UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

Renata Alves da Silva

**“Análise metabolômica e atividade biológica de
Piper reticulatum L.”**

Versão corrigida da dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG:

12/05/2011

Renata Alves da Silva

**“Análise metabolômica e atividade biológica
de *Piper reticulatum* L.”**

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
05/2011

***Aos meus queridos pais, Alcides
e Maria, pelo carinho, apoio e
incentivo. Não só dedico
como divido a conquista
deste trabalho.***

Agradecimentos

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

Ao Prof. Massuo Jorge Kato, pela oportunidade, apoio, orientação e pela amizade.

À FAPESP, pelos recursos financeiros e concessão de bolsa.

Aos meus pais, Alcides e Maria, por todo apoio e incentivo, aos meus irmãos, Ricardo, Cláudia e Andréia que torcem sempre por mim e aos meus sobrinhos Fernando e Luiza. Amo vocês.

Aos amigos e colegas do LQPN, Alberto, Aline, Anderson, Camila, Celso, Edgard, Érica, Fabio, Giovana, Harold, Joca, Karina, Lydia, Mauro, Nídia, Vitor e Yasmim. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio e pela oportunidade de aprender e conviver com vocês.

À Joyce Kelly e à Georgia por todo apoio e pela grande amizade.

Aos funcionários da SPG do IQ-USP, Milton, Emiliano, Marcelo e Cibebe pela atenção.

Aos funcionários da Central Analítica do IQ-USP, pela ajuda na obtenção dos espectros, pela disponibilidade e boa vontade em nos atender.

Aos professores e técnicos do Instituto de Química pela contribuição em minha formação.

Ao técnico Joca, por toda cooperação e amizade.

À Profa. Maria Cláudia Marx Young, Vanessa Fuentes e Maura Casari do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, pela realização dos ensaios de atividade antifúngica e de inibição da acetilcolinesterase.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Silva, R. A. **Análise metabolômica e atividade biológica de *Piper reticulatum* L.** 2011. 149p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O estudo fitoquímico dos extratos de plantas adultas e plântulas da espécie *Piper reticulatum*, coletada na Floresta Nacional de Carajás, levou ao isolamento de quatro amidas, incluindo diidrowisanidina, descrita previamente nesta espécie, wisanidina, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutileicosa-2,4-dienamida, (3*E*,5*E*,14*E*)-*N*-pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida (inérita em função da posição das insaturações da cadeia alquílica), uma lignana (siringaresinol) e uma nitrila (benzoato de cianobenzila), além de terem sido propostas as estruturas de oito amidas contendo longa cadeia alquílica, com base nos dados de cromatografia gasosa e líquida acoplada a espectrometria de massas. Os extratos e produtos naturais isolados foram avaliados quanto aos seus potenciais antifúngicos frente aos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, sendo constatada forte atividade para as amidas em ambos ensaios, além de forte atividade para a nitrila contra *C. sphaerospermum*. Além disso, os extratos de plantas adultas e plântulas de *P. reticulatum* foram analisados através de EM (ESI⁺) e os dados analisados por PCA (análise dos componentes principais) e através de HCA (análise por agrupamento hierárquico) juntamente com a espécie *P. amalago*, filogeneticamente relacionada com *P. reticulatum*, *P. crassinervium*, *P. solmsianum*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum*, *P. aduncum* e *P. tuberculatum*, afim de uma distinção ou classificação de grupos seguindo parâmetros metabólicos.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper reticulatum*, cromatografia, amidas, atividade biológica.

ABSTRACT

Silva, R. A. **Metabolomic analysis and biological activity of *Piper reticulatum* L.** 2011. 149p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The phytochemical study of extracts from adult plants and seedlings of the species *Piper reticulatum*, collected in the Carajás National Forest, afforded the isolation of four amides, including dihydrowisanidine, previously described from this species, wisanidine, (2*E*,4*E*)-*N*-2-isobutyleicosa-2,4-dienamide, (3*E*,5*E*,14*E*)-*N*-3,5,14-pyrrolidyleicosa-trienamide (novel based on the unsaturations position at the alkyl chain), a lignan (syringaresinol) and a nitrile (cianobenzyl benzoate) and, additionally eight amides containing long alkyl chain had their structures proposed based on gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry data. The extracts and the isolated natural products were evaluated for their potential antifungal activity against the phytopathogens *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* and acetylcholinesterase inhibitory activity, being found strong activity for amides for both two tests, and strong activity for nitrile against *C. sphaerospermum*. In addition, extracts of adult plants and seedlings of *P. reticulatum* were analyzed by MS (ESI +) and by PCA (principal component analysis) and HCA (hierarchical cluster analysis) together with the species *P. amalago*, phylogenetically related to *P. reticulatum*, *P. crassinervium*, *P. solmsianum*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum*, *P. aduncum* and *P. tuberculatum* in order to distinguish or classify them according to the metabolic profile.

Keywords: Piperaceae, *Piper reticulatum*, chromatography, amides, biological activity.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

δ	Deslocamento químico em ppm
AchE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
COSY	Espectroscopia de correlação
EI	Ionização por impacto eletrônico
ESI	Ionização por electrospray
GC-EI-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico
Hex	Hexano
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector na região do UV com arranjo de diodos
HPLC-ESI-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray
HPLC-ESI-MS-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de segunda ordem com ionização por electrospray
HPLC-NMR	Cromatografia líquida acoplada a ressonância magnética nuclear
HRESI	Espectrometria de massas com ionização por electrospray de alta resolução
HSQC	Correlação heteronuclear quântica simples
IV	Infravermelho
LQPN	Laboratório de química de Produtos Naturais
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas
MS-EI	Espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico

MS-ESI	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
NMR de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
NMR de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>m/z</i>	Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica em Da
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
TMS	Tetrametilsilano
d	dubleto
dd	Duplo dubleto
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	múltiplo
q	quarteto
s	singleto
t	tripleto

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da morfina.....	21
Figura 2. Ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies de <i>Piper</i> (Dyer e Palmer, 2004).....	26
Figura 3. Cromenos e derivados de ácidos benzóicos biologicamente ativos isolados de espécies de <i>Piper</i>	29
Figura 4. Fenilpropanóides biologicamente ativos isolados de espécies de <i>Piper</i>	30
Figura 5. Alcalóides biologicamente ativos isolados de espécies de <i>Piper</i>	30
Figura 6. Lignanais e neolignanais biologicamente ativos isolados de espécies de <i>Piper</i>	31
Figura 7. Folhas de <i>Piper reticulatum</i>	31
Figura 8. Substâncias descritas em espécies de <i>P. reticulatum</i>	32
Figura 9. <i>Piper nigrum</i> e estrutura da piperina.....	32
Figura 10. Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de <i>Piper</i>	35
Figura 11. Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e formação do composto diazo púrpura no ensaio de bioautografia (Marston <i>et al.</i> , 2002).....	39
Figura 12. Representação dos métodos aglomeração de a) ligação simples e b) ligação completa.....	43
Figura 13. Placa de CCDA dos extratos das partes de <i>P. reticulatum</i> , observadas sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm). F - folhas; Fp - folhas das plântulas; C - caule; Cp - caule das plântulas; R - raízes; Rp - raízes das plântulas; Fr - frutos.....	51
Figura 14. Cromatogramas (HPLC) dos extratos das partes de <i>Piper reticulatum</i>	51
Figura 15. Espectro de NMR de ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do extrato das folhas de <i>P. reticulatum</i>	52
Figura 16. Esquemas do fracionamento do extrato do caule de <i>P. reticulatum</i>	54
Figura 17. Esquema do fracionamento do extrato das raízes de <i>P. reticulatum</i>	55
Figura 18. Esquema do fracionamento do extrato das folhas de <i>P. reticulatum</i>	56
Figura 19. Esquema do fracionamento do extrato dos frutos de <i>P. reticulatum</i>	57
Figura 20. Estrutura da nistatina.....	59
Figura 21. Estrutura da Fisostigmina.....	61
Figura 22. Estrutura da diidrowisanidina (1).....	64
Figura 23. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 1.....	66
Figura 24. Espectro de massas (EI) da substância 1.....	66

Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido em pastilha KBr da substância 1	66
Figura 26. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância 1	67
Figura 27. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 1	67
Figura 28. Estrutura da wisanidina (2).....	68
Figura 29. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 2	68
Figura 30. Espectro de massas (EI) da substância 2	69
Figura 31. Estrutura da (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutileicosa-2,4-dienamida (3).....	71
Figura 32. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 3	72
Figura 33. Espectro de massas (EI) da substância 3	72
Figura 34. Espectro na região do infravermelho obtido em filme da substância 3	72
Figura 35. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância 3	73
Figura 36. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) da substância 3	73
Figura 37. Estrutura da lignana siringaresinol (4).....	75
Figura 38. Espectro de massas (ESI – modo negativo) da substância 4	76
Figura 39. Espectro de massas (EI) da substância 4	77
Figura 40. Proposta do mecanismo de fragmentação da substância 4 (Ricci <i>et al.</i> , 2008).....	77
Figura 41. Espectro de NMR de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) da substância 4	78
Figura 42. Espectro de NMR de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz) da substância 4	78
Figura 43. Estrutura da substância 5 e correlações observadas no mapa de contornos HMBC $^3J_{\text{H-C}}$	81
Figura 44. Espectro de massas (HRESI – modo positivo) da substância 5	82
Figura 45. Espectro de massas (EI) da substância 5	83
Figura 46. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido em pastilha de KBr da substância 5	83
Figura 47. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 5	84
Figura 48. Espectro de NMR de ^1H da substância 5 – ampliação da região entre δ 6,50 e 8,2.....	84
Figura 49. Espectro de NMR de ^1H da substância 5 – ampliação da região entre δ 7,4 e 8,2... 85	
Figura 50. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 5	85
Figura 51. Espectro de NMR de ^{13}C da substância 5 – ampliação da região entre δ 114 e 137.....	86
Figura 52. Mapa de contorno HSQC (CDCl_3 , 300 MHz) da substância 5	86

Figura 53. Mapa de contorno HSQC da substância 5 – ampliação da região entre δ_H 7,35 e 8,2.....	87
Figura 54. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 300 MHz) da substância 5	87
Figura 55. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 300 MHz) da substância 5 – ampliação da região entre δ_H 6,5 e 8,4.....	88
Figura 56. Mapa de contornos HMBC da substância 5 – ampliação da região entre δ_C 113 e 138.....	88
Figura 57. Estrutura da (3 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)- <i>N</i> -pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida (6).....	90
Figura 58. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 6	92
Figura 59. Espectro de massas (EI) da substância 6	92
Figura 60. Espectro de NMR de ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) da substância 6	93
Figura 61. Espectro de NMR de ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância 6	93
Figura 62. Espectro de NMR de ¹³ C da substância 6 – ampliação da região entre δ 122 e 136.....	94
Figura 63. Espectro de NMR de ¹³ C da substância 6 – ampliação da região entre δ 8 e 52.....	94
Figura 64. Espectro de COSY da substância 6	95
Figura 65. Cromatograma de íons da fração Fr-5.....	97
Figura 66. Espectro de massas (MS-MS) da substância 7	97
Figura 67. Proposta do mecanismo de fragmentação da substância 7 (Jiang <i>et al</i> , 2009).....	98
Figura 68. Espectro de massas (MS-MS) da substância 8	98
Figura 69. Estrutura da substância 8 (<i>N</i> -isobutileicosa-2,4,14-trienamida).....	98
Figura 70. Espectro de massas (MS-MS) da substância 9	99
Figura 71. Estrutura da substância 9 (<i>N</i> -isobutiloctadeceno-2-enamida).....	99
Figura 72. Espectros de massas (ESI - modo positivo) de compostos nitrogenados presentes na fração Fr-5.....	100
Figura 73. Cromatograma de íons da fração Fr-6.....	100
Figura 74. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6....	101
Figura 75. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6....	101
Figura 76. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6....	101
Figura 77. Espectros de massas (MS-MS) de compostos nitrogenados presentes na fração Fr-6.....	104
Figura 78. Cromatograma de íons da fração F-16-6.....	104
Figura 79. Espectro de massas (MS-MS) da substância 10	105
Figura 80. Estrutura da substância 10 (<i>N</i> -isobutiloctadeceno-2,4,12-trienamida).....	105

Figura 81. Espectro de massas (MS-MS) da substância 8	105
Figura 82. Estrutura da substância 8 (<i>N</i> -isobutileicosa-2,4,14-enamida).....	105
Figura 83. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração F-16-6.....	106
Figura 84. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada da fração F-16-6.....	106
Figura 85. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração F-16-6.....	106
Figura 86. Espectros de massas (MS-MS) de compostos nitrogenados presentes na fração F-16-6.....	108
Figura 87. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 11 , identificada no extrato de folhas de plântulas.....	109
Figura 88. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 12 , identificada no extrato de plântulas.....	110
Figura 89. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 13 , identificada nos extratos de caules de folhas de plântulas.....	110
Figura 90. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 14 , identificada nos extratos de folhas e folhas de plântulas.....	111
Figura 91. Placas utilizadas no ensaio para inibidores de acetilcolinesterase. 1-Folhas; 2-Folhas das plântulas; 3-Caule; 4-Caule das plântulas; 5-Raízes; 6-Raízes das plântulas; 7-Frutos; P-Padrão (Fisostigmina).....	112
Figura 92. Placas utilizadas no ensaio para inibidores de acetilcolinesterase. I – Substância 1 ; II – Substância 3 ; III – Substância 6 ; P – Fisostigmina (0,05µg/2,5µg).....	113
Figura 93. Placas utilizadas nos ensaios antifúngicos. 1-Folhas; 2-Folhas das plântulas; 3-Caule; 4-Caule das plântulas; 5-Raízes; 6-Raízes das plântulas; 7-Frutos.....	114
Figura 94. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de <i>P. reticulatum</i>	119
Figura 95. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de <i>P. reticulatum</i>	120
Figura 96. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de <i>P. reticulatum</i>	120
Figura 97. Cromatogramas (HPLC) dos extratos de <i>P. reticulatum</i>	121
Figura 98. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de <i>Piper</i>	122

Figura 99. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de <i>Piper</i>	123
Figura 100. Espectro de massas (ESI – modo positivo) do extrato de <i>P. amalago</i> coletada no IQ-USP.....	123
Figura 101. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de <i>Piper</i>	124
Figura 102. Cromatogramas (HPLC) dos extratos de <i>P. amalago</i>	124
Figura 103. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de <i>Piper</i>	126
Figura 104. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de <i>Piper</i>	126
Figura 105. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de <i>Piper</i>	127

Lista de tabelas

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Piper</i>	28
Tabela 2. Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de <i>Piper</i>	34
Tabela 3. Características das técnicas hifenadas (Rodrigues <i>et al.</i> , 2006).....	37
Tabela 4. Método empregado para as análises por HPLC das substâncias puras, frações e extratos dos órgãos de <i>P. reticulatum</i>	47
Tabela 5. Massas coletadas das diversas partes de <i>Piper reticulatum</i> e de seus extratos.....	50
Tabela 6. Dados espectrais de NMR de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 200 e 50MHz) para a substância 1 comparados com dados da literatura.....	65
Tabela 7. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 200 e 50 MHz) para a substância 3 e dados da literatura (δ em ppm).....	71
Tabela 8. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CD_3OD 200 e 50MHz) para a substância 4 comparados com dados da literatura (δ em ppm).....	76
Tabela 9. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 , 500 e 50MHz) e correlações HMBC para a substância 5 (δ em ppm).....	82
Tabela 10. Dados espectrais de NMR de ^1H , ^{13}C e COSY (CDCl_3 200, 50 e 300 MHz) para a substância 6 (δ em ppm).....	91
Tabela 11. Métodos cromatográficos e comprimentos de onda utilizados nas análises de HPLC-ESI-MS-MS.....	96
Tabela 12. Resultado do ensaio para inibidores de acetilcolinesterase.....	112
Tabela 13. Resultado do ensaio antifúngico contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	115
Tabela 14. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por HCA e PCA.....	117

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Química de Produtos Naturais.....	19
1.2. Importância econômica.....	22
1.3. A família Piperaceae.....	24
1.4. O gênero <i>Piper</i>.....	25
1.5. A espécie <i>Piper reticulatum</i>.....	31
1.6. Amidas de <i>Piper</i>.....	32
1.7. O emprego das técnicas acopladas na química de produtos naturais.....	36
1.8. Atividade Biológica.....	37
1.8.1. Atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	37
1.8.2. Atividade antifúngica.....	39
1.9. Análise dos componentes principais (PCA) e análise por agrupamento	
hierárquico (HCA).....	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Materiais cromatográficos.....	45
3.1.1. Solventes empregados.....	45
3.1.2. Cromatografia líquida a vácuo.....	45
3.1.3. Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa.....	46
3.2. Instrumentação.....	46
3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
3.2.2. HPLC-ESI-MS.....	48
3.2.3. HPLC-ESI-MS-MS.....	48

3.2.4.	MS-EI.....	48
3.2.5.	Ressonância magnética nuclear.....	49
3.2.6.	Infravermelho.....	49
3.3.	Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos.....	49
3.4.	Análise preliminar dos extratos dos órgãos de <i>Piper reticulatum</i>.....	50
3.5.	Purificação dos metabólitos secundários.....	53
3.5.1.	Fracionamento do extrato dos caules.....	53
3.5.2.	Fracionamento do extrato das raízes.....	54
3.5.3.	Fracionamento do extrato das folhas.....	55
3.5.4.	Fracionamento do extrato dos frutos.....	57
3.6.	Atividade Biológica.....	58
3.6.1.	Atividade antifúngica contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	58
3.6.2.	Ensaio para inibidores de acetilcolinesterase.....	60
3.7.	Análise dos componentes principais (PCA) e análise por agrupamento hierárquico (HCA).....	61
3.7.1.	Análise por MS-ESI.....	61
3.7.2.	Tratamento dos dados obtidos por MS-ESI.....	62
4.	RESULTADOS.....	63
4.2.	Identificação estrutural dos metabólitos secundários isolados.....	63
4.2.1.	Substância 1.....	63
4.2.2.	Substância 2.....	68
4.2.3.	Substância 3.....	69
4.2.4.	Substância 4.....	74
4.2.5.	Substância 5.....	79
4.2.6.	Substância 6.....	89

4.3.	Identificação de amidas através de espectrometria de massas.....	95
4.2.1.	Identificação de amidas através de HPLC-ESI-MS-MS.....	95
4.2.2.	Identificação de amidas através de GC-EI-MS.....	109
4.4.	Atividade biológica.....	111
4.4.1.	Atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	111
4.4.2.	Atividade antifúngica.....	114
4.5.	Análise dos componentes principais (PCA) e análise por agrupamento	
	hierárquico (HCA).....	116
5.	CONCLUSÕES.....	129
6.	REFERÊNCIAS.....	131
7.	SÚMULA CURRICULAR.....	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química de produtos naturais

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

Nos vegetais o metabolismo primário origina diversos produtos extremamente importantes como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos graxos, aminoácidos e açúcares, considerados essenciais para a manutenção das células, pois mantém e regulam funções como a fotossíntese, transporte de solutos e respiração. O metabolismo secundário, processo pelo qual produtos naturais são originados, envolve um grande conjunto de reações tanto de síntese quanto de catabolismo que são mediadas frequentemente por enzimas com elevada especificidade (Luckner, 1990).

