Universidade de São Paulo

20561

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
INSTITUTO DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"CROMENOS POLICETIDEOS DE *Peperomia villipetiola*"

KARINA JOSEFINA MALQUICHAGUA SALAZAR
TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO

SÃO PAULO

2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005684

Ficha Catalográfica

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

Malquichagua Salazar, Karina Josefina
M259c Cromenos de origem policetídica em *Peperomia villipetiola*
/ Karina Josefina Malquichagua Salazar. -- São Paulo, 2003.
151p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Produtos naturais : Química orgânica. 2. Piperaceae : Botânica
I. T. II. Kato, Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

“Cromenos de origem policetídica em *Peperomia villipetiola*”

**KARINA JOSEFINA
MALQUICHAGUA SALAZAR**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Química - Área: Química Orgânica.

Aprovado por:

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

Prof. Dr. VICENTE DE PAULO EMERENCIANO
IQ – USP

Prof. Dr. LAURO EUCLIDES SOARES BARATA
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
15 DE AGOSTO 2003.

**"CROMENOS DE ORIGEM POLICETÍDICA EM
Peperomia villipetiola"**

A Deus, por ser minha fortaleza, meu escudo e meu melhor amigo.

*A minha mãe, pelo grande carinho, apoio e confiança depositada em minha
pessoa, graças ao que sou e ainda aspiro chegar a ser.*

*À memória de meu pai, pois embora ficamos pouco tempo juntos,
aprendi muito acerca da honestidade e respeito pelos outros.*

A meus irmãos, Luis, Katherine e Miguel pela alegria e paciência.

A Carlos, pelo amor, carinho e paciência.

Meus sinceros agradecimentos

Ao Professor Massuo Jorge Kato pela orientação, apoio e oportunidade em desenvolver este trabalho.

*Ao Professor Guillermo E. Delgado Paredes por proporcionar o espécime da *Peperomia villipetiola*.*

Ao M. Sc. Botânico Santos Llatas Quiroz, Diretor do herbário Pedro Ruiz Gallo, da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade do mesmo nome, Lambayeque-Perú, pela identificação taxonômica do espécime.

Ao professor Joseph Wilhelm Baader e à professora Marina pelos equipamentos proporcionados.

A Débora e M. Claudia, pelos ensaios biológicos.

Ao pessoal da Central analítica pelos espectros obtidos.

A Lídia pelos espectros no ultravioleta, pelos auxílios no treinamento dos equipamentos, e correções do português na redação desta tese.

A Ana Paula e Roberto pela gentileza e disponibilidade sempre que precisei.

A João pelo companheirismo e as valiosas idéias que enriqueceram meu trabalho.

Aos colegas do laboratório de Produtos naturais pelo aprendizado em química e amizade, Antonio, Clécio, Diego, Angélica, Mariko, Hiléia, Ana, Adalberto, Joca, Sergio, Fernando, Tatiana, seu Zé, Viviane e Tati.

A Berta e Maribel por sua amizade embora a grande distancia nos separe.

A Maria Caramantin, María Alipazaga, Ruben e todos aqueles que de maneira desinteressada apoiaram-me no início do mestrado.

A CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

"Cromenos de origem policetídica em *Peperomia villipetiola*"

Estudo fitoquímico dos extratos de folhas e galhos de *Peperomia villipetiola* ("hierba de la plata"), coletada no Peru, resultou no isolamento e caracterização da miristicina (3-metoxi-4,5-metilenedioxi-alil-benzene) e sete novos cromenos. Os cromenos tiveram suas estruturas elucidadas através de análises espectroscópicas como sendo: 5-hidroxi-7-metil-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (**PVL1**), 7-metil-5-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-8-carboxilato de metila (**PVL2**), 7-hydroxy-5-metil-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (**PVL3**), 5-metil-7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (**PVL4**), ácido 7-hidroxi-5-metanol-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (**PVL5**), ácido 5-metanol-7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (**PVL6**) e 5-acetoximetanol-7-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (**PVL7**). Uma proposta biossintética foi sugerida, no qual o anel aromático seria formado pela via policetídica enquanto que a porção isoprênica poderia ser oriunda tanto da via do mevalonato quanto da via do fosfato de metileritriol.

