. **Kidney International**, v. 67, p. 1797-1805, 2005.

BALBUENA, T.S. **Aspectos morfogenéticos e metabólitos secundários em *Piper solmsianum* e *Piper aduncum***. São Paulo, 2006. 99p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.

BARATA, L.E.S.; BAKER, P.M.; GOTTLIEB, O.R.; RÙVEDA, E.A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 783-786, 1978.

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

BERNARDES, L.S.C.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Síntesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7075-7082, 2006.

BRISKIN, D.P.; KOBAYASHI, H.; LILA, M.A.; GAWIENOWSKI, M. Kava (*Piper methysticum*): growth in tissue culture and *in vitro* production of kavapyrones. In: DYER, L.A.; PALMER, A.D.N., orgs. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p. 140-155.

CABRAL, M.M.O.; Alencar, A.A.; GUIMARÃES, A.E.; KATO, M.J. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, 2009.

CABRAL, M.M.O.; MENDONÇA, P.M.; GOMES, C.M.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; QUEIROZ, M.M.C.; MELLO, R.P. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 20-24, 2007.

CAMPOS, M.P.; CECHINEL FILHO, V.; SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CRUZ, R.C.B.; CRUZ, A.B. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1527-1530, 2005.

CARDOZO-JÚNIOR, E.L.; CHAVES, M.C.O. Caldensin, a new natural *N*-methyalaristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 216-218, 2003.

CHEN, Y.C.; CHEN, J.J.; CHANG, Y.L.; TENG, C.M.; LIN, W.Y.; WU, C.C.; CHEN, I.S. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta Medica**, v. 70, p. 174-177, 2004.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R., eds. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DANELUTTE, A.P.; CONSTANTIN, M.B.; DELGADO, G.E.; BRAZ-FILHO, R.; KATO, M.J. Divergente of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1425-1430, 2005.

DANELUTTE, A.P. **Estudo do metabolismo secundário em *Piper crassinervium***. São Paulo, 2001. 99p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

DESAI, S.J.; CHATURVEDI, R.; MULCHANDANI, N.B. Piperolactam D, a new aristolactam from indian *Piper* species. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 496-497, 1990.

DESAI, S.J.; PRABHU, B.R.; MULCHANDANI, N.B. Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1511-1515, 1988.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester; New York: John Wiley & Sons, 1997. 466 p.

DYER, L.A.; RICHARDS, J.; DODSON, C.D. Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. In: DYER, L.A.; PALMER, A.D.N., orgs. ***Piper*: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p. 117-139.

ENRIQUEZ, R.G.; CHÁVEZ, M.A.; JÁUREGUI, F. Propenylbenzenes from *Guatteria gaumeri*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2024-2025, 1980.

FLEMING, T.H. Dispersal ecology of neotropical *Piper* shrubs and treelets. In: DYER, L.A.; PALMER, A.D.N., orgs. ***Piper*: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p. 58-77.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Marise Maleck de Oliveira Cabral, Jerônimo Augusto Fonseca Alencar, Margareth Maria de Carvalho Queiroz, Anthony Érico Guimarães, Rubens Pinto de Mello, Massuo Jorge Kato. **Uso de lignana tetraidrofurânica grandisina como inseticida, composições inseticidas contendo a mesma e método inseticida**. BR n. PI 0604786-6, 01 julho 2008.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B.; PAGOTTO, C.L.A.C.; ZOCHER, D.H.T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 3, p. 97-102, 1998.

GREIG, N. Introduction. In: DYER, L.A.; PALMER, A.D.N., orgs. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2004. p. 1-4.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.

HOLLOWAY, D.; SCHEINMANN, F. Two lignans from *Litsea grandis* and *L. gracilipes*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1233-1236, 1974.

ISHIKAWA, T. **Estudo fitoquímico e biológico do cambucá – *Plinia edulis* (Vell.) Sobral – Myrtaceae**. São Paulo, 2008. 205 p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciencias Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

JENSEN, S.; HANSEN, J.; BOLL, P.M. Lignans and neolignans from Piperaceae. **Phytochemistry**, v. 33, p. 523-530, 1993.

KATO, M.J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, p. 529-538, 2007.

KONISHI, T.; KONOSHIMA, T.; DAIKONYA, A.; KITANAKA, S. Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 121-124, 2005.

KOUL, J.L.; KOUL, S.K.; TANEJA, S.C.; DHAR, K.L. Oxygenated cyclohexanes from *Piper cubeb*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1097-1099, 1996.

KUMAR, V.; POONAM; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activity. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 563-583, 2003.

LOBO, A.M. **Biossíntese de produtos naturais – metabolismo secundário**. Lisboa: Instituto Superior Técnico, 1976. 201 p.

LOPES N.P.; BLUMENTHAL, E.E.A.; CAVALHEIRO, A.J.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1089-1092, 1996.

LOPES, N.P. **Metabólitos secundários de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (Myristicaceae)**. São Paulo, 1997. 134 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

LOPES, N.P.; CHICARO, P.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Phenylpropanoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, p. 667-669, 1998.

LOPES, N.P.; YOSHIDA, M.; KATO, M.J. Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 40, p. 53-57, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

LORENZI, H.; MELLO FILHO, L. E. **As plantas tropicais de R. Burle Marx**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 488 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1088 p.

MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, H.; PISUTJAROENPONG, S.; ENGPRASERT, S.; CHUMSRI, P.; TENGCHASRI, T.; SIRISINHA, S.; PICHIA, P. Biodiversity and natural product drug discovery. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 2065-2072, 1998.

MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 92 p.

MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2.ed. Oxford: Oxford Science Publication, 1987. 374 p.

MARTINS, R.C.; LATORRE, L.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 843-846, 2000.

MARTINS, R.C.C., **Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae)**. São Paulo, 2002. 146 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

MARTINS, R.C.C.; LAGO, J.H.G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M.J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

MELLO, M.A.R.; SCHITTINI, G.M.; SELIG, P.; BERGALLO, H.G. Seasonal variation in the diet of the bat *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest area in southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 68, p. 49-55, 2004.

MIX, D.B.; GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M. The aristolochic acids and aristolactams. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 657-666, 1982.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Essential oil analysis of two *Piper* species (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 70, p. 751-754, 1998.

MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F. Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmácia** v. 76, p. 106-109, 1995.

MOREIRA, D.L.; SOUZA, P.O.; KAPLAN, M.A.C.; PEREIRA, N.A.; CARDOSO, G.L.; GUIMARÃES, E.F. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, p. 33-37, 2001.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NALINA, T.; RAHIM, Z.H.A. The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, p. 10-15, 2007.

NIHEI, K.; KONNO, K.; BERNADES, L.S.C.; LOPES, N.P.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; MARTINS, R.C.C.; KATO, M.J. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. **ARKIVOC**, v. 6, p. 112-126, 2004.

OLSEN, C.E.; TYAGI, O.D.; BOLL, P.M.; HUSSAINI, F.A.; PARMAR, V.S.; SHARMA, N.K.; TANEJA, P.; JAIN, S.C. An aristolactama from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactama B and D. **Phytochemistry**, v. 33, p. 518-520, 1993.

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. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 4, p. 597-673, 1997.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V.K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N.K.; TYAGI, O.D.; LAWRIE, S.J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O.W.; OLSEN, C.E.; SINGH, S.K.; WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1069-1078, 1998.

PRASAD, A.K.; TYAGI, O.D.; WENGEL, J.; BOLL, P.M. Lignans and neolignans from stems of *Piper wightii*. **Tetrahedron**, v. 50, p. 10579-10586, 1994.

PRASAD, A.K.; TYAGI, O.D.; WENGEL, J.; BOLL, P.M.; OLSEN, C.E.; BISHT, K.S.; SINGH, A.; SARANGI, A.; KUMAR, R.; JAINT, S.C.; PARMAR, V.S. Neolignans and a lignam from *Piper clarkii*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 655-658, 1995.

RAMOS, C.S. **Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae**. São Paulo, 2006. 246 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

RAMOS, C.S.; VANIN, A.S.; KATO, M.J. Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in *Lepidoptera* and *Coleoptera* species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2157-2161, 2008.

RUANGRUNGSI, N.; PRATHANTURARUG, S.; LANGE, G.L.; ORGAN, M.G. An N-methyl aristolactam and an oxygenated cyclohexane derivative from *Piper ribesioides*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2397-2400, 1992.

SAAD, J.M.; SOEPADAMO, E.; FANG, X.P.; MCLAUGHLIN, J.L.; FANWICK, P.E. Grandisin from *Cryptocarya crassinervia*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1681-1683, 1991.

SILVA, A.M. **Metabólitos secundários e ligninas de espécies de *Piper***. São Paulo, 2008. Tese de doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; SHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAR, V.S.; WENGEL, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1355-1360, 1996.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

TABOPDA, T.K.; NGOUPAYO, 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. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1726-1731, 2008.

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. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta Medica**, v. 71, p. 535-542, 2005.

THULKE, O.; CONRATH, U. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence related genes in parsley. **The Plant Journal**, v. 14, p. 35-42, 1998.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Massayoshi Yoshida. **Processo de obtenção das lignanas tetraidrofuranicas veraguensina e grandisina, atividade antichagásica e seu uso como antichagásico**. BR n. PI 9903472-7, 13 agosto 1999.

VOGEL, A.I. **Química orgânica: análise orgânica qualitativa**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1988. 3v.

WILLFÖR, S.M.; SMEDS, A.I.; HOLMBOM, B.R. Chromatographic analysis of lignans. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 64-77, 2006.

YUAN, J.; LIU, Q.; ZHU, W.; DING, L.; TANG, F.; YAO, S. Simultaneous analysis of six aristolochic acids and five aristolactams in herbal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p. 85-92, 2008.

ZHANG, H.; TAMEZ, P.A.; HOANG, V.D.; TAN, G.T.; HUNG, N.V.; XUAN, L.T.; HUONG, L.M.; CUONG, N.M.; THAO, D.T.; SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M. Antimalarial compounds from *Raphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 772-777, 2001.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Bergamo Navarro.

Data de Nascimento: 05 de Maio de 1980.

Local: São Paulo (SP).

E-mail: lucasbn25@yahoo.com.br e lucasbn@iq.usp.br

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5839536551069856>

EDUCAÇÃO

Colégio: Guilherme Dumont Villares, Morumbi, 1987-1995

Colégio: Anhembi Morumbi, Brooklin, 1996-1997

Graduação: Bacharelado em Química

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1999-2004

Graduação: Licenciatura em Química

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2003-2006

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado

Agência: CNPq

Data: Agosto de 2006 - Agosto de 2008

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

- ISHIKAWA, T.; NAVARRO, L.B.; DONATINI, R.; KATO, E.T.M.; YOSHIDA, M. Gastroprotection of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae). *In*: I Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro. First Brazilian Conference on Natural Products - Abstracts, 2007.