Os metabólitos secundários são produzidos a partir de poucos intermediários-chave provenientes do metabolismo primário, destacando-se o acetato, piruvato, alguns açúcares (por exemplo, eritrose e fosfato de metil eritriol), aminoácidos, entre outros. Os metabólitos secundários assim originados têm sido prioritariamente classificados de acordo com as vias biossintéticas, podendo ser agrupados em policetídeos, alcalóides, compostos fenólicos e isoprenóides (Dixon *et al.*, 2001a; Farn e Jones, 2003).

Durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. As plantas são organismos sesséis, não podem “fugir” de predadores, e também não possuem sistema imunológico para lidar contra inimigos naturais como fungos, bactérias, insetos, vírus (Herrera e Pellmyr, 2002; Berenbaum, 1995; Braga *et al.*, 1991). Assim, desenvolveram um arsenal químico com substâncias que atuam, por exemplo, como fagoinibidores, fungicidas ou bactericidas. De fato, já foram reconhecidos metabólitos com funções diversas, por exemplo, de defesa contra herbívoros e microorganismos, de proteção contra raios UV, de atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Wink, 1990), bem como com participação em atividades alelopáticas (Harborne, 1988).

Com o aprimoramento recente de técnicas analíticas e bioquímicas aplicadas ao estudo de produtos naturais, o conhecimento a respeito não apenas da composição, mas também das funções de metabólitos secundários vem crescendo exponencialmente e uma das conseqüências é a compreensão cada vez maior de seu papel para os organismos e ecossistemas.

Com base no modelo de seleção natural e evolução, aceito hoje como principal processo para o surgimento das espécies com suas peculiaridades, é natural pensar que os metabólitos secundários devem proporcionar vantagens evolutivas, uma relação custo/benefício positiva que justifique a sua seleção e manutenção ao longo do processo evolutivo. Diversos estudos têm sido realizados a fim de se determinar a função e evolução dos metabólitos secundários dentro do contexto das complexas relações ecológicas, pressões bióticas e abióticas que

moldam os diferentes organismos. Os metabólitos secundários podem conferir aos organismos que os produzem vantagens em termos de sua sobrevivência e reprodução, vantagens essas que devem compensar o custo energético inevitável de tais processos (Fraenkel, 1959; Williams *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1991; Wink, 2003).

Além dessas funções fundamentais para o desenvolvimento das espécies vegetais, os metabólitos secundários também têm sido amplamente utilizados pelo homem para outros fins, sendo extraídos e utilizados como corantes, perfumes, inseticidas e principalmente como fármacos (Balandrin *et al.*, 1985).

O surgimento da química de produtos naturais como ciência nos moldes atuais ocorreu no início do século XIX, associada ao nascimento da química orgânica em si, cujo marco foi o isolamento do primeiro produto de origem natural, a morfina (Figura 1), realizado por Friedrich Wilhelm Sertürner em 1806 (Sertürner, 1806). Esse foi um acontecimento marcante, sendo a primeira demonstração de que a atividade de uma planta poderia ser isolada e atribuída a uma substância.

Figura 1. Estrutura da morfina

Até recentemente, a maioria dos trabalhos na área de química de produtos naturais esteve mais voltada para as atividades de isolamento e determinação estrutural de metabólitos secundários do que para a avaliação do potencial biológico (Montanari e Bolzani, 2001). A mudança de enfoque é notória quando se observam

os requisitos impostos pelos principais periódicos da área, nos quais não somente o ineditismo estrutural é considerado, mas também os aspectos biossintéticos ou de atividade biológica. A perspectiva unificadora entre a química e a biologia tende a construir-se numa tendência cada vez mais presente na compreensão dos sistemas biológicos, especificamente das vias biossintéticas, e também na busca por produtos biologicamente ativos (Poulter, 2009).

Além disso, não se pode deixar de citar que o avanço nas técnicas de instrumentação analítica nas últimas décadas, principalmente a NMR e HPLC-MS, destaca-se no desenvolvimento desses estudos, pois, atualmente, permite a caracterização de substâncias bioativas, muitas vezes presentes nos extratos em quantidades mínimas (Strege, 1999).

A pesquisa de produtos naturais no Brasil tem sido uma das áreas mais tradicionais da química devido à grande biodiversidade do país. O potencial para os estudos de bioprospecção é imenso, um caminho excelente para agregar valor às espécies vegetais nativas, buscando contribuir com as propostas de preservação e do uso sustentável de reservas biológicas.

1.2. Importância econômica

Substâncias de origem vegetal têm sido utilizadas, desde o desenvolvimento das primeiras civilizações, para o tratamento de diversos males, sendo que uma das maiores fontes desses medicamentos provém de plantas superiores (Montanari e Bolzani, 2001; Newman e Cragg, 2007).

O século XIX pode ser considerado marco na fitoquímica de plantas medicinais, pois durante esse período surgiram os primeiros estudos com base

científica. Estima-se que cerca de 100.000 produtos naturais tenham sido descritos (Dixon, 2001b) e, sendo evolutivamente selecionados para interagir com alvos biológicos, devem ser considerados uma peça chave na busca de novos medicamentos e agroquímicos.

O mercado farmacêutico é, sem dúvida, um dos principais segmentos que exploram o valor econômico de produtos naturais. Cerca de 25% das substâncias utilizadas como medicamentos têm sua origem nas plantas; na verdade estima-se que cerca de 44% de todas as drogas tem como base produtos naturais, (Hostettmann e Marston, 2007). A descoberta dos alcalóides morfina, cocaína e quinina, entre tantas outras substâncias isoladas de plantas e utilizadas como medicamentos até os dias atuais, não deixam dúvidas quanto a sua importância, principalmente, no uso tradicional (Pinto *et al.*, 2002; Kirby, 1996).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso (Barreiro e Bolzani, 2009).

Nestes últimos 10 anos, mudanças importantes vêm sendo observadas no rumo da pesquisa por novos fármacos devido aos avanços da biologia molecular, mapeamento genético, bioensaios automatizados e quimiogenômica. Esse novo cenário abriu perspectivas promissoras para parcerias e colaborações com universidades e institutos de pesquisas levando ao estabelecimento de programas de bioprospecção (seleção de substâncias bioativas de fontes naturais), cujo

objetivo alvo visa à descoberta de substâncias naturais com estruturas novas e propriedades farmacológicas únicas, de biomas promissores, incorporando fases mais refinadas em pesquisa com fármacos, química medicinal e propostas de relações estrutura/atividade (Newman *et al.*, 2003; Newman e Cragg, 2007).

Aproximadamente 60% dos agentes antitumorais e antibióticos disponíveis no mercado ou em estágios de avaliação clínica são de origem natural (Pinto *et al.*, 2002). Em 1999, metade dos 20 medicamentos mais vendidos eram produtos naturais com lucros de vendas em torno de 16,5 bilhões de dólares (Greenwood e Mutabingwa, 2002). Nos últimos 10 anos, cerca de 500 entidades químicas novas foram aprovadas pelas instituições reguladoras de todo o mundo, sendo quase 50% de origem natural (Newman *et al.*, 2003; Newman e Cragg, 2007).

Diante desses dados, países como o Brasil, que detém grande parte da biodiversidade mundial, poderão usufruir deste patrimônio, se esforços forem dirigidos para a pesquisa colaborativa na descoberta por fármacos potenciais vindos da nossa biodiversidade (Greenwood e Mutabingwa, 2002).

1.3. A família Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales e constitui-se em uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas. É uma família predominantemente tropical, que compreende atualmente 4 gêneros, *Piper*, *Peperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*, sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais representativos com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente (Mabberley, 1997; Souza, 2005). Pertencem a esta família algumas plantas utilizadas como medicinais, como a

pariparoba ou caapeba (*Pothomorphe umbellata*) e o falso-japorandi (*Piper spp.*), além de plantas condimentares como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*).

Esta é uma família bastante comum nas formações florestais brasileiras, particularmente na Mata Atlântica, onde espécies de *Piper* são bastante freqüentes. Tais plantas são caracterizadas como pequenos arbustos ou árvores sublenhosas, sendo facilmente reconhecidas mesmo em estado vegetativo, pela presença de nós foliares geniculados e folhas com base bastante assimétricas (Souza, 2005).

O potencial de espécies de Piperaceae quanto ao acúmulo de produtos naturais bioativos pode ser atestado por inúmeros trabalhos (Sengupta *et al.*, 1987; Parmar *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1993) mas que são baseados em estudos de cerca de 10% de suas espécies. Destacam-se as atividades antifúngicas, antimicrobianas e inseticidas (Bernard *et al.*, 1995; Parmar *et al.*, 1997; Terreaux *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2002; Ngane *et al.*, 2003; Dyer *et al.*, 2003; Kato and Furlan, 2007). Entretanto, a distribuição das diversas classes de metabólitos secundários nos diversos clados não é clara, apesar dos dados de filogenia molecular atualmente disponíveis baseados em sequência de determinadas regiões de DNA (Jaramillo *et al.*, 2001).

1.4. O gênero *Piper*

O gênero *Piper* possui cerca de 2000 espécies identificadas (Wanke *et al.*, 2007), o que o faz o maior entre as angiospermas basais. Podem ser facilmente encontradas distribuídas por ambos os hemisférios nas regiões tropicais e subtropicais e têm sido amplamente investigadas quanto à presença de substâncias biologicamente ativas. Muitos desses estudos foram baseados nos diversos usos na

medicina popular, como remédios para dores no estômago, agentes antiinflamatórios, antipiréticos e contra asma, e até como repelentes de insetos (Parmar *et al.*, 1997).

Apesar do grande número de espécies pertencentes a este gênero, aproximadamente 112 espécies foram investigadas fitoquimicamente, revelando a presença de cerca de 670 metabólitos secundários, distribuídos em classes conforme ilustra a figura 2 (Dyer e Palmer, 2004).

Figura 2. Ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Piper* (Dyer e Palmer, 2004).

Morfologicamente as espécies de *Piper* são relativamente uniformes, com folhas simples e alternadas e apresentando caules divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram-se com mais facilidade, semelhantes aos nodos observados em bambus ou na cana de açúcar (Dyer e Palmer, 2004). Também são características suas inflorescências que geram espigas ou infrutescências.

O perfil fitoquímico das espécies de *Piper* é bastante diversificado e o potencial dessas espécies pode ser constatado pela enorme variedade de compostos bioativos isolados de suas espécies. Nesse âmbito, destacam-se os compostos que possuem atividade antifúngica, principalmente amidas (Alecio *et al.*,

1998; Navickiene *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2007) e ácidos benzóicos prenilados (Baldoqui *et al.*, 1999; Terreaux *et al.*, 1998; Lago *et al.*, 2004). Também são descritas amidas inseticidas (Batista-Pereira *et al.*, 2006; Barbieri Jr *et al.*, 2007; Navickiene *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2008) e antitumorais (Bezerra *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2008), lignanas tetraidrofurânicas e cromenos com atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (Martins *et al.*, 2003; Batista Jr *et al.*, 2008), e outras atividades (Chen *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Srinivasan, 2007; Xia *et al.*, 2007; Bezerra *et al.*, 2008b; Matsuda *et al.*, 2008; Tabopda *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). É descrita também a presença de lignanas e neolignanas (Ahmad *et al.*, 1998; Benevides *et al.*, 1999), alcalóides (Parmar *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1998), propenilfenóis (Ramos *et al.*, 1986), chalconas (Orjala *et al.*, 1993), pironas (Smith *et al.*, 1983) além de terpenos (Martins *et al.*, 1998).

Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina tradicional de diversas partes do mundo. Os casos mais conhecidos incluem *Piper nigrum*, a pimenta do reino, utilizada amplamente nas culturas chinesa e indiana para diversos fins; *P. longum* e *P. methysticum*, por suas propriedades medicinais, que incluem a utilização como medicamento para dores de estômago, ansiolíticos (*P. methysticum*) (Whitton *et al.*, 2003) e até para o tratamento de reumatismo e artrite (*P. futokadsura*) (Konishi *et al.*, 2005).

O LQPN do IQ-USP tem investigado a presença de substâncias antifúngicas em diversas espécies de Piperaceae. Os dados obtidos até o presente incluem amidas antifúngicas em *Piper hispidum* (Alécio *et al.*, 1998), *P. tuberculatum* (Navickiene *et al.*, 2000), *P. arboreum* (da Silva *et al.*, 2002), *P. scutifolium* e *P. hoffmanseggianum* (Marques *et al.*, 2007), melhor detalhado no item 1.7; ácidos

benzóicos prenilados em *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999); flavanonas e hidroquinonas de *P. crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003); cromenos de *Peperomia serpens* (Kitamura *et al.*, 2006) e piperolídeos de *P. malacophyllum* (Lago *et al.*, 2005).

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies de *Piper*.

Metabólitos descritos	Atividade biológica	Ocorrência	Referência
Cromenos e derivados de ácido benzóico			
A - E	Antifúngica, atitumoral	<i>P. aduncum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999
F - G	Antifúngica, antioxidante	<i>P. crassinervium</i>	Danelutte <i>et al.</i> , 2003 Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
H	Antifúngica	<i>P. crassinervium</i>	Lago <i>et al.</i> , 2004
Fenilpropanóides			
I - J		<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> , 1999
K		<i>P. regnellii</i>	Koroishi <i>et al.</i> , 2008
L	Antimicrobiana Antioxidante	<i>P. auritum</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. aduncum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. betle</i> <i>P. guineense</i>	Oyedeji <i>et al.</i> , 2005; McBurnett <i>et al.</i> , 2007; Mohottalage <i>et al.</i> , 2007; Andrade <i>et al.</i> , 2008; Guerrini <i>et al.</i> , 2009
Alcalóides			
M	Citotóxica	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. arborens</i> <i>P. boehmeriaefolium</i> var. <i>tonkinense</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. scutifolium</i> <i>P. umbellatum</i>	Olsen <i>et al.</i> , 1993; Singh <i>et al.</i> , 1996; Xiao e Pan, 2004; Tsai <i>et al.</i> , 2005; Chaves <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et al.</i> , 2007; Tabopda <i>et al.</i> , 2008
N	Citotóxica	<i>P. boehmeriaefolium</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2005
P	Citotóxica	<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. lolot</i> <i>P. caninum</i>	Gupta <i>et al.</i> , 1999; Ma <i>et al.</i> , 2004b; Li <i>et al.</i> , 2007
Lignanas e Neolignanas			
P	Tripanomicida	<i>P. solmsianum</i>	Ma <i>et al.</i> , 1991; Martins <i>et al.</i> , 2000; Martins <i>et al.</i> , 2003
Q	Antioxidante Reno-protetora Antileishmania	<i>P. cubeba</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. refractorum</i>	Banerji e Dhara, 1974; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007
R	Antifúngica Anti-histamínica	<i>P. cernuum</i> <i>P. clusii</i>	Koul <i>et al.</i> , 1983; Coimbra <i>et al.</i> , 2004;

	Anti-inflamatória	<i>P. cubeba</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. trichostachyon</i>	Danelutte <i>et al.</i> , 2005; De Souza <i>et al.</i> , 2005; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Hirata <i>et al.</i> , 2008
S	Tripanomicida Antifúngica	<i>P. fulvescens</i> <i>P. pallescens</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i>	De Moreira <i>et al.</i> , 1995; Chauret <i>et al.</i> , 1996; Freixa <i>et al.</i> , 2001; Pessini <i>et al.</i> , 2005; Luize <i>et al.</i> , 2006; Campos <i>et al.</i> , 2007
T	Tripanomicida Antifúngica	<i>P. decurrens</i> <i>P. fulvescens</i> <i>P. pallescens</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i>	De Moreira <i>et al.</i> , 1995; Chauret <i>et al.</i> , 1996; Freixa <i>et al.</i> , 2001; Pessini <i>et al.</i> , 2005; Luize <i>et al.</i> , 2006; Campos <i>et al.</i> , 2007
U	Anti-inflamatória	<i>P. futokadsura</i> <i>P. kadsura</i> <i>P. schmidtii</i>	Strickler <i>et al.</i> , 1989; Chen <i>et al.</i> , 1993; Lin <i>et al.</i> , 2006

Figura 3. Cromenos e derivados de ácidos benzóicos biologicamente ativos isolados de espécies de *Piper*.

Figura 4. Fenilpropanóides biologicamente ativos isolados de espécies de *Piper*.

Figura 5. Alcalóides biologicamente ativos isolados de espécies de *Piper*.

Figura 6. Lignanas e neolignanas biologicamente ativos isolados de espécies de *Piper*.

1.5. A espécie *Piper reticulatum*

Figura 7. Folhas de *Piper reticulatum*.

Um estudo realizado com extratos acetônicos das partes aéreas de um espécimen de *Piper reticulatum*, resultou na descrição da amida diidrowisanidina (**1**) e das pironas 6-(*R*)-(4'-oxopentil)-5,6-diidro-2*H*-piran-2-ona (**2**) e 6-(*R*)-(4'-oxopent-2'-enil)-5,6-diidro-2*H*-piran-2-ona (**3**), estas até então desconhecidas, com atividades antifúngicas, antitumoral e inseticida (Maxwell *et al.*, 1998). (Figura 8). Além disso, um estudo realizado com o óleo essencial extraído de *P. reticulatum* demonstrou sua composição como sendo constituído principalmente por β -elemeno (24,6%) e β -cariofileno (16,7%) (Luz *et al.*, 2003).

Diversas espécies vegetais coletadas no Equador utilizadas pela população nativa, incluindo a espécie aqui estudada, foram avaliadas quanto ao seu potencial biológico, revelando grande atividade inibidora da enzima beta-glicosidase, utilizadas nas medidas anti-HIV, antidiabético e anti-obesidade (Guerrero *et al.*, 2003).

Figura 8. Substâncias descritas de *P. reticulatum*.

1.6. Amidas em *Piper*

As amidas são provavelmente uma das classes de produtos naturais mais características de espécies *Piper*. A piperina, constituinte responsável pela pungência da pimenta-do-reino (Figura 9) e também por muitas propriedades medicinais, constitui-se na primeira amida isolada em 1819, por Orstedt (Srinivasan, 2007).

Figura 9. *Piper nigrum* e estrutura da piperina.

Além da piperina, muitas outras amidas têm sido isoladas de espécies de *Piper*. Entre elas, diversas vêm demonstrando consideráveis atividades biológicas, destacando-se as atividades antifúngicas e inseticidas (Marques *et al*, 2007, Navickiene *et al.*, 2007, Alécio *et al.*, 1998, Navickiene *et al.*, 2000, Silva *et al.*, 2002). As amidas constituem-se, portanto, num excelente foco de estudos químicos e de bioatividade de produtos naturais.

Tabela 2. Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de *Piper*.