3-metoxi-4,5-metilenodioxo
alil-benzene (Miristicina)

5-Hidroxi-7-metil-2,2-dimetil-2H-1
cromeno-6-carboxilato de metila
(PVL1)

7-metil-5-metoxi, 2,2-dimetil-2H-1
cromeno-8-carboxilato de metila
(PVL2)

7-hidroxi-5-metil-2,2-dimetil-2H-1
cromeno-6-carboxilato de metila
(PVL3)

5-metil, 7-hidroxi, 2,2-dimetil-2H-1
cromeno-8-carboxilato de metila
(PVL4)

Ácido 7-hidroxi-5-metanol-2,2
dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico
(PVL5)

Ácido 5-metanol-7-metoxi, 2,2
dimetil-2H-1-cromeno, 6-carboxílico
(PVL6)

5-acetoximetanol-7-hidroxi, 2,2-dimetil
2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila
(PVL7)

ABSTRACT

"Chromenes of polyketide origin in *Peperomia villipetiola*"

The leaves and stems extracts from the *Peperomia villipetiola* ("herb of the silver"), collected in Peru, yielded myristicine (3-methoxy-4,5-methylenedioxy-allyl-benzene) and seven new chromenes. The chromenes, all new compounds, had their structures elucidated by means of spectroscopic analysis as: methyl 5-hydroxy-7-methyl-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylate (**PVL1**), methyl 5-methoxy-7-methyl-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-8-carboxylate (**PVL2**), methyl 7-hydroxy-5-methyl-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylate (**PVL3**), methyl 7-methoxy-5-methyl-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylate (**PVL4**), 5-methanol-7-hydroxy-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylic acid (**PVL5**), 5-methanol-7-methoxy-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylic acid (**PVL6**), and methyl 5-acetoxymethanol-7-hydroxy-2,2-dimethyl-2*H*-1-chromene-6-carboxylate (**PVL7**). A biosynthetic scheme was suggested in which the aromatic ring should be formed by polyketide pathway while the isoprenyl moiety either from mevalonic acid or methylerythriol phosphate pathway.

CONTEÚDO

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE FOTOS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE ESQUEMAS	XI

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Piperaceae	2
1.2 Metabólitos secundários de espécies de <i>Peperomia</i>	5
1.3 Cromenos	10
1.3.1 Ocorrência e atividade biológica de cromenos	10
1.3.2 Origem biossintética de cromenos	15
1.4 Ensaios Biológicos	25
1.4.1 Ensaio Antifúngico	25
1.5 Objetivos	27

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos	29
2.1.1. Espectrômetros de ressonância magnética nuclear	29
2.1.2. Espectrômetro de massas	29
2.1.3. Espectrofotômetro no Infravermelho	29
2.1.4. Espectrofotômetro no Ultravioleta.	29
2.1.5. Cromatógrafo líquido de alta eficiência	29
2.2. Materiais / Técnicas cromatográficas	
2.2.1. Cromatografia em camada delgada analítica	29
2.2.2. Cromatografia em camada delgada preparativa	30
2.2.3. Cromatografia em coluna	30
2.2.4. Outros reagentes	30
2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência	30
2.2.6. Material Botânico	30
2.3. Metodologia	
2.3.1. Preparação dos extratos das folhas e o caule.	32