Amida	Ocorrência	Atividade biológica	Referência
A e B	<i>Piper hispidum</i>	Antifúngica	Alécio <i>et al.</i> , 1998
C	<i>Piper hispidum</i>	Antifúngica	Navickiene <i>et al.</i> , 2000
D e J	<i>Piper tuberculatum</i> <i>Piper hispidum</i>	Antifúngica	Navickiene <i>et al.</i> , 2000
K	<i>P. chaba</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. lolot</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. tuberculatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. sarmentosum</i>	Inseticida Controle de colesterol (inibidor da enzima ACAT) Antituberculose Anticâncer	Okogun <i>et al.</i> , 1977; Bari <i>et al.</i> , 1990; Connolly <i>et al.</i> , 1995; Das <i>et al.</i> , 1998; Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2004; Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2007; Navickiene <i>et al.</i> , 2007; Rho <i>et al.</i> , 2007; Ee <i>et al.</i> , 2010.
L	<i>P. amalago</i> <i>P. divaricatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hancei</i> <i>P. laetispicum</i> <i>P. longum</i> <i>P. nepalense</i> <i>P. scutifolium</i> <i>P. tuberculatum</i>	Antifúngica Antitumoral Anti-inflamatória Anti-oxidase Inseticida Bactericida	Gupta <i>et al.</i> , 1972; Okogun e Ekong, 1974; Costa e Mors, 1981; Bernard <i>et al.</i> , 1995; Narui <i>et al.</i> , 1995; Parmar <i>et al.</i> , 1998; Reddy <i>et al.</i> , 2001; Reddy <i>et al.</i> , 2001; Stöhr <i>et al.</i> , 2001; Morikawa <i>et al.</i> , 2004; Fang <i>et al.</i> , 2007; Marques <i>et al.</i> , 2007; Navickiene <i>et al.</i> , 2007; Bezerra <i>et al.</i> , 2008; Silva <i>et al.</i> , 2008
M	<i>P. sarmentosum</i> <i>P. trichostachyon</i>	Antituberculose Antiplasmodial	Singh <i>et al.</i> , 1974; Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2004
N	<i>P. scutifolium</i>	Antifúngica	Marques <i>et al.</i> , 2007
O	<i>P. aduncum</i>	Citotóxica Antibacteriana	Orjala <i>et al.</i> , 1993
P	<i>P. alatabaccum</i> <i>P. callosum</i> <i>P. laetispicum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. piscatorum</i> <i>P. scutifolium</i> <i>Ottonia frutescens</i> <i>Ottonia martiana</i> <i>Ottonia propinqua</i>	Inseticida Piscicida Anti-inflamatória Anestésica Bactericida Carrapaticida	Costa e Mors, 1981; Pring, 1982; Makapugay <i>et al.</i> , 1983; McFerren e Rodriguez, 1998; Antunes <i>et al.</i> , 2001; McFerren <i>et al.</i> , 2002; Zhou <i>et al.</i> , 2002; Cunico <i>et al.</i> , 2004; Facundo <i>et al.</i> , 2004; Facundo <i>et al.</i> , 2005; Cunico <i>et al.</i> , 2006; Jensen <i>et al.</i> , 2006; Fang <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2008
Q e R	<i>P. capense</i>	Antiplasmodial	Kaou <i>et al.</i> , 2010.

Figura 10. Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de *Piper*.

1.7. O emprego das técnicas acopladas na química de produtos naturais

O avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hifenadas, proporcionou um papel importante na análise e elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis, até poucos anos atrás. Isso possibilitou o estudo de extratos brutos, ou de alta complexidade, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso dessas técnicas (Rodrigues *et al.*, 2006).

O termo técnicas hifenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta mais eficiente e rápida comparada com as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos oriundos de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia a gás (GC), com técnicas espectrométricas como espectrofotometria de UV-Vis (DAD), espectrômetria de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações complementares sobre a estrutura química dos componentes da amostra. A escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando-se baixos limites de detecção.

O número de informações obtidas, através dessas técnicas, é muito grande, tornando-se necessária a utilização de processadores para a obtenção e tratamento dos dados visando a sua interpretação. Uma das vantagens das técnicas acopladas na química de produtos naturais moderna, em comparação com as técnicas

espectroscópicas sem hifenação, é a baixa quantidade de analito inicial que pode ser da ordem de miligramas ou microgramas (Rodrigues *et al.*, 2006).

Tabela 3. Características das técnicas hifenadas (Rodrigues *et al.*, 2006).

Técnica hifenada	Características
GC-MS	Identificação de compostos. Fornece informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.
GC-MS-MS	Confirmação estrutural de moléculas.
HPLC-DAD	Identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.
HPLC-MS	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes acoplado com HPLC-DAD para fornecer informações estruturais complementares.
HPLC-MS-MS	Determinação de novos compostos, com a incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.
HPLC-RMN	Fornece informações estruturais (espectro NMR de ^1H). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas.

1.8. Atividade biológica

1.8.1 Atividade inibidora da acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise metabólica da acetilcolina nas sinapses colinérgicas no sistema nervoso central e periférico, e a diminuição excessiva do nível de acetilcolina no cérebro pode originar a doença de

Alzheimer. Inibidores desta enzima constituem nas bases de novas drogas disponíveis para o manejo desta doença, principal causa de transtornos de memória entre os idosos. Estima-se que atinja cerca de 10% da população com idade acima de 65 anos (Racchi *et al.*, 2004). Os inibidores da acetilcolinesterase promovem o aumento da concentração e duração da ação da acetilcolina sináptica (Rollinger *et al.*, 2004).

Vários inibidores da acetilcolinesterase estão sendo investigados como parte das estratégias para o tratamento da doença de Alzheimer, por isso a busca por novos inibidores da AchE é de grande interesse. A natureza, sendo uma fonte rica de diversidade química e biológica, fornece estruturas únicas e complexas de produtos naturais que não podem ser facilmente obtidas por síntese química (Ingkaninan *et al.*, 2003). Portanto, atualmente os inibidores da acetilcolinesterase de origem natural representam uma fonte alternativa para o tratamento desta doença (Martinez e Castro, 2006). Entre as classes de produtos naturais, os alcalóides como a galantamina e a fisostigmina constituem-se nos principais exemplos.

Um estudo realizado na Tailândia com extratos metanólicos de 32 espécies de famílias variadas, incluindo duas espécies de Piperaceae, *Piper nigrum* e *Piper interruptum*, focado na investigação de inibidores da acetilcolinesterase através do método colorimétrico de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) demonstrou forte atividade inibidora da acetilcolinesterase para estas espécies, sendo dois dos extratos mais ativos ($58,02 \pm 3,83 \%$ e $65,17 \pm 8,13 \%$ de atividade inibidora da acetilcolinesterase para *Piper nigrum* e *Piper interruptum* respectivamente (Ingkaninan *et al.*, 2003).

O ensaio realizado por bioautografia baseia-se na clivagem da acetato de 1-naftila, que simula a estrutura da acetilcolina, pela enzima acetilcolinesterase para formar 1-naftol, que por sua vez reage com o sal Fast Blue B gerando um composto

diazônio de cor púrpura (Figura 11). As regiões da placa de CCDA que contenham inibidores da acetilcolinesterase aparecem como manchas brancas (Marston *et al*, 2002).

Figura 11. Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e formação do composto diazo púrpura no ensaio de bioautografia (Marston *et al*, 2002).

1.8.2. Atividade antifúngica

Estudos de bioprospecção focados em agentes antifúngicos mostram-se importante face à crescente demanda por produtos dessa natureza, uma vez que os fungos são responsáveis, direta ou indiretamente, por uma série de doenças que afetam plantas, animais e humanos. Além de seu uso como medicamento, os

produtos antifúngicos encontram uso na agricultura, conservação, conservação de alimentos e cosméticos (Hadeck e Greger, 2000; Barret, 2002).

As doenças causadas por fungos são um fator de grande importância a ser considerada na produção agrícola mundial (Fenner *et al.*, 2006). Estima-se que 20% da produção mundial de grãos são perdidas por essas doenças (Hadeck e Greger, 2000).

Os fungos são freqüentemente relacionados a doenças oportunistas, pois se aproveitam de sistemas imunológicos debilitados. Nos últimos anos, têm-se observado um grande aumento do número de infecções em pacientes portadores do vírus de imunodeficiência adquirida (HIV), onde a principal infecção é causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans* (Marqui *et al.*, 2008).

Fungos do gênero *Cladosporium* são bastante utilizados nos bioensaios. Este gênero engloba cerca de 30 espécies distribuídas de maneira predominante nas regiões tropicais e subtropicais. Estas espécies são encontradas no ar em ambientes internos e externos com níveis elevados de umidade como plantas mortas, plantas lenhosas, palha, couro e em material orgânico podre, além disso, são freqüentemente isoladas como contaminantes de alimentos (Daunter & Greenshields, 1973).

O número de espécies de fungos encontrados no ar é maior no verão e reduzido no inverno. Devido a sua distribuição aérea causam problemas respiratórios, reações alérgicas e infecções de pele. As espécies mais comuns são *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As colônias de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* atingem cerca de 3 cm em 7 dias. Morfologicamente possuem um aspecto preto ou cinzento esverdeado muito escuro (Collier *et al.*, 1998).

Espécies pertencentes à família Piperaceae submetidas a estudos fitoquímicos biomonitorados têm revelado o acúmulo de inúmeros metabólitos secundários com potencial atividade antifúngica. Entre os estudos realizados com espécies de *Piper*, verificou-se a ocorrência de amidas antifúngicas em *P. hispidum* (Alécio *et al.*, 1998), *P. tuberculatum* (Navickiene *et al.*, 2000), *P. arboreum* (Silva *et al.*, 2001), *P. scutifolium* e *P. hoffmanseggianum* (Marques *et al.*, 2007); ácidos benzóicos prenilados em *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999), *P. gaudichaudianum*, *P. hostmannianum* e em *P. crassinervium* (Lago *et al.*, 2004), flavonóides e hidroquinonas em *P. crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006) e piperolídeos em *P. malacophyllum* (Lago *et al.*, 2005).

1.9. Análise por agrupamento hierárquico (HCA) e Análise dos componentes principais (PCA)

Além do planejamento experimental, a estatística multivariada aplicada à química vem sendo freqüentemente utilizada no tratamento de dados analíticos. O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado, e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) (Neto e Moita, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Sharaf *et al.*, 1986).

O uso desses métodos de correlação tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de

agrupamentos naturais entre as amostras. Ambos são classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (Sharaf *et al.*, 1986).

A análise de componentes principais (PCA – do inglês Principal Component Analysis) (Wold *et al.*, 1987) é uma ferramenta de grande aplicação na análise de dados com muitas variáveis que tem sido muito utilizada em diversos campos da ciência.

O PCA é muito empregado nas análises de “fingerprints” de metabólitos (Bailey *et al.*, 2003; Defernez and Colquhoun, 2003; Lindon *et al.*, 2001). A utilização da PCA visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). Organizadas em ordem decrescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs. O primeiro componente principal explica o máximo de variância na série de dados, e os componentes subsequentes descrevem o máximo da parte restante da variância não explicada (Christie *et al.*, 1995).

A análise por agrupamento hierárquico (HCA – do inglês Hierarchical Cluster Analysis), também denominada análise de cluster (CA), é uma coleção de métodos estatísticos, que identifica grupos de amostras que se comportam da mesma forma ou apresentam características semelhantes (“to cluster”: agrupar). A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma, um gráfico bidimensional, onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua

interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (Neto e Moita, 1998). A similaridade é calculada de acordo com o método de aglomeração escolhido.

O método de ligação simples, também chamado de vizinho mais próximo, é de concepção simples. O dendrograma é construído a partir dos pares de objetos mais similares (ou menor distância) e em seguida os objetos ou grupos já formados se reúnem em função da similaridade decrescente (ou distância decrescente). O método de ligação completa, também chamada de “método de aglomeração por diâmetro” e de “vizinho mais distante” é o oposto do anterior. A fusão de dois grupos depende do par de objetos mais distante. Em outros termos, um par de objetos fusionará a um grupo unicamente se for ligado a todos os elementos deste grupo. O resultado é um dendrograma mais “dilatado”, onde os grupos são facilmente evidenciados, mas onde a maior parte das amostras intermediárias permanece isolada, de modo a descobrir fortes descontinuidades (Valentin, 1995).

Figura 12. Representação dos métodos aglomeração de a) ligação simples e b) ligação completa.

2. OBJETIVOS

Este trabalho, desenvolvido no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química, visou a investigação dos principais metabólitos secundários de *Piper reticulatum*, através da análise de suas plantas adultas e plântulas, baseado em dados de HPLC-MS, GC-MS, isolamento dos principais constituintes e caracterização espectroscópica.

Inserido nos estudos de bioprospecção, este projeto também teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos extratos das diversas partes de *P. reticulatum* e de seus produtos isolados contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e o efeito inibitório sobre a enzima acetilcolinesterase.

Finalmente foi realizada uma análise global da composição de metabólitos secundários de um conjunto de espécies que incluíram *P. amalago*, (filogeneticamente relacionada com *P. reticulatum*) *P. crassinervium*, *P. solmsianum*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum*, *P. aduncum* e *P. tuberculatum*, utilizando-se dados espectroscópicos e análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análise dos componentes principais (PCA), com vistas a uma contribuição para o estabelecimento de relações filogenéticas com outras espécies.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais cromatográficos

3.1.1 Solventes empregados

Os solventes utilizados nas extrações, preparação de amostras e cromatografias (CCDA, CCDP, CC, CLV) foram AcOEt , clorofórmio, diclorometano, etanol, hexano e MeOH, devidamente tratados e destilados pela Central de Solventes do Instituto de Química – USP.

Nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizado metanol de grau cromatográfico da marca J. T. Baker, além de água desionizada (18m Ω , Milli-Q, Millipore), todos filtrados e, posteriormente, desgaseificados com auxílio de vácuo e banho de ultra-som.

3.1.2. Cromatografia líquida a vácuo

Os fracionamentos por cromatografia líquida a vácuo foram realizados utilizando um funil de placa sinterizada e um kitassato, conectados a uma bomba de vácuo. Como fases estacionárias foram utilizadas Sílica gel 60 de 0,070-0,200 nm (Sílica comum) e C-18 Preparativo (125Å, 55-105 μ m) da Waters (Coll and Bowden, 2004). As frações foram concentradas sob pressão reduzida utilizando evaporador rotatório.

3.1.3. Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa

As cromatografias em camada delgada analítica foram realizadas em placas de alumínio (cromatofolhas) revestidas com Sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm da Merck. As cromatografias em camada delgada preparativa foram realizadas em placas de vidro de 20x20 cm revestidas com sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck. Estas placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel (65 g) em água desionizada (aproximadamente 120 mL) sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador “Quickfit”, regulado pra produzir camadas de 1,00 mm de espessura. As frações foram extraídas com AcOEt, filtradas, sob vácuo, em funil de placa sinterizada e concentradas sob pressão reduzida utilizando evaporador rotatório. As placas de CCDA e CCDP foram observadas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

3.2. Instrumentação

3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um sistema de cromatografia acoplado a um detector na região do UV com arranjo de diodos (Sistema HPLC-DAD). Foram utilizados um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo SCL-10A, equipado com um detector UV-DAD modelo SPD-M10A, duas bombas modelo LC-10AD e um injetor automático modelo SIL-9A, controlados pelo software CLASS-VP 6.10.

As análises cromatográficas com detecção de fluorescência foram realizadas em um sistema HPLC acoplado a um detector de UV-Vis e um detector de

fluorescência. Foram utilizados um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo CBM-20A, equipado com um detector de UV-Vis modelo SPD-10A, um detector de fluorescência modelo RF-10AXL, duas bombas modelo LC-10AD e um injetor automático modelo SIL-10A, controlados pelo software LC solution versão 1.22 SP1.

A coluna utilizada em todas as análises foi da marca Phenomenex C-18 250 x 4,6mm 5 μ m acoplada a uma pré-coluna de 1cm, de material equivalente.

Determinou-se o melhor gradiente de eluição para o conjunto das amostras (Tabela 4) (extratos brutos, frações e substâncias puras) constituído por uma mistura binária de MeOH e água desionizada, com fluxo de 1mL.min⁻¹ e injeção de 20 μ L da amostra.

Todas as frações analisadas foram solubilizadas em MeOH, e em seguida filtradas em filtro Millex®, 0,45 μ m.

Tabela 4. Método empregado para as análises por HPLC das substâncias puras, frações e extratos dos órgãos de *P. reticulatum*.

Tempo (min)	H ₂ O desionizada (%)	MeOH (%)
0,01	50	50
5,00	50	50
20,00	0	100
25,00	0	100
30,00	50	50
40,00	50	50

3.2.2. HPLC-ESI-MS

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas em um espectrômetro Esquire e de alta resolução em um espectrômetro MicroTOF, ambos da Bruker.

3.2.3. HPLC-ESI-MS-MS

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas seqüencial por electrospray foram realizadas em um espectrômetro Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, analisador de massas do tipo *Ion Trap*, com aquisição no modo positivo.

3.2.4. MS-EI

As análises por espectrometria de massas de baixa resolução por impacto eletrônico foram realizadas em um espectrômetro de massas GC-MS SHIMADZU modelo GCMS-QP5050A, equipado com coluna capilar DB5 (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 m. i.d., 0.25 μ m) a 70 eV. As condições utilizadas foram de 100°C por 2 minutos, em seguida elevando a temperatura 5°C por minuto até atingir a temperatura de 280°C mantido por 10 minutos, encerrando-se a corrida. A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector de 320°C.

3.2.5. Ressonância magnética nuclear

As análises das amostras por ressonância magnética nuclear foram realizadas nos espectrômetros Gemini Varian e Bruker AC operando a 200 MHz para NMR de ^1H e 50 MHz para NMR de ^{13}C . Além desta instrumentação a Central Analítica conta também com espectrômetros Varian Inova operando a 300 MHz para NMR de ^1H e 75 MHz para NMR de ^{13}C e Bruker DRX operando a 500 MHz para NMR de ^1H e 125 MHz para NMR de ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em clorofórmio ou metanol deuterados da Aldrich, e o padrão de referência interno utilizado foi TMS. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

3.2.6. Infravermelho

As análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em filme e em pastilha de KBr no espectrômetro BOMEN MB 100.

3.3. Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

As diversas partes da espécie *Piper reticulatum* foram coletadas na Floresta Nacional de Carajás em 25/02/08, km 03 rodovia Parauapebas-Carajás (PA). A coleta foi realizada com autorização do IBAMA nº 06/08. O material foi identificado pela botânica Dra. Léa Carreira (Museu Paraense Emilio Goeldi, PA) com base em análise de exsicata disponível (nº 559) no Parque Zoobotânico de Carajás.

O material vegetal foi seco em estufa a temperatura de 50° C por 48 horas e moído em moinho de facas. Parte deste material foi extraído duas vezes com AcOEt por dois dias. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório, obtendo-se as massas descritas na tabela 5.

Tabela 5. Massas coletadas das diversas partes de *Piper reticulatum* e de seus extratos.