2.3.2. Análise preliminar dos extratos	32
2.3.2.1. Cromatografia em camada delgada comparativa	32
2.3.2.2. Análise dos extratos por CLAE	32
2.3.3. Fracionamento do extrato bruto e purificação das substâncias presentes em maior quantidade	35
2.4. Ensaio antifúngico bioautográfico com <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .	38
 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1-Fenilpropanoide	41
3.1.1-Miristicina (3-Metoxi-4,5-metilenodioxi-alil-benzeno)	41
3.2. Cromenos	
3.2.1. Grupo I: PVL1 e PVL2	42
3.2.1. Grupo II: PVL3 e PVL4	51
3.2.1. Grupo III: PVL5 , PVL6 e PVL7	57
3.3. Identificação cromatográfica dos cromenos PVL1-PVL7 caracterizadas	66
3.4- Avaliação dos resultados biológicos	66
 4-BIOGENESIS DOS CROMENOS DE <i>Peperomia villipetiola</i>	70
 5-CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75
 6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
 7- APÊNDICE	85

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs	absorbância.
AcOEt	acetato de etila
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CPR	cromatografia planar radial.
CC	cromatografia em coluna
CG	cromatografia gasosa
CG/MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CDCl₃	deuteroclorofórmio
CoA	coenzima A
¹⁴C	carbono 14
C₅	5 carbonos
cm⁻¹	centímetro recíproco
δ	descolamento químico
Da	dalton
DCM	diclorometano
DEPT	Distortionless enhancement bypolarization transfer.
DMAPP	difosfato de 3,3-dimetilalila.
EM	Espectrometria de massas
Enz	enzima
I.E.	Impacto de elétrons
IPP	difosfatode isopentila
Hex	hexano
HETCOR	Heteronuclear correlation
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
Hz	hertz
IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento
m.s.n.m.	metros sobe o nível do mar
m/z	relação massa/carga
MeOH	metanol

MHz	megahertz
PKS	Policetídeo sintase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
Si-60	sílica gel 60
S	singleto
UV	ultravioleta
v	frequência

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema heterocíclico do 2 <i>H</i> -cromeno (Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, 1993)	10
Figura 2. Precocenos isolados de <i>Ageratum conyzoides</i>	15
Figura 3. 3,3-dihidro-2,7-dimetil-6-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2 <i>H</i> -1-benzopirano-5-ol	20
Figura 4. Substâncias isoladas de <i>P. obtusifolia</i> .	22
Figura 5. Quinonas isoladas de <i>P. galioides</i> , Mahiou, et al., 1996	22
Figura 6. Cromatograma do extrato DCM:MeOH das folhas da <i>Peperomia villipetiola</i> , obtido por CLAE.	35
Figura 7. Cromatograma do extrato DCM:MeOH dos caules da <i>Peperomia villipetiola</i> , obtido por CLAE.	35
Figura 8. 4,5-Metilenodioxi,3-Metoxi -alil-benzeno (miristicina)	42
Figura 9. Espectro de massas da miristicina por I. E. (70 ev)	86
Figura 10. Espectro de massas de PVL1 por I. E. (70 ev)	87
Figura 11. Espectro no IV da substância PVL1	88
Figura 12. Espectro no UV da substância PVL1	89
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H de PVL1 (CDCl ₃ , 300 MHz)	90
Figura 14. Espectro de RMN de ¹³ C de PVL1 (CDCl ₃ , 75 MHz)	91
Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C-Dept 135° de PVL1 (CDCl ₃ , 75 MHz)	92
Figura 16. Espectro de HETCOR de PVL1 (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz)	93
Figura 17. Estruturas das substâncias de PVL1 e PVL2 .	46
Figura 18. Espectro de HMBC de PVL1 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz)	94
Figura 19. Espectro ampliado de 1 até 4 δ do espectro de HMBC de PVL1 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz)	95
Figura 20. Espectro ampliado de 5 até 7 δ do espectro de HMBC de PVL1 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz)	96
Figura 21. Algumas correlações observadas no espectro HMBC de PVL1 e PVL2 .	48
Figura 22. Espectro de massas de PVL2 por I. E. (70 ev)	97
Figura 23. Espectro no IV da substância PVL2	98