Tecido	Massa coletada (g)	Massa submetida à extração (g)	Massa do extrato (g)
Folhas	660	260	20,0
Raízes	100	100	3,4
Caule	1550	310	3,4
Frutos	3,77	3,4	0,285
Sementes	3,33	-	-
Folhas das plântulas	15,76	10	2,1
Caules das plântulas	2,07	0,7	0,052
Raízes das plântulas	5,51	4,3	0,141

3.4. Análise preliminar dos extratos das partes de *Piper reticulatum*

Foi realizada preliminarmente uma análise dos extratos das diversas partes de *Piper reticulatum* baseada em CCDA, HPLC e ¹H NMR.

A análise por CCDA indicou uma similaridade no perfil cromatográfico dos extratos tanto sob luz UV 254 quanto 366 nm (Figura 13). Nesse último comprimento de onda, constatou-se a presença de clorofilas, devido à coloração vermelha, e ainda de várias substâncias fluorescentes.

Figura 13. Placa de CCDA dos extratos das partes de *P. reticulatum*, observadas sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm). F - folhas; Fp - folhas das plântulas; C - caule; Cp - caule das plântulas; R - raízes; Rp - raízes das plântulas; Fr - frutos.

A análise feita por HPLC (Figura 14) também revela essa similaridade nos perfis cromatográficos, indicando a presença de duas substâncias majoritárias na maioria dos extratos analisados. O extrato dos frutos apresentou um perfil diferenciado, com predomínio de outros constituintes. O extrato de folhas apresentou um constituinte polar no início da corrida, distintos dos outros órgãos. O método utilizado nas análises por HPLC está descrito na tabela 5.

Figura 14. Cromatogramas (HPLC) dos extratos das partes de *Piper reticulatum*.

O espectro de NMR de ^1H dos extratos das folhas de *P. reticulatum* (Figura 15) apresentou uma maior riqueza de sinais comparando-se com os espectros das outras partes da planta, tais como:

- Singletos em δ 3,8 e em 5,8, característicos de grupos metoxílicos e metilenodioxifenílicos, respetivamente;
- Dois singletos em δ 6,63 e 6,51, multipletos entre δ 6,0-7,0 e δ 7,43-8,11 que podem ser atribuídos à hidrogênios aromáticos e/ou olefínicos;
- Sinais entre δ 1,60 e 3,56 característicos de cadeias alifáticas contendo grupamentos olefínicos;
- Sinais intensos em δ 1,26 que junto com o sinal em δ 0,88 são indicativos da presença de cadeias alifáticas longas e metilas terminais, comuns em extratos brutos.

Figura 15. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato das folhas de *P. reticulatum*.

3.5. Purificação dos metabólitos secundários

3.5.1. Fracionamento do extrato do caule de *P. reticulatum* (K970-C)

Cerca de três gramas do extrato do caule de *Piper reticulatum* (K970-C) foram submetidos à CLV, realizada em funil de placa sinterizada, contendo sílica comum como fase estacionária (Coll and Bowden, 2004). A eluição da fase móvel ocorreu na forma de gradiente, utilizando-se hexano 100%, misturas de hexano e AcOEt em polaridade crescente, AcOEt 100%, AcOEt:MeOH 1:1 e por fim MeOH 100%.

Foram obtidas dez frações, sendo parte da última fração (200 mg) (K970-C-10) foi submetida a CLV em fase reversa (sílica C-18). A eluição foi realizada com gradiente de polaridade decrescente, utilizando os solventes água, MeOH e AcOEt como eluente (iniciando com Água:MeOH 1:1, mistura de água e metanol de forma decrescente de polaridade, MeOH 100%, e finalmente AcOEt 100%).

A análise por CCDA das seis frações desse fracionamento indicou a presença de um composto majoritário na fração K970-C10-1. Esta fração foi submetida a CCDP utilizando como fase móvel a mistura de diclorometano e metanol na proporção de 9,5:0,5, resultando na purificação da substância **1**, a amida diidrowisanidina, isolada pela primeira vez de *P. guinense* (Sondengan *et al.*, 1977).

Figura 16. Fracionamento do extrato do caule de *P. reticulatum*.

3.5.2. Fracionamento do extrato de raízes de *P. reticulatum* (K970-R)

O fracionamento do extrato das raízes de *P. reticulatum* iniciou-se também por CLV com eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e metanol utilizando como fase estacionária sílica comum, obtendo-se quatorze frações. As frações obtidas foram analisadas por CCDA, sendo observada a presença de um composto majoritário e relativamente apolar na fração K970-R4. Tal fração foi submetida a CCDP, utilizando-se como eluente a mistura de solventes hexano e AcOEt (4:1), resultando no isolamento de 12 mg da substância **2**, a amida (2*E*,4*E*)-*N*-isobutileicosa-2,4-dienamida.

A fração K970-R11 foi também fracionada por CLV em fase reversa, sendo obtidas oito frações. Tal procedimento levou ao isolamento da substância **4**, uma

lignana, conhecida como siringaresinol (K970-R11-2, 10 mg), e a identificação através de GC-MS da substância **2** (K970-R11-5), a amida wisanidina (Figura 10).

As substâncias identificadas no extrato das raízes já são conhecidas em espécies de *Piper*, porém descritas pela primeira vez em *P. reticulatum*.

Figura 17. Fracionamento do extrato das raízes de *P. reticulatum*.

3.5.3. Fracionamento do extrato da folhas de *P. reticulatum* (K970-F)

Cerca de 1,0 g do extrato em AcOEt das folhas de *P. reticulatum* foi submetida a CLV em fase reversa (sílica C-18) realizada em funil de placa sinterizada, originando onze frações (Figura 5). Com a fração 5 oriunda deste fracionamento foi realizada uma CCDP, utilizando como fase móvel a mistura de

hexano e AcOEt na proporção de 7:3, sendo isolado 8,0 mg da substância **5**, identificada como benzoato de cianobenzila.

A fração 11 por sua vez foi submetida a CLV de sílica comum, com eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e metanol, obtendo-se 9 frações. A partir da fração 3 deste fracionamento foi purificada a substância **6** (16 mg) identificada como (3*E*,5*E*,14*E*)-*N*-pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida, através de CCDP, utilizando a mistura de CHCl₃ e MeOH na proporção 9,5:0,5 como fase móvel.

Figura 18. Esquema do fracionamento do extrato das folhas de *P. reticulatum*.

3.5.4. Fracionamento do extrato de frutos de *P. reticulatum* (K970-Fr)

Cerca de 200 mg do extrato em AcOEt das frutos de *Piper reticulatum* (K970-Fr) foram submetidos à CLV, contendo sílica comum como fase estacionária. A eluição da fase móvel ocorreu na forma de gradiente, utilizando-se hexano 100%, misturas de hexano e AcOEt em polaridade crescente, AcOEt 100%, AcOEt:MeOH 1:1 e por fim MeOH 100%. Este fracionamento originou 20 frações, sendo que as frações Fr-5 e Fr-6 foram submetidas à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização pro electrospray de segunda ordem (LC-ESI-MS-MS) sendo identificadas as amidas **7**, **8**, **9** e **10**.

Figura 19. Esquema do fracionamento do extrato dos frutos de *P. reticulatum*.

3.6. Atividade Biológica

3.6.1. Atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

Para a realização dos ensaios antifúngicos contra fitopatógenos, desenvolvidos no Instituto de Botânica (SMA-SP), sob supervisão da Prof. Dra. Maria Cláudia Marx Young, foram utilizados os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC 140 e *C. sphaerospermum* (Penzig) SPC 491. A metodologia utilizada apresenta diversas vantagens para a bioprospecção. A técnica é simples, rápida em sua execução e apresenta resultados diretos. Uma vantagem que deve ser levada em consideração é a possibilidade de se realizar os ensaios, independente do solvente necessário para a preparação das amostras. Uma vez que o solvente não permanece na amostra quando a solução de esporos é borrifada os resultados não sofrem interferência dos mesmos e a solubilidade em água não é pré-requisito como em outros ensaios de atividade biológica.

Por outro lado, a técnica é indicada para ensaios preliminares devido à pequena resolução e a obtenção de quantidade inibitória mínima de forma não quantitativa. Além disso, os halos de inibição devem ser observados a olho nu, ao invés de um analisador de imagens, o que seria mais apropriado.

Os fungos são semeados com a ajuda de uma alça de platina na superfície de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e incubadas a 22 °C, no escuro, por 14 dias. A extração dos esporos foi realizada com uma solução de sais minerais e glicose na proporção de 6:1 e o auxílio de um pincel. A suspensão foi então filtrada

3.6.2. Ensaio para inibidores de acetilcolinesterase

O ensaio realizado na prospecção para compostos com atividade inibidora de acetilcolinesterase foi o descrito por Marston e colaboradores (Marston *et al.*, 2002), também desenvolvidos sob supervisão da Prof. Dra. Maria Cláudia Marx Young, no Instituto de Botânica.

Assim como no ensaio antifúngico, as amostras dos extratos brutos foram submetidas a CCDA com o sistema de solvente hexano:AcOEt (7:3). Após a evaporação total do solvente, a placa foi borrifada com uma solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos e, em seguida, borrifada com a Solução D. A coloração violácea desenvolve-se em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração violácea sugere uma inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. As placas foram documentadas em câmera fotográfica. A fisostigmina foi utilizada como controle positivo.

Em uma segunda etapa, soluções das amostras das substâncias puras, possivelmente responsáveis pela atividade inibidora da acetilcolinesterase no ensaio realizado com os extratos, foram preparadas nas concentrações 1, 0,75, 0,5 e 0,1 µg/2,5 µL e aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada analíticas e eluídas com solvente adequado (Hexano:AcOEt 7:3) e procedendo-se da mesma maneira para com as amostras dos extratos de *P. reticulatum*. As placas foram também documentadas em câmera fotográfica. A fisostigmina (0,1 µg) (Figura 21) foi utilizada como controle positivo.

Soluções:

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

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

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

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

Figura 21. Estrutura da Fisostigmina

3.7. Análise por agrupamento hierárquico (HCA) e Análise dos componentes principais (PCA)

3.7.1. Análise por MS-ESI

As amostras para análise por MS-ESI foram dissolvidas em MeOH na concentração 1 mg/mL e filtradas com filtros de 0,45 µm. A análise por espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Quattro II triploquadrupolo (Micromass, Manchester, U.K.) em modo “electrospray” positivo, voltagem do capilar 4,5 kV e do skimmer 70 V, o fluxo do gás nitrogênio nebulização e secagem foi de 250 e 30 L/h. O fluxo da fase móvel foi de 50 µL/min. As amostras foram injetadas por infusão direta e os dados foram processados pelo programa *Masslynx* (Micromass) versão 3.2 .

3.7.2. Tratamento dos dados obtidos por MS-ESI

A série de dados obtidos por MS-ESI no modo positivo foram submetidas à análise de componentes principais utilizando o software The Unscrambler versão 9.5. (CAMO Process AS, Noruega) e a análise por agrupamento hierárquico por ligação simples e distância euclidiana, utilizando o software Statistica versão 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação estrutural dos metabólitos secundários isolados

O estudo fitoquímico de *P. reticulatum* levou ao isolamento de seus principais metabólitos secundários, sendo purificadas quatro amidas (**1-3** e **6**), uma lignana (**4**) e uma nitrila (**5**). Foi detectada principalmente a presença de amidas em seus extratos, sendo o componente majoritário na espécie a diidrowisanidina (**1**) (Figura 22), previamente isolada de *P. guineense* (Sondengan *et al.*, 1977), além de já ter sido descrita em *P. reticulatum* (Maxwell *et al.*, 1998).

4.1.1. Substância 1

A substância **1** foi isolada como um sólido amarelo (14 mg) a partir do extrato em AcOEt do caule de *P. reticulatum*, sendo identificada como a amida diidrowisanidina (Figura 22). Sua estrutura foi determinada com base na análise dos dados dos espectros de NMR de ^1H , de ^{13}C , IV, MS-ESI e por MS-EI, sendo os dados de NMR de ^1H e ^{13}C comparados com os da literatura (Sondengan *et al.*, 1977; Maxwell *et al.*, 1998).

O espectro de massas de alta resolução por electrospray, gerado no modo positivo (Figura 23), forneceu um pico em m/z de 304,1540, referente à $[\text{M}+\text{H}]^+$, e um pico em 326,1351 referente à $[\text{M}+\text{Na}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}$. O espectro de massas de baixa resolução, com ionização por impacto de elétrons (Figura 24), forneceu um pico em m/z 303 referente ao $[\text{M}]^{+}$, além disso, destacou-se a presença do pico base em m/z 165, gerando o íon fragmentário de

fórmula $C_9H_{10}O_3^+$. Foram observados outros íons fragmentários em m/z 205 ($C_{12}H_{13}O_3^+$), 135 ($C_8H_7O_2^+$) e 121 ($C_7H_5O_2^+$).

No espectro de NMR de 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) (Figura 26) foram observados dois singletos em δ 3,76 e 5,88 referentes aos grupos metoxílico e metilenodioxifenílico, respectivamente, e outros dois singletos em δ 6,63 e 6,51 indicativos de um sistema aromático 1,2,4,5-tetrassubstituído (H7 e H10). Foram observados um dubleto em δ 6,08 ($J=15,2$ Hz, 1H, H2) e um duplo tripleto em δ 6,93 ($J=15,2$ e 6,8 Hz, 1H, H3) indicando a configuração *trans* entre os hidrogênios olefínicos α,β -conjugados. Um quarteto em δ 2,44 (2H, H4) e um tripleto em δ 2,68 ($J = 7,0$ Hz, 2H, H5) relativos aos prótons alifáticos adjacentes a olefina, um multipletto em δ 1,82 (4H, H2'e H3') e um quarteto em δ 3,50 (4H, H1'e H4') relativos aos hidrogênios que compõem o anel nitrogenado.

No espectro de NMR de ^{13}C (Figura 27) foram observados dezessete sinais, sendo o sinal em δ 164,9 referente ao carbono carbonílico (C1) sugestivo de amida, em δ 100,9 referente ao carbono do grupo metilenodióxi e da metoxila em δ 56,3. Os sinais em δ 121,7 (C6), 109,6 (C7), 140,6 (C8), 146,2 (C9), 94,6 (C10) e 152,2 (C11) referem-se aos carbonos aromáticos, enquanto que os sinais em δ 121,8 (C2), 145,0 (C3) são referentes aos carbonos da dupla ligação. Sinais observados em δ 32,9 (C4) e 28,9 (C5) referem-se aos carbonos sp^3 adjacentes a insaturação e os sinais em δ 45,7 (C1'), 24,2 (C2'), 25,0 (C3') e 46,4 (C4') referentes aos carbonos sp^3 do anel nitrogenado.

Figura 22. Estrutura da diidrowisanidina (1)

Tabela 6. Dados espectrais de NMR de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 200 e 50MHz) para a substância **1** comparados com dados da literatura (δ em ppm).

Posição	Dados obtidos		Literatura (Sondengam <i>et al.</i> , 1977) ^a ; (Maxwell <i>et al.</i> , 1998) ^b	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz) ^a	δ_{C} ^b
1	-	164,9	-	164,87
2	6,08 (dt, 15,0 e 7,0)	121,8	6,10 (d, 16,0)	121,81
3	6,93 (dt, 15,0 e 7,0)	145,0	6,97 (m, 16,0)	145,02
4	2,44 (q)	32,9	-	32,97
5	2,68 (t, 7,0)	28,9	2,47 (t)	29,04
6	-	121,7	-	121,67
7	6,63 (s)	109,6	-	109,68
8	-	140,6	-	140,62
9		146,2	-	146,16
10	6,51 (s)	94,6	6,52 (s)	94,57
11	-	152,2	-	152,30
1'	3,50 (quarteto)	45,7	3,50 (t)	45,76
2'	1,82 (m)	24,2	1,90 (m)	24,32
3'	1,82 (m)	25,0	1,90 (m)	26,09
4'	3,50 (quarteto)	46,4	3,50 (t)	46,47
OCH₂O	5,88 (s)	100,9	5,88 (s)	100,90
OMe	3,76 (s)	56,3	3,76 (s)	56,31

Figura 23. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 1.

Figura 24. Espectro de massas (EI) da substância 1.

Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido em pastilha KBr da substância 1.

Figura 26. Espectro de NMR de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da substância 1.

Figura 27. Espectro de NMR de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) da substância 1.

4.1.2. Substância 2

A substância **2** foi identificada como a amida wisanidina (Figura 28), baseada nos dados de MS-ESI e MS-EI. Esta substância foi identificada em uma fração, juntamente com a substância **1** (figura 34) devido a semelhança de suas estruturas.

O espectro de massas por electrospray (ESI) (Figura 29), gerado no modo positivo forneceu um pico em m/z de 302,2 referente à $[M+H]^+$, e um pico em m/z de 324 referente à $[M+Na]^+$, sugerindo a formula molecular $C_{17}H_{19}NO_4$. O espectro de massas por impacto eletrônico (EI) (Figura 30) forneceu um pico correspondente ao íon molecular em m/z 301, além do pico base em m/z 231, sugerindo a fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_4^+$. Foram observados os íons fragmentários em m/z 201 ($C_{12}H_9O_3^+$), 173 ($C_{11}H_9O_2^+$) em 70 ($C_4H_8N^+$). A partir destes dados foi possível identificar a estrutura da amida, que foram corroborados pelos dados descritos (Achenbach *et al.*, 1986).

Figura 28. Estrutura da wisanidina (**2**)

Figura 29. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância **2**.

Figura 30. Espectro de massas (EI) da substância **2**.

4.1.2. Substância 3

A substância **3** foi isolada como um sólido branco (12 mg) a partir do extrato em AcOEt das raízes de *P. reticulatum*, sendo identificada como sendo a amida (2*E*,4*E*)-*N*-isobutileicosa-2,4-dienamida (Figura 31). Sua estrutura foi identificada através da análise dos dados de NMR de ^1H , ^{13}C , IV, MS-ESI e MS-EI e comparação com os da literatura (Shihua *et al.*, 2004).

O espectro de massas por electrospray (ESI) (Figura 32), gerado no modo positivo, forneceu um pico em m/z de 364,4 referente à $[\text{M}+\text{H}]^+$ e um pico em m/z de 386,3 referente a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{NO}$. O espectro de massas por impacto eletrônico (EI) (Figura 33) forneceu um pico em m/z de 363 referente ao $[\text{M}]^+$. Observaram-se ainda íons fragmentários em m/z 291 gerando o íon fragmentário de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{O}^+$, em m/z 180 ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}$), 152 ($\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}^+$), em 126 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}^+$) e a presença do pico base em m/z 43 (CHNO^+).

No espectro de NMR de ^1H (Figura 35) observam-se sinais característicos de isobutilamidas em δ 3,17 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H1') referente aos hidrogênios adjacentes ao átomo de nitrogênio; em δ 1,81 (m, 1H, H2') atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono sp^2 e, em δ 0,91 o sinal relativo às metilas deste grupo (6H, H3' e H4') foi ocultado pelo sinal da metila terminal da cadeia lateral, um tripleto em δ 0,91 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, H20), além de um singleto largo em δ 5,51 referente ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio. Um dubleto em δ 5,75 ($J = 16,0$ Hz, 1H, H2), um multiplete em δ 7,18 (1H, H3) e um multiplete em δ 6,09 (2H, H4 e H5) indica a presença de hidrogênios em um sistema conjugado, podendo se tratar de um sistema *trans-trans*, sendo os dados idênticos aos descritos (Shihua *et al.*, 2004). Foram observados também um multiplete em δ 2,13 (2H, H6) atribuído aos hidrogênios conjugados a olefina e um singleto intenso em δ 1,256 (26H, H7 – H19) referente aos hidrogênios da cadeia lateral.