Figura 24. Espectro no UV da substância PVL2	99
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de PVL2 (CDCl_3 , 300 MHz)	100
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL2 (CDCl_3 , 75 MHz)	101
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL2 (CDCl_3 , 75 MHz)	102
Figura 28. Espectro de HETCOR de PVL2 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	103
Figura 29. Espectro de HMBC de PVL2 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	104
Figura 30. Espectro ampliado de 5 até 7 δ do espectro de HMBC de PVL2 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	105
Figura 31. Espectro de massas de PVL3 por I. E. (70 ev)	106
Figura 32. Espectro no IV da substância PVL3	107
Figura 33. Espectro no UV da substância PVL3	108
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H de PVL3 (CDCl_3 , 300 MHz)	109
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL3 (CDCl_3 , 75 MHz)	110
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL3 (CDCl_3 , 75 MHz)	111
Figura 37. Espectro de HETCOR de PVL3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	112
Figura 38. Espectro de HMBC de PVL3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	113
Figura 39. Estruturas das substâncias de PVL3 e PVL4 .	53
Figura 40. Algumas correlações observadas no espectro HMBC de PVL3 e PVL4 .	54
Figura 41. Espectro de massas de PVL4 por I. E. (70 ev)	114
Figura 42. Espectro no IV da substância PVL4	115
Figura 43. Espectro no UV da substância PVL4	116
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de PVL4 (CDCl_3 , 300 MHz)	117
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL4 (CDCl_3 , 75 MHz)	118
Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL4 (CDCl_3 , 75 MHz)	119
Figura 47. Espectro de HETCOR de PVL4 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	120
Figura 48. Espectro de HMBC de PVL4 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	121
Figura 49. Espectro ampliado de 0,5 até 4 δ do espectro de HMBC de PVL4 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	122
Figura 50. Espectro ampliado de 5 até 7 δ do espectro de HMBC de PVL4 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	123
Figura 51. Espectro de massas de PVL5 por I. E. (70 ev)	124
Figura 52. Espectro no IV da substância PVL5	125

Figura 53. Espectro no UV da substância PVL5	126
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H de PVL5 (CDCl_3 , 300 MHz)	127
Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL5 (CDCl_3 , 75 MHz)	128
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL5 (CDCl_3 , 75 MHz)	129
Figura 57. Espectro de HETCOR de PVL5 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	130
Figura 58. Espectro de HMBC de PVL5 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	131
Figura 59. Espectro ampliado de 4 até 7,5 δ do espectro de HMBC de PVL5 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	132
Figura 60. Estrutura da substância PVL5	59
Figura 61. Algumas correlações observadas no HMBC das substâncias PVL5 , PVL6 e PVL7	62
Figura 62. Espectro de massas de PVL6 por I. E. (70 ev)	133
Figura 63. Espectro no IV da substância PVL6	134
Figura 64. Espectro no UV da substância PVL6	135
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H de PVL6 (CDCl_3 , 300 MHz)	136
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL6 (CDCl_3 , 75 MHz)	137
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL6 (CDCl_3 , 75 MHz)	138
Figura 68. Espectro de HETCOR de PVL6 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	139
Figura 69. Espectro de HMBC de PVL6 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	140
Figura 70. Espectro ampliado de 3,5 até 6,5 δ do espectro de HMBC de PVL6 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	141
Figura 71. Estrutura da substância PVL6	59
Figura 72. Espectro de massas de PVL7 por I. E. (70 ev)	142
Figura 73. Espectro no IV da substância PVL7	143
Figura 74. Espectro no UV da substância PVL7	144
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H de PVL7 (CDCl_3 , 300 MHz)	145
Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL7 (CDCl_3 , 75 MHz)	146
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL7 (CDCl_3 , 75 MHz)	147
Figura 78. Espectro de HETCOR de PVL7 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	148
Figura 79. Espectro de HMBC de PVL7 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	149
Figura 80. Espectro ampliado de 0,5 até 2,5 δ do espectro de HMBC de PVL7 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	150