No espectro de NMR de ^{13}C (Figura 36) foi observado um sinal em δ 166,4 sugestivos da presença de carbono carbonílico característico de amidas. Os sinais em δ 121,7 (C2), 141,3 (C3), 128,2 (C4), e em 143,2 (C5) são referentes aos carbonos sp^2 das insaturações da cadeia lateral. Foi observado ainda um conjunto de sinais sobrepostos indicando a presença de uma longa cadeia alquílica em δ 32,9 (C6), 29,7 – 29,2 (C7 – C17), 31,9 (C18), 22,7 (C19), e em δ 14,1 (C20) referente a metila. Os sinais atribuídos à porção isobutílica da molécula foram observados em δ 46,9 (C1'), atribuído ao carbono adjacente ao átomo de nitrogênio; em δ 28,6 (C2'), referente ao carbono sp^2 e, em δ 20,1 (C3' e C4'), sinal atribuído as duas metilas equivalentes.

Figura 31. Estrutura da (2E,4E)-N-isobutyleicosa-2,4-dienamida (**3**)

Tabela 7. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 200 e 50 MHz) para a substância **3** e dados da literatura (δ em ppm).

Posição	Dados obtidos		Literatura (Shihua <i>et al.</i> , 2004)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	166,4		166,6
2	5,75 (d, 16,0)	121,7	5,74 (d, 15,0)	121,9
3	7,18 (m)	141,3	7,19 (m)	141,6
4	6,09 (t, 7,0)	128,2	6,09 (m)	128,4
5	6,09 (t, 7,0)	143,2	6,07 (m)	143,5
6	2,13 (m)	32,9	2,14 (m)	33,0
7 - 17	1,26 (s)	29,7 – 29,2	1,40 – 1,25 (m)	28,8 - 29,9
18	1,26 (s)	31,9	1,40 – 1,25 (m)	32,0
19	1,26 (s)	22,7	1,40 – 1,25 (m)	22,9
20	0,91 (t, 7,0)	14,1	0,87 (t, 7,0)	14,3
1'	3,17 (t, 6,0)	46,9	3,64 (t, 6,4)	47,1
2'	1,81 (m)	28,6	1,78 (m)	28,8
3' e 4'	0,91 (t, 7,0)	20,1	0,92 (d, 6,5)	20,3
NH	5,51 (br, s)	-	5,49 (br, s)	-

Figura 32. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância **3**.

Figura 33. Espectro de massas (EI) da substância **3**.

Figura 34. Espectro na região do infravermelho obtido em filme da substância **3**.

Figura 35. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **3**.

Figura 36. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) da substância **3**.

4.1.3. Substância 4

A substância **4** foi isolada como um sólido branco (10 mg) a partir do extrato em AcOEt das raízes de *P. reticulatum* e foi identificada como sendo a lignana furofurânica siringaresinol (Figura 37). Sua estrutura foi determinada através da análise dos espectros de NMR de ^1H , de ^{13}C , MS-ESI e por MS-EI, sendo os dados de NMR de ^1H e ^{13}C comparados com os da literatura (Monteiro *et al.*, 2007).

O espectro de massas obtido por electrospray (Figura 38) no modo negativo forneceu um pico em m/z de 417,0, referente à $[\text{M}-\text{H}]^-$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$. O espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 39) forneceu um pico em m/z 418 correspondente ao $[\text{M}]^{+*}$, confirmando sua fórmula molecular. Além disso, foram observados íons fragmentários em m/z 236 ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4^-$) e em m/z 181 ($\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4^-$). A proposta do mecanismo que justifica tais íons fragmentários é descrita na figura 40, de acordo com dados descritos (Ricci *et al.*, 2008).

No espectro de NMR de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) (Figura 41) observou-se um singleto intenso em δ 3,84 referente às metoxilas (12H), um singleto em δ 6,66 atribuído aos hidrogênios aromáticos (4H, H2, H2', H6 e H6'). Um dubleto em δ 4,72 ($J = 4,0\text{Hz}$, 2H, H7 e H7') e um quarteto em δ 3,14 (2H, H8 e H8') é atribuído aos hidrogênios sp^2 do grupo furofurano, e um quarteto em δ 4,26 e um multipletto em δ 3,88 (4H, H9 e H9') referentes aos carbonos sp^3 deste grupo.

No espectro de NMR de ^{13}C (Figura 42) foram observados sinais dos sistemas aromáticos em δ 149,3 (C3, C3', C5 e C5') referentes aos carbonos ligados as metoxilas, em δ 133,1 (C4 e C4') referentes aos carbonos ligados as hidroxilas, e em δ 130,7 (C1 e C1') referentes aos carbonos ligados aos sistemas furofurânicos.

Os sinais em δ 104,5 (C2, C2', C6 e C6') são atribuídos aos carbonos sp^2 também dos sistemas aromáticos. Os sinais observados em δ 87,6 (C7 e C7') são referentes aos átomos de carbonos sp adjacentes aos oxigênios do grupo furofurano. Os sinais em δ 72,8 (C9 e C9') são atribuídos aos carbonos sp^2 ligados aos oxigênios e os sinais em δ 55,5 (C8 e C8') atribuídos aos demais carbonos sp^2 deste grupo. Os sinais das metoxilas são observados em δ 56,8 (OMe_s).

Esta lignana é descrita na espécie de *Piper betle* (Huang *et al.*, 2010), e também descrita em diversas famílias apresentando atividade biológica, destacando-se atividade citotóxica (Wang *et al.*, 2011; Matsuo e Mimaki, 2010), além de atividade antiinflamatória e antioxidante (El-Desouky e Gamal-Eldeen, 2009).

Figura 37. Estrutura da lignana siringaresinol (4)

Tabela 8. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CD_3OD 200 e 50MHz) para a substância **4** comparados com dados da literatura (δ em ppm).

Posição	Dados obtidos		Literatura (Monteiro <i>et al</i> , 2007)	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1 e 1'	-	133,1	-	134,7
2 e 2'	6,66 (s)	104,5	6,59 (s)	103,6
3 e 3'	-	149,3	-	147,9
4 e 4'	-	130,7	-	131,4
5 e 5'	-	149,3	-	147,9
6 e 6'	6,66 (s)	104,5	6,59 (s)	103,6
7 e 7'	4,72 (d, 4,0)	87,6	4,61 (d, 4,0)	85,3
8 e 8'	3,14 (quarteto)	55,5	3,04 (m)	53,6
9 e 9'	4,26 e 3,88 (m)	72,8	4,15 e 3,77 (dd, 5,0 e 7,0)	71,0
OMe_s	3,84 (s)	56,8	3,75 (s)	56,0

Figura 38. Espectro de massas (ESI – modo negativo) da substância **4**.

Figura 39. Espectro de massas (EI) da substância 4.

Figura 40. Proposta do mecanismo de fragmentação da substância 4 (Ricci *et al.*, 2008).

Figura 41. Espectro de NMR de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) da substância **4**.

Figura 42. Espectro de NMR de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz) da substância **4**.

4.1.5. Substância 5

A substância **5** foi isolada como uma substância oleosa incolor a partir do extrato em AcOEt das folhas de *P. reticulatum*. Sua estrutura (Figura 43) foi determinada a partir interpretação dos dados de NMR de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, IV, MS-ESI e MS-EI.

O espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray gerado no modo positivo (Figura 44) indicou um pico íon molecular em m/z 260,0686 referente à $[\text{M}+\text{Na}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (calculado 260,0687). O espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 45) forneceu um pico em m/z 237 referente ao $[\text{M}]^{+}$, indicativo da presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura devido o número ímpar de sua massa molecular. Além disso, o pico base é observado em m/z 105, compatível com o íon fragmentário $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$ (ArCO^+), em m/z 116, referente ao íon fragmentário $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}^+$ e em m/z 77, compatível com o íon fragmentário C_6H_5^+ (Ar^+).

O espectro de absorção na região do infravermelho obtido em pastilha de KBr (Figura 46) apresenta bandas em 3067 e 3037 cm^{-1} atribuídas à deformação axial C – H de sistemas aromáticos e em 2929 e 2855 cm^{-1} referente à deformação axial C – H. Uma banda intensa observada em 1732 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de carbonila característica de ésteres conjugados.

No espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) (Figuras 47-49) são observados um duplo dubleto em δ 8,07 ($J = 1,2$ e 8,4, 2H, H3 e H7), e dois multipletos em δ 7,62 e 7,48, integrando para 3 e 5 hidrogênios respectivamente (H4 - H6, H10 - H14) indicativo da presença de dois sistemas aromáticos monossustituídos. Observa-se também um singlete em δ 6,68 (1H, H8), referente ao próton ligado ao carbono

carbinólico (H–C–O). Desta forma nota-se a presença de onze átomos de hidrogênio em tal estrutura, corroborando com a fórmula molecular determinada a partir do espectro de massas de alta resolução (ESI).

O espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) (Figuras 50-51) apresenta onze sinais, sendo quatro de carbono quaternário, três referentes a carbonos sp^2 e quatro sinais de maior intensidade referentes a oito carbonos sp^2 (quatro carbonos equivalentes) totalizando quinze átomos de carbono, estando de acordo com a fórmula molecular determinada. O sinal em δ 164,6 é atribuído a carbono carbonílico característico de ésteres, em δ 63,3 (C8) um sinal referente ao carbono carbinólico e em δ 116,2 outro sinal referente ao carbono quaternário do grupo nitrila. Sinais em δ 128,1 (C2), 130,1 (C3 e C7), 129,3 (C4 e C6) e em 134,1 (H5) são atribuídos aos carbonos do anel aromático conjugado a carbonila. Os sinais observados em δ 131,9 (C9), 127,9 (C10 e C14), 128,6 (C11 e C13) e em 130,4 (C12) correspondem aos carbonos aromáticos adjacentes ao carbono carbinólico.

De acordo com o experimento bidimensional HSQC (Figuras 52-53) observa-se que o singlete em δ 6,68 está diretamente ligado ao carbono carbinólico em δ 63,3. O duplo dubleto em δ 8,02 corresponde aos hidrogênios equivalentes do anel aromático adjacentes a carbonila, ligados aos carbonos em δ 130,1 (C3 e C7). Além disso, foram observadas correlações dos hidrogênios dos dois sistemas aromáticos que aparecem em δ 7,47 e δ 7,61 com seus respectivos carbonos (Tabela 6).

Através do experimento de HMBC (Figuras 54-56) foi possível confirmar esta estrutura, pois além das correlações nos sistemas aromáticos, são observadas correlações (3J) dos hidrogênios em δ 8,02 (H3 e H7) com a carbonila em δ 164,6 (C1). O sinal do hidrogênio em δ 6,68 (H8) é correlacionado com a carbonila, com os

carbonos em δ 127,8 (C10 e C14) e δ 131,9 (2J , C9) do sistema aromático ligado ao carbono carbinólico e com o carbono da nitrila em δ 116,1 (C15) (Figura 35).

Com base neste conjunto de dados a estrutura proposta para este composto foi determinada como benzoato de cianobenzila, ou benzoato de mandelonitrila. Essa nitrila foi anteriormente identificada no óleo essencial da espécie *Malania oleifera* (Liu *et. al.*, 2007), pertencente à família Olacaceae, e também como secreções de defesa de insetos (Duffey *et al.*, 1977). Diversos estudos relacionados à obtenção do benzoato de mandelonitrila por síntese foram descritos (Zhang e Shi, 2006).

Figura 43. Estrutura da substância **5** e correlações observadas no mapa de contornos HMBC $^3J_{H-C}$.

Tabela 9. Dados espectrais de NMR de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 , 500 e 50MHz) e correlações HMBC para a substância **5** (δ em ppm).

Posição	Dados obtidos			Literatura *	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (3J)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	164,6	-	-	164,6
2	-	128,1	-	-	128,0
3 e 7	8,07 (dd, 1,2 e 8,4)	130,1	130,1 / 134,2 / 164,6	8,07 (m)	130,1
4 e 6	7,48 (m)	129,3	129,3 / 128,1	7,50 (m)	129,2
5	7,62 (m)	134,1	130,1	7,60 (m)	134,1
8	6,68 (s)	63,3	116,1 / 127,8 / 131,9 / 164,6	6,68 (s)	63,3
9	-	131,9	-	-	131,8
10 e 14	7,62 (m)	127,9	63,3 / 130,4	7,60 (m)	127,8
11 e 13	7,48 (m)	128,6	131,9 / 128,6	7,50 (m)	128,6
12	7,48 (m)	130,4	127,8	7,50 (m)	130,4
15	-	116,2	-	-	116,2

*Zhang, 2006 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

Figura 44. Espectro de massas (HRESI – modo positivo) da substância **5**.

Figura 45. Espectro de massas (EI) da substância **5**.

Figura 46. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido em pastilha de KBr da substância **5**.

Figura 47. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância **5**.

Figura 48. Espectro de NMR de ^1H da substância **5** – ampliação da região entre δ 6,50 e 8,2.

Figura 49. Espectro de NMR de ^1H da substância 5 – ampliação da região entre δ 7,4 e 8,2.

Figura 50. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 5.

Figura 51. Espectro de NMR de ^{13}C da substância **5** – ampliação da região entre δ 114 e 137.

Figura 52. Mapa de contorno HSQC (CDCl_3 , 300 MHz) da substância **5**.

Figura 53. Mapa de contorno HSQC da substância **5** – ampliação da região entre δ_{H} 7,35 e 8,2.

Figura 54. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) da substância **5**.

Figura 55. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 300 MHz) da substância **5** – ampliação da região entre δ_{H} 6,5 e 8,4.

Figura 56. Mapa de contornos HMBC da substância **5** – ampliação da região entre δ_{C} 113 e 138.

4.1.1. Substância 6

A substância **6** foi isolada como um sólido branco a partir do extrato em AcOEt das folhas de *P. reticulatum*. Sua estrutura (Figura 57) foi determinada a partir interpretação dos dados de NMR de ^1H , ^{13}C , COSY, MS-ESI e MS-EI.

O espectro de massas por electrospray (ESI) (Figura 58), gerado no modo positivo forneceu um pico em m/z de 360,2 referente à $[\text{M}+\text{H}]^+$, indicativo da presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura devido o número ímpar de sua massa molecular. Um pico em m/z de 719,6 é referente a $[2\text{M}+\text{H}]^+$ e um pico em m/z 741,6 referente a $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, sugerindo a formula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}$. O espectro de massas por impacto eletrônico (EI) (Figura 59) forneceu um pico correspondente ao íon molecular em m/z 359, e íons fragmentários característicos de amidas pirrolidínicas em m/z 70 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^-$) e em m/z 98 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}^+$) representados na figura 59.

No espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) (Figura 60) o dubleto em δ 3,08 ($J = 6,0$ Hz, 2H, H2) refere-se aos hidrogênios ligados ao carbono adjacente a carbonila. Os multipletos observados em δ 5,68 (2H, H4, e H6), δ 6,04 (2H, H3 e H5) e o tripleto em δ 5,35 ($J = 5,0$, 2H, H14 e H15) correspondem aos hidrogênios olefínicos. Os sinais referentes aos prótons alifáticos adjacentes as olefinas são observados nos multipletos em δ 2,03 (6H, H7, H13 e H16). Os demais hidrogênios que compõem a cadeia alquílica são observados no sinal em δ 1,25 (16H, H8 – H12, H18 e H19) e no tripleto em δ 0,89 ($J = 3,0$, 3H, H20) este último referente a metila. Os prótons que compõem o anel nitrogenado são observados nos multipletos em δ 3,46 (4H, H1' e H4') e em δ 1,90 (4H, H2' e H3').

No espectro de carbono (Figura 61-63) foi observado um sinal em δ 169,6 sugerindo a presença de carbono carbonílico característico de amidas e um sinal em δ 39,2 referente ao carbono sp^3 adjacente a carbonila. Os sinais em δ 123,7 (C3), 134,3 (C4), 133,4 (C5), 129,9 (C6), 129,7 (C14) e em 129,8 (C15) são referentes aos carbonos sp^2 das insaturações. Foram observados ainda um conjunto de sinais atribuídos a cadeia lateral em δ 32,6 (C7), 31,8 (C13) e em 31,9 (C16) referentes aos carbonos sp^3 adjacentes às insaturações. O sinal referente ao C18 encontra-se sobreposto ao sinal do C13 (δ 31,8) e o sinal em δ 24,4 refere-se ao carbono adjacente a metila. Os sinais entre δ 26,1 – 29,7 (C8 – C12, C17), referem-se aos demais carbonos sp^3 da cadeia alifática e o sinal em δ 14,0 (C20) referente a metila terminal. Os sinais em δ 46,6 (C1'), 45,8 (C4'), 22,3 (C2') e 22,6 (C3') são referentes aos carbonos sp^3 do anel nitrogenado.

A análise do espectro de COSY (Figura 64) permitiu verificar as posições das insaturações nos carbonos 3 e 4 devido às correlações de sinais em δ 3,10 (H2) – 5,75 (H4) e em δ 5,75 (H4) – 6,10 (H5). A posição da insaturação no carbono 14 foi identificada através da análise do espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 10).

Figura 57. Estrutura da (3E,5E,14E)-N-pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida (**6**).

Tabela 10. Dados espectrais de NMR de ^1H , ^{13}C e COSY (CDCl_3 200, 50 e 300 MHz) para a substância **6** (δ em ppm).

Posição	Dados obtidos		
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	COSY
1	-	169,6	-
2	3,08 (d, 6,0)	39,2	H ₄
3	6,04 (m)	123,7	H ₄
4	5,68 (m)	134,3	H ₂ , H ₃ , H ₅
5	6,04 (m)	133,4	H ₄ , H ₆
6	5,68 (m)	129,9	H ₅
7	2,02 (m)	32,6	H ₈
8	1,25 (m)	26,1-29,7	H ₇
9	1,25 (m)	26,1-29,7	-
10	1,25 (m)	26,1-29,7	-
11	1,25 (m)	26,1-29,7	-
12	1,25 (m)	26,1-29,7	H ₁₃
13	2,03 (m)	31,8	H ₁₂ , H ₁₄ , H ₁₅
14	5,35 (m)	129,7	H ₁₃ ,
15	5,35 (m)	129,8	H ₁₆
16	2,03 (m)	31,9	H ₁₅ , H ₁₇
17	1,25 (m)	26,1-29,7	H ₁₆
18	1,25 (m)	31,8	-
19	1,25(m)	24,4	H ₂₀
20	0,89 (t, 3,0)	14,0	H ₁₉
1' e 4'	3,46 (m)	46,6 / 45,8	H _{2'} , H _{3'}
2' e 3'	1,90 (m)	22,3 / 22,6	H _{1'} , H _{4'}

Figura 58. Espectro de massas (ESI – modo positivo) da substância 6.

Figura 59. Espectro de massas (EI) da substância 6.

Figura 60. Espectro de NMR de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância 6.

Figura 61. Espectro de NMR de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da substância 6.

Figura 62. Espectro de NMR de ^{13}C da substância **6** – ampliação da região entre δ 122 e 136.

Figura 63. Espectro de NMR de ^{13}C da substância **6** – ampliação da região entre δ 8 e 52.

Figura 64. Espectro de COSY da substância **6**.

4.2. Identificação de amidas através de espectrometria de massas

4.2.1. Identificação de amidas através de HPLC-ESI-MS-MS

As amidas apresentam um padrão de fragmentação característico em seus espectros de massas obtidos por electrospray, tanto com relação à porção amida quanto a sua cadeia lateral (Jiang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007). Baseado nestes estudos, algumas frações dos extratos das partes de *P. reticulatum* foram submetidas à análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por electrospray em sequência (HPLC-ESI-MS-MS). Este procedimento é bastante conveniente, devido eficiência e sensibilidade do método, principalmente para

compostos minoritários em misturas complexas, difíceis de identificar por métodos tradicionais (Sun *et al*, 2007).

Algumas frações dos extratos de folhas e frutos foram analisadas por HPLC, tendo sido observado que as frações Fr-5 e Fr-6 provenientes do fracionamento do extrato dos frutos, e a fração F-16-6 proveniente do fracionamento do extrato das folhas apresentaram um perfil rico em picos cromatográficos, atribuídas a compostos não identificados. Em seguida, foram otimizadas as condições cromatográficas, bem como a detecção para os compostos de interesse (Tabela 11), objetivando a análise por HPLC-ESI-MS-MS.

Tabela 11. Métodos cromatográficos e comprimentos de onda utilizados nas análises de HPLC-ESI-MS-MS.

Fração	Composição da fase móvel (v/v)	Comprimento de onda (nm)	Tempo de análise (min)
Fr-5	MeOH:H ₂ O / 9:1 (isocrático)	280	45
Fr-6	MeOH:H ₂ O / 8,5:1,5 (isocrático)	260	80
F-16-6	MeOH:H ₂ O (7,5:2,5)/(5')-(9:1)/(50')-(7,5:2,5)/(60')	230	80

A análise dos espectros de massas (MS-MS) da fração Fr-5 (Figuras 66, 68 e 70) possibilitou a identificação das amidas **7** (Figura 67), **8** (Figura 69) e **9** (Figura 71), tendo sido determinadas como isobutilamidas, devido a perda de 73Da (C₄H₁₁N) e 101Da (C₅H₁₁NO⁺) (Figura 67). Com relação aos compostos **7** e **8**, os íons fragmentários em *m/z* 121, 135 e 149 indicam a presença de três insaturações na cadeia alifática, duas conjugadas a carbonila e uma localizada no C-6 a partir do final da cadeia alquílica. Tais atribuições foram descritas em trabalhos (Sun *et al*,

2007; Jiang *et al.*, 2009), nos quais os dados foram atribuídos com base em análises de compostos isolados.

Figura 65. Cromatograma de íons da fração Fr-5.

Figura 66. Espectro de massas (MS-MS) da substância 7.

Figura 67. Proposta de mecanismo de fragmentação da substância 7 (Jiang *et al.*, 2009).

Figura 68. Espectro de massas (MS-MS) da substância 8.

Figura 69. Estrutura da substância 8 (*N*-isobutyleicosa-2,4,14-trienamida).

Figura 70. Espectro de massas (MS-MS) da substância **9**.

Figura 71. Estrutura da substância **9** (*N*-isobutyl-octadeceno-2-enamida).

Além destes compostos, foram observados alguns espectros de massas com picos de massa molecular ímpar, característicos de compostos nitrogenados (Figura 72), porém não foi possível obter mais informações a partir de estudos de fragmentação.

Figura 72. Espectros de massas (ESI - modo positivo) de compostos nitrogenados presentes na fração Fr-5.

O resultado da análise realizada com a fração Fr-6 possibilitou constatar a presença de compostos com o mesmo tipo de estrutura identificado na fração Fr-5, sendo isobutilamidas, devido a perda de 73Da ($C_4H_{11}N$) e 101Da ($C_5H_{11}NO^+$) (Figuras 74-76). Porém não foi possível determinar a posição das insaturações da cadeia alquílica de tais compostos, baseando-se nas fragmentações apresentadas em seus espectros de massas e comparados com trabalhos publicados.

Figura 73. Cromatograma de íons da fração Fr-6.

Figura 74. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6.

Figura 75. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6.

Figura 76. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração Fr-6.

Foram constatados também espectros de massas com picos de massa molecular ímpar, característicos de compostos nitrogenados, não sendo possível obter mais informações a partir de estudos de fragmentação (Figura 77).

Figura 77. Espectros de massas (MS-MS) de compostos nitrogenados presentes na fração Fr-6.

A análise dos espectros de massas da fração F-16-6 também foi útil na identificação de isobutilamidas, sendo propostas as estruturas das amidas **10** (Figura 80) e **8** (Figura 82), esta também identificada na fração Fr-5 e também constatadas outras amidas isobutílicas baseando-se em seus íons fragmentários, pela perda 73Da ($C_4H_{11}N$) e 101Da ($C_5H_{11}NO^+$) (Figuras 83-85).

Figura 78. Cromatograma de íons da fração F-16-6.

Figura 79. Espectro de massas (MS-MS) da substância **10**.

Figura 80. Estrutura da substância **10** (*N*-isobutiloctadeceno-2,4,12-trienamida).

Figura 81. Espectro de massas (MS-MS) da substância **8**.

Figura 82. Estrutura da substância **8** (*N*-isobutileicosa-2,4,14-enamida).

Figura 83. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração F-16-6.

Figura 84. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada da fração F-16-6.

Figura 85. Espectro de massas (MS-MS) de uma isobutilamida identificada na fração F-16-6.

Além disso, foram observados espectros de massas com picos de massa molecular ímpar, característica de compostos nitrogenados, não sendo possível também obter mais informações a partir de estudos de fragmentação (Figura 86).

Figura 86. Espectros de massas (MS-MS) de compostos nitrogenados presentes na fração F-16-6.

4.2.2. Identificação de amidas através de GC-EI-MS

As amidas pirrolidínicas e isobutílicas apresentam também um padrão de fragmentação característico em seus espectros de massas obtidos por impacto eletrônico (Achenbach *et al.*, 1986). Os extratos brutos dos órgãos de *P. reticulatum* foram analisados por GC-MS e os espectros de massas correspondentes foram analisados quanto ao íon molecular e principais íons fragmentários. Além das substâncias já identificadas, foram observados em alguns espectros de massas picos moleculares de massa ímpar, o que indica a presença de nitrogênio em sua estrutura. Baseado nestes dados foram propostas estruturas de quatro amidas pirrolidínicas contendo longa cadeia alquílica (Figuras 87-90).

Figura 87. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 11, identificada no extrato de folhas de plântulas.

Figura 88. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 12, identificada no extrato de plântulas.

Figura 89. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância 13, identificada nos extratos de caules de folhas de plântulas.

Figura 90. Espectro de massa (EI) e proposta de fragmentação da substância **14**, identificada nos extratos de folhas e folhas de plântulas.

4.3. Atividade biológica

4.3.1. Ensaio para inibidores de acetilcolinesterase

O ensaio foi realizado no Instituto de Botânica de São Paulo, como descrito no item 3.5.2, em que os extratos foram submetidos a um ensaio preliminar para verificar, através de CCDA, quais substâncias possuíam efeito inibidor de acetilcolinesterase (Figura 91; Tabela 12).

Figura 91. Placas utilizadas no ensaio para inibidores de acetilcolinesterase. 1-Folhas; 2-Folhas das plântulas; 3-Caule; 4-Caule das plântulas; 5-Raízes; 6-Raízes das plântulas; 7-Frutos; P-Padrão (Fisostigmina).

Tabela 12. Resultado do ensaio para inibidores de acetilcolinesterase.

Extrato	Rf das substâncias com atividade
Folhas	-
Folhas plântulas	0,05
Caule	0,5 e 0,05
Caule plântulas	0,5 e 0,05
Raízes	0,05
Raízes plântulas	0,5 e 0,05
Frutos	0,5, 0,23 e 0,05

A análise da placa de CCDA após a revelação mostra atividade da substância cujo Rf é 0,05, possivelmente referente a substância **1** (diidrowisanidina) e de uma substância cujo Rf = 0,5, podendo ser a substância **3** ((2E,4E)-N-isobutileicosa-2,4-dienamida). Os extratos apresentaram também atividade de uma substância cujo Rf é 0,23, podendo ser atribuída a substância **6**.

Com base neste resultado, tais compostos foram submetidos ao ensaio para determinação do limite de detecção, método que indica a quantidade mínima de amostra para que a atividade seja observada. A inspeção visual da placa de CCDA após revelação mostra que o limite de detecção para a substância **1** foi de 0,1 µg,

para a substância **3** o limite foi de 0,75 μg e para a substância **6** não foi observada inibição da enzima (Figura 92). A atividade observada no ensaio preliminar realizado com os extratos não foi constatada no ensaio para determinação do limite de detecção, provavelmente devido à quantidade de amostra ter sido insuficiente, sendo necessário um ensaio com uma maior concentração do composto. O limite de detecção para o controle positivo fisostigmina foi de 0,05 μg .

Figura 92. Placas utilizadas no ensaio para inibidores de acetilcolinesterase. **I** – Substância **1**; **II** – Substância **3**; **III** – Substância **6**; P – Fisostigmina (0,05 μg /2,5 μg).

4.3.2. Ensaio antifúngico contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

Os extratos foram ensaiados conforme a metodologia descrita em 3.5.1 e os resultados podem ser observados na fotografia das placas preparativas reveladas em UV (254 e 366 nm) e após a aspersão de esporos e crescimento dos fungos (Figura 93). As placas após inspeção visual foram convertidas em uma tabela em que a atividade é indicada pelo número de asteriscos (* = fraca, ** = média e *** = forte) (Tabela 13).

Figura 93. Placas utilizadas nos ensaios antifúngicos. 1-Folhas; 2-Folhas das plântulas; 3-Caule; 4-Caule das plântulas; 5-Raízes; 6-Raízes das plântulas; 7-Frutos.

Tabela 13. Resultado do ensaio antifúngico contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Extrato	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>	
	Rf	Pot.*	Rf	Pot.
Folhas	0,05	***	0,8 e 0,05	*** e ***
Folhas plântulas	0,05	***	0,8 e 0,05	*** e ***
Caule	0,05	***	0,05	***
Caule plântulas	0,05	***	0,05	***
Raízes	0,05	***	0,05	***
Raízes plântulas	0,05	***	0,05	***
Frutos	0,05	***	0,05	***

*potencial: * = fraco; ** = moderado; *** = forte

Neste ensaio preliminar foi possível observar forte atividade contra *C. Cladosporioides* e *C. Sphaerospermum*, indicadas por manchas brancas na placa de CCDA para a substância cujo Rf é 0,05. Tal substância pode ser atribuída à amida diidrowisanidina (substância **1**). A substância cujo Rf é 0,8 também apresentou forte atividade contra *C. sphaerospermum*, sendo possivelmente atribuída a substância **5** (benzoato de cianobenzila) (Figura 93).

Além desses resultados, diversos estudos revelam potencial atividade antifúngica de amidas (Alécio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2007) e para compostos presentes em secreções de insetos, como a substância **5** (benzoato de cianobenzila) (Roncadori *et al.*, 1985). Baseado nestes dados, amostras das substâncias **1** e **5** foram submetidas ao ensaio para determinação do limite de detecção, não tendo sido observada atividade para estes compostos. Provavelmente este fato é consequência de problemas ocorridos com os esporos dos fungos e também por contaminações, relatados pela técnica responsável pelos ensaios no Instituto de Botânica. Uma segunda hipótese seria ainda devido às baixas concentrações das substâncias no ensaio para determinação

do limite de detecção, sendo também necessário aplicar uma maior quantidade dos compostos nas placas de CCDA. Além disso, deve se levar em consideração à baixa resolução na separação dos compostos na análise de CCDA.

4.4. Análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análise dos componentes principais (PCA)

Diversas amostras de espécies de *Piper* disponíveis no LQPN (Tabela 14) foram submetidas às análises multivariadas, visando detectar semelhanças e diferenças no conjunto amostral. A espécie *P. amalago* foi escolhida para estas análises devido à sua relação filogenética e morfológica com a espécie *P. reticulatum* (Jaramillo *et al.*, 2001). Amostras de *P. hispidum*, *P. crassinervum*, *P. solmsianum*, *P. fuligineum*, *P. gaudchaudianum*, *P. aduncum* e *P. tuberculatum* foram utilizadas como grupo externo. Os dados obtidos por MS-ESI foram processados pela análise de agrupamento hierárquico e pela análise de componentes principais.

Tabela 14. Espécies de *Piper* analisadas por HCA e PCA.

Espécie	Parte da planta	Código	Local de coleta
<i>P. reticulatum</i>	Folhas adultas	Ret-F	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Folhas de plântulas	Ret-Fp	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Caules adultos	Ret-C	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Caules de plântulas	Ret-Cp	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Raízes adultas	Ret-R	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Raízes de plântulas	Ret-Rp	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Frutos	Ret-Fr	Carajás – PA
<i>P. reticulatum</i>	Folhas de plântulas	Ret-IQ	São Paulo – SP
<i>P. amalago</i>	Folhas adultas	Am-IQ	São Paulo – SP
<i>P. amalago</i>	Folhas adultas	Am-Enc	Encantado – RS
<i>P. amalago</i>	Folhas de plântulas	Am-Pind	Pindorama – SP
<i>P. amalago</i>	Folhas de plântulas	Am-Camp	Campinas – SP
<i>P. hispidum</i>	Folhas adultas	Hispidum-F	São Paulo – SP
<i>P. crassinervium</i>	Folhas adultas	Crass-F	São Paulo – SP
<i>P. solmsianum</i>	Folhas adultas	Solm-F	São Paulo – SP
<i>P. fuligineum</i>	Folhas adultas	Fuli-F	São Paulo – SP
<i>P. gaudichaudianum</i>	Folhas adultas	Gaud-F	São Paulo – SP
<i>P. aduncum</i>	Folhas adultas	Adun-F	São Paulo – SP
<i>P. aduncum</i>	Folhas de plântulas	Adun-Fp	São Paulo – SP
<i>P. tuberculatum</i>	Folhas adultas	Tub-F	São Paulo – SP
<i>P. tuberculatum</i>	Folhas de plântulas	Tub-Fp	São Paulo – SP

Primeiramente, foram realizadas análises de PCA (Figura 94) e HCA (Figura 96) dos dados de MS-ESI dos extratos de *P. reticulatum*. Na análise por PCA as componentes principais permitiram representar 80% da variância dos dados totais, sendo que a primeira componente principal (PC1) descreve 44% da variação total e a segunda (PC2) 36%. Dentro deste contexto foi possível observar uma tendência inesperada para os agrupamentos, em que extratos de folhas de plântulas, caules de plântulas, caules e frutos formam um grupo e os extratos de folhas, raízes de plântulas e folhas de plântulas coletadas no IQ-USP formam um segundo grupo, além da amostra das raízes ter se destacado das demais, estando mais próxima

deste segundo grupo. Tal aspecto pode ser explicado através do gráfico de loadings (Figura 95), ou seja, a influência das variáveis na discriminação das amostras.

A representação demonstrou a capacidade da primeira componente principal (PC1) em discriminar as amostras conforme a predominância do tipo de substâncias presentes. A separação das amostras do grupo 1 é causada pela predominância de amidas de cadeia alquílica longa que possuem massas moleculares de m/z 363, 361, 359, que foram atribuídas as substâncias **3** ou **12**, **8** ou **13** e **6** respectivamente. O grupo 2 representa as amostras ricas na amida diidrowisanidina (**1**), caracterizada pelos íons fragmentários em m/z 165, 135; além da amida wisanidina (**2**), caracterizado por sua vez pelo íon fragmentário em m/z 231. Além disso, a PC1 foi também responsável por discriminar a amostra Ret-R, devido à presença do íon fragmentário em m/z 165, atribuído a amida diidrowisanidina (**1**) podendo se inferir que este é o órgão da espécie mais rico neste composto.

Dentro do grupo 2, a proximidade das amostras Ret-F e Ret-IQ pode ser atribuído a presença significativa da substância **5** (benzoato de cianobenzila), fato este observado no perfil cromatográfico por HPLC (Figura 97). A segunda componente principal (PC2) foi responsável pela maior discriminação da amostra Ret-IQ, sendo esta amostra mais rica neste composto, caracterizado pelo íon fragmentário em m/z 116.

A tendência observada através da análise de PCA foi melhor visualizada no dendrograma obtido pela análise de HCA, sendo discriminados também dois grupos. Neste gráfico é possível agrupar as amostras que mais se assemelham. No grupo 1, as amostras de folhas de plântulas e caules de plântulas apresentam uma maior similaridade entre si do que com as demais amostras do grupo (caules e frutos). Da mesma forma, no grupo 2 as amostras de folhas e raízes de plântulas possuem uma

maior semelhança do que as demais amostras (raízes e folhas de plantas do IQ-USP).

Através do perfil cromatográfico (HPLC) das partes de *P. reticulatum* é possível compreender que a clara discriminação observada para as amostras de folhas e folhas de plântulas é devido à diferença da intensidade dos picos referentes aos compostos majoritários da amostra (Figura 97).

Figura 94. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de *P. reticulatum*.

Figura 95. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de *P. reticulatum*.

Figura 96. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de *P. reticulatum*.

Figura 97. Cromatogramas (HPLC) dos extratos de *P. reticulatum*.

Em uma segunda etapa, foram submetidas à análise multivariada amostras de extratos de folhas adultas de espécies de *Piper*, incluindo *P. reticulatum*, *P. amalago* (coletadas em Encantado-RS, Pindorama-SP e no IQ-USP), e como grupo externo foram utilizadas amostras de *P. gaudichaudianum*, *P. tuberculatum*, *P. hispidum*, *P. solmsianum*, *P. crassinervium* e *P. fuligineum*, coletadas no IQ-USP. Na análise por PCA (Figura 98) as componentes principais permitiram representar 77% da variância total dos dados, sendo que a primeira componente principal (PC1) descreve 55% da variação total e a segunda (PC2) 22%. É possível distinguir claramente as amostras de *P. amalago* (Am-Enc, Am-Pind e Am-IQ) e *P. reticulatum* (Ret-F) das demais amostras.

Através do gráfico de loadings (Figura 99) pode-se observar que a separação da amostra *P. reticulatum* (Ret-F) é causada pela presença do íon fragmentário em m/z 165, atribuído ao pico base da amida diidrowisanidina (1) e a separação das amostras de *P. amalago* (Am-Enc, Am-Pind e Am-IQ) é atribuído por sua vez pela presença do íon fragmentário em m/z 135 (Figura 100), referente ao pico base da amida nigrinodina ($C_8H_7O_2^-$) (Jacobs *et al*, 1999) composto majoritário nos extratos da espécie. A discriminação da amostra de *P. amalago* coletada em Encantado pode ser atribuída à presença de compostos ausentes nas demais amostras de *P. amalago*, observados no cromatograma obtidos por HPLC (Figura 102).

Esta tendência foi também observada no dendrograma (Figura 101) obtido na análise de HCA, com a presença de dois agrupamentos, além da amostra Ret-F ter sido claramente discriminada das demais amostras.

Figura 98. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de *Piper*.

Figura 99. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de *Piper*.

Figura 100. Espectro de massas (ESI – modo positivo) do extrato de *P. amalago* coletada no IQ-USP.

Figura 101. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas adultas de espécies de *Piper*.

Figura 102. Cromatogramas (HPLC) dos extratos de *P. amalago*.

Na etapa seguinte, amostras de extratos de folhas de plântulas de espécies de *P. reticulatum* (coletadas em Carajás-PA e no IQ-USP), *P. amalago* (coletada em Campinas-SP), *P. tuberculatum* e *P. aduncum*, estas duas últimas utilizadas como grupo externo, foram submetidas à análise de PCA e HCA.

Na análise de PCA (Figura 103) as componentes principais representaram 82% da variância dos dados totais, a primeira componente principal (PC1) descrevendo 69% da variação total e a segunda (PC2) 13%. Neste gráfico foi possível observar como ambas as componentes contribuíram para discriminar as amostras.

A primeira componente principal (PC1) é responsável pela discriminação da amostra Ret-Fp, pois observando o gráfico de loadings (Figura 104), esta separação é influenciada pela presença das amidas **3** ou **12**, **8** ou **13** e **6** referentes as massas moleculares em m/z 363, 361, 359 respectivamente, e pelos íons fragmentários em m/z 134 e 135, referentes as amidas **1** e **2**. Já a segunda componente principal (PC2) é responsável pela separação da amostra Ret-IQ, influenciada pela presença do íon fragmentário em m/z 116, atribuído ao composto **5** (benzoato de cianobenzila). Nesta análise é observada a clara distinção entre as amostras de *P. reticulatum* coletadas em locais diferentes, em Carajás e no IQ-USP.

A discriminação das amostras descritas na análise de PCA é também observada na análise de HCA (Figura 105), em que as amostras Adun-Fp, Tub-Fp e Am-Camp formam um grupo e as amostras Ret-IQ e Ret-Fp são claramente separadas deste grupo e entre si, corroborando com os resultados obtidos nas análises com as folhas adultas.

Figura 103. Gráfico de escores do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de *Piper*.

Figura 104. Gráfico de loadings do PCA com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de *Piper*.

Figura 105. Dendrograma com base nos dados de MS-ESI dos extratos de folhas de plântulas de espécies de *Piper*.

Dentro do conjunto amostral das partes de *P. reticulatum* foi possível agrupá-las baseando-se nos tipos de compostos predominantes em seus extratos, principalmente com relação às estruturas das amidas. As análises de PCA e HCA foram úteis na discriminação geográfica das espécies de *P. amalago*, provenientes de diferentes localidades e diferenciando também amostras de *P. reticulatum*, em que somente um espécimen havia sido coletado (FLONA de Carajás) e seu cultivo no IQ-USP resultou em plântulas que possuíam composição química predominante do benzoato de cianobenzila (**5**), observado nos perfis cromatográficos de tais amostras.

Ao se comparar a espécie *P. reticulatum* com espécies que produzem substâncias da mesma classe de metabólitos, no caso amidas, até mesmo com a espécie *P. amalago*, filogeneticamente relacionada, observa-se a clara discriminação da *P. reticulatum*, tanto para folhas adultas, quanto para folhas de plântulas. Este fato é interessante, podendo ser atribuído a inúmeros fatores como, por exemplo, a

presença da substância **5** (benzoato de cianobenzila), composto este descrito apenas em uma espécie da família Olacaceae e em secreções de defesas de insetos (Duffey *et. al.*, 1977).

De um modo geral, pode-se concluir que através da visualização gráfica das análises de PCA e HCA é possível obter informações rápidas e eficientes a respeito da similaridade em um grupo de amostra, sendo que cada uma das técnicas fornece informações complementares a outra.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico realizado com extratos de plantas adultas e plântulas de *P. reticulatum* levou ao isolamento e caracterização de quatro amidas (**1-3** e **6**), sendo uma delas majoritária nos extratos (**1**) e já descrita para esta espécie (Maxwell *et al.*, 1998), uma lignana (**4**) e uma nitrila (**5**), esta sendo identificada apenas no óleo essencial da espécie *Malania oleifera*, pertencente a família Olacaceae (Liu *et al.*, 2007) e em secreções de insetos da família Xistodesmidae, sendo substâncias de defesas contra predadores e além de possuir atividade antibiótica (Duffey *et al.*, 1977).

Foram propostas estruturas de sete amidas pirrolidínicas e isobutílicas contendo longa cadeia alquílica, com base nos dados de cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas, através do padrão de fragmentação característico em seus espectros de massas, procedimento bastante conveniente, principalmente para compostos minoritários em misturas complexas, difíceis de identificar por métodos tradicionais (Sun *et al.*, 2007). Porém a determinação da posição das insaturações no meio de uma cadeia alifática, bem como de sua configuração, requerem a obtenção de derivados e/ou isolamento para uma caracterização completa.

Os extratos brutos foram submetidos a ensaios de atividade biológica, sendo observado um elevado potencial antifúngico frente às espécies fitopatógenas *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, um potencial alvo para o tratamento da doença de Alzheimer. A partir destes resultados, amostras dos produtos naturais isolados, possivelmente responsáveis pelas atividades observadas, foram submetidas aos ensaios para determinação do limite de detecção, sendo constatada forte atividade

anticolinesterásica para as substâncias **1** (0,1 µg) e **3** (0,75 µg). Com relação ao ensaio antifúngico, foi detectada atividade para as substâncias **1** e **5**, porém esta etapa deve ser concluída posteriormente.

Através das análises multivariadas foi possível observar agrupamentos com relação ao perfil metabólico nos diferentes órgãos de *P. reticulatum*, baseado nas estruturas das amidas presentes. As análises de PCA e HCA também foram úteis na discriminação geográfica das espécies analisadas, com base nos perfis cromatográficos das amostras. Porém, tais inferências requerem outras informações, incluindo os resultantes de variabilidade genética e estudos de variações temporais dos metabólitos secundários. As análises incluindo outras espécies, além de *P. amalago*, filogeneticamente e morfológicamente relacionada com *P. reticulatum*, foi observada a clara discriminação desta última, podendo ser atribuída ao fato de *P. reticulatum* produzir o benzoato de cianobenzila, um produto natural até então desconhecido em espécies de Piperaceae.

6. REFERÊNCIAS

- Achenbach, H., Fietz, W., Wörth, J., Waibel, R., Portecop, J. (1986). Constituents of tropical medicinal plants, CG/MS – Investigations of the constituents of *Piper amalago* – 30 new amides of the piperine-type. *Planta Medica* **52**, 12-18.
- Ahmad, F., Bakar, S.A., Read, R.W. (1998). Benzofurans from the leaves of *Piper magnibacum* C. DC. *Chemical Research Communication* **7**, 33-37.
- Alécio, A. C., Bolzani, V. D., Young, M. C. M., Kato, M. J., Furlan, M. (1998). Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products* **61**, 637-639.
- Andrade, E. H. A., Carreira, L. M. M., Da Silva, M. H. L., Da Silva, J. D., Bastos, C. N., Sousa, P. J. C., Guimarães, E. F., Maia, J. G. S. (2008). Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry and Biodiversity* **5**, 197-208.
- Antunes, P. A., Chierice, G. O., Constantino, C. J. L., Aroca, R. F. (2001). Spectroscopic characterization of *N*-isobutyl-6-(*p*-methoxyphenyl)2*E*,4*E* hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua*. *Vibrational Spectroscopy* **27**, 175-181.
- Bailey, N. J. C., Oven, M., Holmes, E., Nicholson, J. K., Zenk, M. H., 2003. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via H-1 NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry* **62**, 851-858.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Bollinger, W. H. (1985). Natural Plant Chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*, **228**, 1154-1160.
- Baldoqui, D.C., Kato, M.J., Cavaleiro, A.J., Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Furlan, M. (1999). New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **51**, 899-902.
- Banerji, J., Dhara, K. P. (1974). Lignan and amides from *Piper sylvaticum*. *Phytochemistry* **13**, 2327-2328.
- Barbieri Jr, E., Barreto Jr, C. B., Ribeiro, R. C., De oliveira, V. H., Freire de Lima, M. E., Moya-Borja, G. E. (2007). Insecticide effects of natural amides from Piper and of the synthetic derivative tetrahydropiperine on *Lucilia cuprina* (Diptera:

- Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology* **16**, 87-91.
- Bari, S. S., Sattar, M. A., Vig, R., Kumar, A., Vasisht, N. (1990). Synthesis of pellitorine and sarmentine. Alkamides isolated from *Piper sarmentosum*. *Journal of the Indian Chemical Society* **67**, 995-996.
- Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S. (2009). Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, **32**, 3, 679-688.
- Barret, D. (2002). From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* **1597**, 224-233.
- Batista Jr, J. M., Lopes, A. A., Ambrósio, D. L., Regasini, L. O., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Cicarelli, R. M. B., Furlan, M. (2008). Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 538-540.
- Batista-Pereira, L. G., Castral, T. C., Da Silva, M. T. M., Amaral, B. R., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Da Silva, M. F. G. F., Correia, A. G. (2006). Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **61**, 196-202.
- Benevides, P.J.C., Sartorelli, P., Kato, M.J. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelii*. *Phytochemistry* **52**, 339-343.
- Berenbaum, M. R. (1995). The chemistry of defense: Theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 1-2.
- Bernard, C. B., Krishnamurty, H. G., Chauret, D., Durst, T., Philogéne, B. J. R., Sanchezvindas, P., Hasbun, C., Poveda, L., Sanroman, L., Arnason, J. T. (1995). Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 801-814.
- Bezerra, D. P., Pessoa, C., De Moraes, M. O., De Alencar, N. M. N., Mesquita, R. O., Lima, M. W., Alves, A. P. N. N., Pessoa, O. D. L., Chaves, J. H., Silveira, E. R., Costa-Lotufo, L. V. (2008). In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. *Journal of Applied Toxicology* **28**, 599-607.
- Bezerra, D. P., Moura, D. J., Rosa, R. M., de Vasconcellos, M. C., e Silva, A. C. R., de Moraes, M. O., Silveira, E. R., Lima, M. A. S., Henriques, J. A. P., Costa-Lotufo, L. V., Saffi, J. (2008b). Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an

- alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **652**, 164-174.
- Bezerra, D. P., Pessoa, C., DE Moraes, M. O., Silveira, E. R., Lima, M. A. S., Elmiro, F. J. M., Costa-Lotufo, L. V. (2005). Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from *Piper* species. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **60**, 539-543.
- Bodiwala, H., Singh, G., Singh, R., Dey, C., Sharma, S., Bhutani, K., Singh, I. (2007). Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *Journal of Natural Medicines* **61**, 418-421.
- Boll, P. M., Parmar, V. S., Tyagi, O. D., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C. E., 1994. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species., 19th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Karachi, Pakistan, pp. 2339-2342.
- Braga, M.R., Young, M.C.M., Dietrich, S.M.C., Gottlieb, O. R. (1991). Phytoalexin induction in Rubiaceae. *Journal of Chemical Ecology* **17**, 1079.
- Campos, M. P., Cechinel Filho, V., Silva, R. Z., Yunes, R. A., Monache, F. D., Cruz, A. B. (2007). Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **62**, 173-178.
- Chauret, D. C., Bernard, C. B., Arnason, J. T., Durst, T., Krishnamurty, H. G., Sanchez-Vindas, P., Moreno, N., San Roman, L., Poveda, L. (1996). Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *Journal of Natural Products* **59**, 152-155.
- Chaves, M. C. D. O., De Oliveira, A. H., Santos, B. V. D. O. (2006). Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **34**, 75-77.
- Chen, Y. C., Liao, C. H., Chen, I. S. (2007). Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. *Phytochemistry* **68**, 2101-2111.
- Chen, Z. N., Yu, P. Z., Xu, P. J. (1993). Anti-platelet activating factor constituents, 2,5- diaryltetrahydrofuran type lignans, from *Piper futokadsura* Sied. et Zucc. *Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese material medica* **18**, 292-294, 318.
- Christie, O.H.J. (1995). Introduction to multivariate methodology, an alternative way? *Chemometrics and Intelligente Laboratory* **29**, 177-188.

- Coimbra, H. S., Royo, V. A., De Souza, V. A., Pereira, A. C., De Souza, G. H., Da Silva, R., Donate, P. M., Silva, M. L., Cunha, W. R., Carvalho, J. C., Bastos, J. K. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activities of (-)-o benzyl cubebin, a (-)-cubebin derivative, obtained by partial synthesis. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **143**, 65-69.
- Coll, J. C., Bowden, B. F. (2004). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products* **49**, 934-936.
- Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (1998). "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed, London, Sydney, Auckland, New York, vol. 4, 463p.
- Connolly, J. D., Deans, R., Haque, M. E. (1995). Constituents of *Piper chaba*. *Fitoterapia* **66**, 188.
- Costa, S. S., Mors, W. B. (1981). Amides of *Ottonia corcovadensis*. *Phytochemistry* **20**, 1305-1307.
- Cunico, M. M., Dias, J. G., Miguel, M. D., Miguel, O. G., Auer, C. G., Côcco, L. C., Lopes, A. R., Yamamoto, C. I., Monache, F. D. (2006). Antimicrobial and allelopathic potential of the amides isolated from the roots of *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Química Nova* **29**, 746-749.
- Cunico, M. M., Miguel, O. G., Miguel, M. D., Kerber, V. A., Montrucchio, D. P., Auer, C. G., Grogolettir JR, A. (2004). Evaluation of antibacterial activity of *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Revista de Ciencias Farmaceuticas* **24**, 141 145.
- Danelutte, A. P., Costantin, M. B., Delgado, G. E., Braz-Filho, R., Kato, M. J. (2005). Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1425-1430.
- Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Kato, M. J. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **64**, 555-559.
- Das, B., Kashinatham, A., Madhusudhan, P. (1998). Long chain esters and alkamides from *Piper Longum*. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **137**, 319-320.
- Daunter, B., Grennshields, R. N. (1973). Toxicity of *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of General Microbiology*, **85**, 455-460.
- Defernez, M., Colquhoun, I. J. 2003. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using H-1 NMR spectra. *Phytochemistry* **62**, 1009-1017.

- Delgado, A.W., Auvella, M.E., Diaz, A.M.P. (1998). Benzylisoquinoline alkaloids from the stem of *Piper augustum*. *Revista Colombiana de Quimica* **27**, 13-21.
- De Moreira, L. D., Kaplan, M. A. C., Guimarães, E. F. (1995). Chemical constituents from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacia* **76**, 106-109.
- De Souza, V. A., Da Silva, R., Pereira, A. C., Royo, V. D. A., Saraiva, J., Montanheiro, M., De Souza, G. H. B., Da Silva Filho, A. A., Grando, M. D., Donate, P. M., Bastos, J. K., Albuquerque, S., E Silva, M. L. A. (2005). Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **15**, 303-307.
- Dixon, D. R. A. (2001a). Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. *Phytochemistry* **57**, 145-148.
- Dixon, R.A. (2001b) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.
- Duffey, S. S., Blum, M. S., Fales, H. M., Evans, S. L., Roncadori, R. W., Tieman, D. L., Nakagawa, Y. (1977). Benzoyl cyanide and mandelonitrile benzoate in the defensive secretions of millipedes. *Journal of Chemical Ecology* **3**, 101-103.
- Dyer, L. A., Palmer, A. N. (2004). *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology and tropic interactions. Kluwer Academic Publishers, New York, Cap. 7.
- Dyer, L. A., Dodson, C. D., Stireman, J. O., Tobler, M. A., Smilanich, A. M., Fincher, R. M., Letourneau, D. K. (2003). Synergistic effects of there *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2499-2514.
- Ee, G. C. L., Lim, C. M., Rahmani, M., Shaari, K., Bong, C. F. J. (2010). Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper nigrum*. *Molecules* **15**, 2398-2404.
- El-Desouky, S. K., Gamal-Eldeen, A. M. (2009). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of some constituents from the floral buds of *Syringa patula*. *Pharmaceutical Biology* (London, United Kingdom) **47** (9), 872-877.

- Ellman, G. L., Lourtney, D. K., Andres, V., Gmelin, G. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88-95.
- Facundo, V. A., Da Silveira, A. S. P., Morais, S. M. (2005). Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 753-756.
- Facundo, V. A., Morais, S. M., Braz Filho, R. (2004). Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta Amazônica: atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Química Nova* **27**, 79-83
- Fang, J., Xie, J., Shao, Y. C., Qian, F. G. (2007). Chemical constituents in root and stem of *Piper laetispicum* (II). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* **38**, 1289-1292.
- Fenner, R., Betti, A. H., Mentz, L. A., Rates, S. M. K. (2006). Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **42**, 369-394.
- Ferreira, M. M. C., Antunes, A. M., Melgo, M. S., Volpe, P. L. O. (1999). Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova* **22** (5).
- Firn, R. D., Jones, C.G. (2003) Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Natural Products Reports* **20**, 382–391.
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science* **129**, 1466-1470.
- Freixa, B., Vila, R., Ferro, E. A., Adzet, T., Cañigueral, S. (2001). Antifungal principles from *Piper fulvescens*. *Planta Medica* **67**, 873-875.
- Greenwood, B.; Mutabingwa, T. (2002). Malaria in 2002. *Nature*, **415** (6872), 670-672.
- Guerrero, R. O., Rivera, S. M., Rivera, S., Sueiro, L. A. (2003). Bioassay screening of Amazonian plants. *Puerto Rico health sciences journal* **22**(3), 291-297.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M. E., Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **27**, 39-48.

- Gupta, O. P., Atal, C. K., Gaiind, K. N. (1972). Constituents of *Piper nepalense*. *Phytochemistry* **11**, 2646.
- Gupta, S., Jha, A., Prasad, A. K., Rajwanshi, V. K., Jain, S. C., Olsen, C. E., Wengel, J., Parmar, V. S. (1999). A new amide, N-cinnamoylpyrrole and other constituents from *Piper argyrophyllum*. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry* **38**, 823-827.
- Hadeck, F., Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* **11**, 137-147.
- Harborne, J. B. (1988). Introduction to ecological biochemistry. 3ed. London: Academic.
- Herrera, M. C., Pellmyr, O. (2002). Plant-animal interactions: an Evolutionary Approach. Blackwell Publishing, Australia.
- Homans, A. L., Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography*. **51**, 327-329.
- Hostettmann, K., Marston, A. (2007). The Search for New Drugs from Higher Plants. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **61**, 322-326.
- Huang X., Yin Y., Huang W., Sun K., Cheng C., Bai L., Dai Y. (2010). Alkaloids and lignans from stems of *Piper betle*. *China journal of Chinese materia medica* **35** (17), 2285-8.
- Ingkaninam, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003). *Journal of Ethnopharmacology* **89**, 261-264.
- Jacobs, H., Seeram, N. P., Nair, M. G., Reynolds, W. F., McLean, S. (1999). Amides of *Piper amalago* var. *nigrinodum*. *Journal of the Indian Chemical Society* **76** (11-12), 713-717.
- Jaramillo, M. A., Manos, P. S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* **88**, 706-716.
- Jensen, H. R., Scott, I. M., Sims, S., Trudeau, V. L., Arnason, J. T. (2006). Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1289-1295.
- Jensen, S., Hansen, J., Boll, P. M. (1993). Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry* **33**, 523-530.

- Jiang, L., Chen, J., He, S., Sun, C. (2009). High-throughput structural elucidation of amides in *Mallotus lianus* Croiz plant materials by LC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* **70**, 439-445.
- Jones, C. G., Firn, R. D., Malcolm, S. B. (1991). On the evolution of plant secondary chemical diversity [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **333**, 273-280.
- Kaou, A. M., Mahiou-Leddert, V., Canlet, C., Debrauwer, L., Hutter, S., Azas, N., Ollivier, E. (2010). New amide alkaloid from the aerial part of *Piper capense* L.f. (Piperaceae). *Fitoterapia* **81** (6), 632-635.
- Kato, M. J., Furlan, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*. **79**, 529-538.
- Kirby, G. C. (1996). Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**, 6, 605-609.
- Kitamura, R. O. S., Romoff, P., Young, M. C. M., Kato, M. J., Lago, J. H. G. (2006). Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* **67**, 2398-2402.
- Konishi, T., Konoshima, T., Daikonya, A., Kitanaka, S. (2005). Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **53**, 121-124.
- Koroishi, A. M., Foss, S. R., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D. (2008). In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* **117**, 270–277.
- Koul, S. K., Taneja, S. C., Dhar, K. L., Atal, C. K. (1983). Lignans of *Piper clusii*. *Phytochemistry* **22**, 999-1000.
- Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., Kato, M. J. (2005). Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *Journal of Brazilian Chemical Society* **16**, 153-156.
- Lago, J.G.L., Ramos, C.S., Casanova, C.C. D., Morandim, A. de A., Bergamo, C.D., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V. da S., Furlan, M., Guimarães, E.F., Young, M.M.C., Kato, M. J. (2004). Benzoic Acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1783-1788.

- Li, C. Y., Tsai, W. J., Damu, A. G., Lee, E. J., Wu, T. S., Dung, N. X., Thang, T. D., Thang, L. (2007). Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the Leaves of *Piper lolot*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 9436-9442.
- Lin, L. C., Shen, C. C., Shen, Y. C., Tsai, T. H. (2006). Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*. *Journal of Natural Products* **69**, 842-844.
- Lindon, J. C., Holmes, E., Nicholson, J. K. (2001). Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **39**, 1-40.
- Liu, X. M., Li, W. G., Li, P. Y., Zhou, Y. H. (2007). Extraction and chemical components of essential oils of *Malania oleifera* Chum. *Yingyong Huaxue*, **24** (8), 968-970.
- Lopez, A., Ming, D.S., Towers, G.H.N. (2002). Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. *Journal of Natural Products* **65**, 62-64.
- Luckner, M. (1990). Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Martin Luckner. Ed. 2, Berlin; New York: Springer-Verlag, 563.
- Luize, P. S., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V. (2006). Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 2126-2130.
- Luz, A. I. R., Zoghbi, M. G. B., Maia, J. G. (2003). The essential oils of *Piper reticulatum* L. and *P. crassinervium* H. B. K. *Acta Amazônica* **33** (2), 341-344.
- Ma, J., Jones, S. H., Marshall, R., Johnson, R. K., Hecht, S. M. (2004b). A DNA-Damaging Oxoaporphine Alkaloid from *Piper caninum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1162-1164.
- Ma, Y., Han, G. Q., Li, C. L., Cheng, J. R., Arison, B. H., Hwang, S. B. (1991). Neolignans from *Piper polysyphorum* C.DC. *Acta Pharmaceutica Sinica* **26**, 345-350.
- Mabberley, D. J. (1997). The plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge Univ. Press., New York.
- Mahiou, V., Francois, R., Hocquermiller, R., Cave, A., De Arias, A. R., Inchausti, A., Yaluff, G., Fournet, A. (1995) New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products* **59** (7), 694.

- Makapugay, H. C., Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D., Bordas, E. (1983). Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutescens*. *Journal of Ethnopharmacology* **7**, 235-238.
- Marques, J. V., Kitamura, R. O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimaraes, E. F., Kato, M. J. (2007). Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of Natural Products* **70**, 2036-2039.
- Marqui, S. R. D., Lemos, R. B., Santos, L. A., Castro-Gamboa, I., Cavaleiro, A. J., Bolzani, V. D. S., Silva, D. H. S., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, A. M., Mendes-Giannini, M. J. S., Young, M. C. M., Torres, L. M. B. (2008). Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova* **31**, 828-831.
- Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* **13**, 51-54.
- Martinez, A., Castro, A. (2006). Novel cholinesterase inhibitors as future affective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **15**, 1-12.
- Martins, A.P., Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Canigual, S., Casanova, J., Da Cunha, A.P., Adzet, T. (1998). Essential oils from four *Piper* species, *Phytochemistry* **49**, 2019-2023.
- Martins, R. C. C., Lago, J. H. G., Albuquerque, S., Kato, M. J. (2003). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **64**, 667-670.
- Martins, R. C. C., Latorre, L. R., Sartorelli, P., Kato, M. J. (2000). Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **55**, 843-846.
- Matsuda, H., Ninomiya, K., Morikawa, T., Yasuda, D., Yamaguchi, I., Yoshikawa, M. (2008). Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on dgalactosamine/ TNF-[alpha]-induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 2038-2042.
- Matsuo, Y., Mimaki, Y. (2010). Lignans from *Santalum album* and their cytotoxic activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **58** (4), 587-590.
- Maxwell, A., Dabideen, D., Reynolds, W. F., Mc Lean, S. (1998). Two 6-Substituted 5,6-dihydropyran-2-ones from *Piper reticulatum*. *Journal of Natural Products* **61**, 815-816.

- Mcburnett, B. G., Chavira, A. A., Lopez, A. C., Mosso, J., Collins, S. M. (2007). Analysis of *Piper auritum*: A traditional hispanic herb. ACS Symposium Series **946**, 67-76.
- Mcfarren, M. A., Cordova, D., Rodriguez, E., Rauh, J. J. (2002). In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **83**, 201-207.
- Mcfarren, M. A., Rodriguez, E. (1998). Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **60**, 183-187.
- Mohottalage, S., Tabacchi, R., Guerin, P. M. (2007). Components from Sri Lankan *Piper betle* L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. *Flavour and Fragrance Journal* **22**, 130-138.
- Montanari, C.A., Bolzani, V.S. (2001). Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, *Química Nova* **24**, 105-111.
- Monteiro, M. C. M., Leptocarydis, I. H., Silva, G. H., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Lopes, M. N. (2007). Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). *Eclética Química* **32**.
- Morikawa, T., Matsuda, H., Yamaguchi, I., Pongpiriyadacha, Y., Yoshikawa, M. (2004). New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. *Planta Medica*, 152-159.
- Narui, T., Takeuchi, M., Ishii, R., Ishida, T., Okuyama, T. (1995). Studies on the constituents of *Piper hancei* of spice from Okinawa. *Natural Medicines* **39**, 827-834.
- Navickiene, H.M.D., Alécio, A.C., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Cavalheiro, A.J., Furlan, M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **55**, 621-626.
- Navickiene, H. M. D., Miranda, J. E., Bortoli, S. A., Kato, M. J., Bolzani, V. S., Furlan, M. (2007). Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Pest Management Science* **63**, 399-403.
- Neto, J. M. M., Moita, G. C. (1998). "Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados", *Química Nova*, São Paulo, SP: **21** (4), 467-469.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**, 461-477.

- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, **66**, 1022-1037.
- Ngane, A. N., Biyiti, L., Bouchet, P., Nkengfack, A., Zollo, P. A. (2003). Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. *Fitoterapia* **74**, 464-468.
- Okogun, J. I., Ekong, D. E. U. (1974). Extracts from the fruits of *Piper guineense* Schum. and Thonn. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**, 2195-2198.
- Okogun, J. I., Sondengam, B. L., Kimbu, S. F. (1977). New amides from the extracts of *Piper guineense*. *Phytochemistry* **16**, 1295.
- Olsen, C. E., Tyagi, O. D., Boll, P. M., Hussaini, F. A., Parmar, V. S., Sharma, N. K., Taneja, P., Jain, S. C. (1993). An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactam B and D. *Phytochemistry* **33**, 518-520.
- Orjala, J., Wright, A.D., Erdelmeier, C.A.J., Sticher, O., Rali, T. (1993). New monoterpene-substituted dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Helvetica Chimica Acta* **76**, 1481-1488.
- Oyededeji, O. A., Adeniyi, B. A., Ajayi, O., Konig, W. A. (2005). Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research* **19**, 362-364.
- Park, B. S., Son, D. J., Park, Y. H., Kim, T. W., Lee, S. E. (2007). Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. *Phytomedicine* **14**, 853-855.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**, 597-673.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N., Jain, R., Sharma, N.K., Tyagi, O.D., Lawrie, S.J., Errington, W., Howarth, O.W., Olsen, C.E., Singh, S.K., Wengel, J. (1998). Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* **49**, 1069-1078.
- Pessini, G. L., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Cortez, D. A. G. (2005). Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1130-1133.

- Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. D. S., Lopes, N. P., Epifanio, R. D. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* **25**, 45-61.
- Poulter, C. D. (2009). Bioorganic Chemistry. A Natural reunion of the physical and life sciences. *The Journal of Organic Chemistry* **74**, 2531-2645.
- Pring, B. G. (1982). Isolation and identification of amides from *Piper callosum*. Synthesis of ipercallosine and pipercallosidine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**, 1493-1498.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrelo, E., Lanni, C., Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacology Research* **50**, 441-451.
- Ramos, L.S., Da Silva, M.L., Luz, A.I.R., Zoghbi, M.G.B., Maia, J.G.S. (1986). Essential oil from *Piper marginatum*, *Journal of Natural Products* **49**, 712-713.
- Reddy, P. S., Jamil, K., Madhusudhan, P., Anjani, G., Das, B. (2001). Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. *Pharmaceutical Biology* **39**, 236-238.
- Rho, M. C., Lee, S. W., Park, H. R., Choi, J. H., Kang, J. Y., Kim, K., Lee, H. S., Kim, Y. K. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **68**, 899-903.
- Rodrigues, M. V. N., Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Boaventura Júnior, S., Santos, A. S. (2006). O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *Revista Multiciência* **7**, 7-14.
- Rollinger, J. M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H., Prast, H. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 6248-6254.
- Roncadori, R. W., Duffey, S. S., Blum, M. S. (1985). Antifungal activity of defensive secretions of certain Millipedes. *Mycologia* **77** (2), 185-191.
- Rukachaisirukul, T., Siriwanakul, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweang, P., Wongwattanavuch, P., Suksamrarn, A. (2004). Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* **93**, 173-176.

- Scott, I., Jensen, H., Philogène, B., Arnason, J., 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* **7**, 65-75.
- Sengupta, S., Ray, A.B. (1987). The Chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia*. LVIII **3**, 147-165.
- Sertüner, F. W. A. (1806). Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *Journal der Pharmacie Ärzte Apoth. Chem* **14**, 47-93.
- Sharaf, M.A.; Illman, D.L.; and Kowalski, B.R. (1986). *Chemometrics*. (Wiley: New York).
- Shihua, W., Cuirong, S., Saifeng, P., Yanbin, L., Yuanjiang, P. (2004). Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1040**, 193-204.
- Siddiqui, B., Gulzar, T., Begum, S., Afshan, F., Sultana, R. (2008). A new natural product and insecticidal amides from seeds of *Piper nigrum* Linn. *Natural Product Research* **22**, 1107-1111.
- Silva, D. R., Baroni, S., Svidzinski, A. E., Bersani-Amado, C. A., Cortez, D. A. G. (2008). Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **116**, 569-573.
- Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. S., Meda, C. I., Young, M. C. M., Furlan, M. (2001). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59** (5), 521-527.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2007
- Singh, J., Potdar, M. A., Atal, C. K., Dhar, K. L. (1974). Structure of a new pyrrolidine alkaloid from *Piper trichostachyon*. *Phytochemistry* **13**, 677-678.
- Singh, S. K., Ashok, P. K., Olsen, C. E., Jha, A., Jain, S. C., Parmar, V. S., Wenge, J. (1996). Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry* **43**, 1355-1360.

- Smith, R.M. (1983). Kava lactones in *Piper methysticum* from Fuji. *Phytochemistry* **22**, 1055-1056.
- Sondengam, B. L., Kimbu, S. F., Connolly, J. D. (1977). A new piperine-type amide from *Piper guineense*. *Phytochemistry* **16**, 1121-1122.
- Souza, V. C. (2005). Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Srinivasan, K. (2007). Black Pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**, 735-748.
- Stöhr, J. R., Xiao, P. G., Bauer, R. (2001). Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* **75**, 133-139.
- Strege, M. A. (1999). High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *Journal of Chromatography B* **725**, 67-78.
- Strickler, M. P., Stone, M. J., Kennington, A. S., Goldstein, D. M. (1989). Strategy for the preparative-scale high-performance liquid chromatographic isolation of kadsurenone and futoquinol from the medicinal plant *Piper futokadsura*. *Journal of Chromatography* **484**, 369-379.
- Sun, C., Pei, S., Pam, Y., Shen, Z. (2007). Rapid structural determination of amides in *Piper longum* by high-performance liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. **21**, 1497-1503.
- 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. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* **69**, 1726-1731.
- Terreaux, C., Hostettmann, M. P. G., Kurt (1998). Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry* **49**, 461-464.
- Tsai, I. L., Lee, F. P., Wu, C. C., Duh, C. Y., Ishikawa, T., Chen, J. J., Chen, Y. C., Seki, H., Chen, I. S. (2005). New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. *Planta Medica* **71**, 535-542.

- Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y., Taylor, W. C. (2006). Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**, 149-151.
- Valentin, J. L. (1995). Agrupamento e ordenação IN Oecologia Brasiliensis. *Tópicos em tratamento de dados biológicos* **2**, 27-55.
- Wang, H., Chou, Y., Hong, Z., Chen, H., Chang, Y., Yang, W., Chang, H., Mai, C., Chen, C. (2011). Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **42** (2), 204-211.
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T. Samain, M. S., Quandt, D., Neinhuis, C. (2007). Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 477-497.
- Whitton, P. A., Lau, A., Salisbury, A., Whitehouse, J., Evans, C. S. (2003). Kava lactones and the kava-kava controversy. *Phytochemistry* **64**, 673-679.
- Willians, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., Rahman, S. K. (1989). Why are secondary metabolites (Natural Products) biosynthesized? *Journal of Natural Products* **52**, 1189-1208.
- Wink, M. (1990). Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood, B. V.; Rhodes, M. J. C. (ed.). *Secondary products from plant tissue culture*. Oxford: Clarendon.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987). Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2** (1), 37-52.
- Xia, W., Zeng, J. P., Chen, L. B., Jiang, A. L., Xiang, L., Xu, J., Cui, X., Han, E. J. (2007). Inhibition of b-amyloid precursor protein gene in SK-N-SH cells by piperlonguminine/dihydropiperlonguminine components separated from Chinese herbal medicine *Futokadsura* stem. *Chinese Journal of Physiology* **50**, 157-163.
- Xiao, X., Qian, F., Xie, J., Pan, S. (2005). Amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. *ZhongGaoyao* **36**, 508-510.

- Xiao, X. X., Pan, S. L. (2004). Pharmacological studies on extracts from *Piper boehmeriaefolium* var. *tonkinense*. *China journal of Chinese materia medica* **29**, 78-580.
- Yamaguchi, L. F., Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Di Mascio, P., Kato, M. J. (2006). Antioxidant activities of prenylated hydroquinones and benzoic acid from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry* **67**, 1838-1843.
- Zhang, H., Matsuda, H., Nakamura, S., Yoshikawa, M. (2008). Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 3272-3277.
- Zhang, W., Shi, M. (2006). Alkyl phosphines promoted reductive coupling of acyl cyanides: formation of O-acyl cyanohydrins. *Tetrahedron* **62**, 8715-8719.
- Zhou, L., Xu, X. D., Yang, J. S. (2002). Research progress on alkaloids and lignans from *Piper* plants. *Chinese Pharmaceutical Journal* **37**, 161-164.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Renata Alves da Silva

Local de nascimento: São Paulo, SP - Brasil

Data de nascimento: 4 de janeiro de 1984

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Escola Técnica Estadual “Júlio de Mesquita” – Santo André/SP”
1999-2001

Graduação: Universidade Estadual Paulista – Araraquara/SP
Licenciatura em Química
2003-2007

Pós-graduação: Universidade de São Paulo – São Paulo/SP
Mestrado em Química – Área: Química Orgânica
2008-2011
Bolsa de Mestrado FAPESP: setembro/2008 a agosto/2010

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Iniciação científica: Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, no Instituto de Química da UNESP – Araraquara, sob orientação do Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, no período de outubro de 2005 a julho de 2007. Bolsa FATEC (Fundação de Apoio a Ciência Tecnologia e Educação).

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da USP como monitor/bolsista na disciplina Fundamentos de Química para o curso de Física (Bacharelado) no período de 18/08/2009 a 30/11/2009.

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da USP como monitor/bolsista na disciplina Química Orgânica Experimental para o curso de Farmácia no período de 02/03/2009 a 29/06/2009.

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da USP como monitor/voluntário na disciplina Química Geral para o curso de Física Licenciatura no período de 28/07/2008 a 12/12/2008.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

Anderson M. Gaia, Renata A. da Silva, Eny I. S. Floh, Carlos A. Colombo, Walter J. Siqueira, Massuo J. Kato. Metabolic differentiation during seedling development of *Piper* species. Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy and the Phytochemical Society of North America, St. Petersburg-FL, EUA, 10-14 julho de **2010**.

Silva, R. A., Kato, M. J., "Chemical constituents and bioactivity from extracts of *Piper reticulatum* L". 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), **2009**.

Yamaguchi, L. F., Salazar, K. M., Freitas, G. C., Yoshida, N, C., Santos, E. L., Marques, J. V., Oliveira, A., Navarro, L. B., Silva, R. A., Ferreira, E. A., Gaia, A. M., Rodrigues, C. A., Benedetti, A. M., Valero, Y. G., Scotti, M. T., Correia, M. V., Fokoue, H. H., "Metabolomic analysis of Piperaceae species using ESI/NMR de 1H and PCA". 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), **2009**.

Silva, R. A., Kato, M. J. Constituintes químicos dos órgãos de *Piper reticulatum* L. 32^a Reunião Anual da SBQ, **2009**.