Figura 81. Espectro ampliado de 5 a 7 δ do espectro de HMBC de PVL7 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz)	151
Figura 82. Estrutura da substância PVL7	60
Figura 83. Identificação das substâncias PVL1-PVL7 no cromatograma do extrato de folhas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	66

INDICE DE FOTOS

Foto 1- Algumas espécies de <i>peperomias</i> .	3
Foto 2- <i>Peperomia villipetiola</i>	32

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição da família Piperaceae em gêneros.	4
Tabela 2: Metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Peperomia</i> .	6
Tabela 3: Cromenos isolados de Asteraceae.	11
Tabela 4: Cromenos isolados de Piperaceae.	13
Tabela 5: Classificação morfológica da família Piperaceae.	31
Tabela 6: Gradiente utilizado para a análise dos extratos das folhas e dos caules da <i>Peperomia vilipetiola</i> por CLAE.	34
Tabela 7: Massas das frações obtidas, (V:V) eluentes e frações reunidas do fracionamento cromatográfico em coluna (CC) dos extratos das folhas e o caule de <i>Peperomia villipetiola</i> .	38
Tabela 8: Massas obtidas das substâncias isoladas do extrato, de acordo o esquema 7.	39
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) observados para a miristicina.	43
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para PVL1 e PVL2 .	46
Tabela 11. Dados de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) para PVL1 e PVL2 .	48
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para PVL3 e PVL4 .	53
Tabela 13. Dados de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) para PVL3 e PVL4 .	54
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para PVL5 , PVL6 e PVL7 .	61
Tabela 15. Dados de HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) para PVL5 , PVL6 e PVL7 .	62
Tabela 16. Valores do R_f e potencial de inibição do crescimento dos fungos <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i> nos extratos das folhas, os caules e as substâncias purificadas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	67

Tabela 17. Potencial de inibição do crescimento dos fungos*Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium**sphaerospermum* das substâncias purificadas de *Peperomia villipetiola*.

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formação do malonil-ScoA	17
Esquema 2. Etapas preliminares da formação da cadeia policetometilênica.	17
Esquema 3. Ciclização de fenóis simples (Dewick, 1984)	18
Esquema 4. Proposta biossintética para os fenóis de <i>Peperomia galioides</i>	19
Esquema 5. Proposta biossintética para o benzopirano em <i>P. clussofolia</i> .	21
Esquema 6. Proposta biossintética para as quinonas isoladas de <i>P. galioides</i> , (Mahiou et al. ,1996).	24
Esquema 7. Fracionamento do extrato bruto e purificação das substâncias presentes em maior quantidade.	37
Esquema 8. Proposta de fragmentação da substância PVL1 no espectrômetro de massas.	49
Esquema 9. Proposta de fragmentação da substância PVL2 no espectrômetro de massas.	50
Esquema 10. Proposta de fragmentação da substância PVL3 no espectrômetro de massas.	55
Esquema 11. Proposta de fragmentação da substância PVL4 no espectrômetro de massas	56
Esquema 12. Proposta de fragmentação da substância PVL5 no espectrômetro de massas	63
Esquema 13. Proposta de fragmentação da substância PVL6 no espectrômetro de massas	64
Esquema 14. Proposta de fragmentação da substância PVL7 no espectrômetro de massas	65
Esquema 15. Comparação entre as estruturas dos cromenos PVL3 e PVL7 .	69
Esquema 16. Comparação entre as estruturas dos cromenos PVL5 e PVL6 .	69

Esquema 17. Biogênese dos cromenos isolados de <i>Peperomia villipetiola</i>	73
Esquema 18. Rotas biossintéticas alternativas para a formação dos cromenos em Piperaceae e Rutaceae	74

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Piperaceae

A família Piperaceae, pertencente à ordem de Piperales, possui cerca de dez a doze gêneros (Tabela 1) e cerca de 2000 espécies (Steyemark, 1984). É uma das famílias mais primitivas entre as angiospermas e, junto com Clorantaceae e Sauraceae têm sido consideradas fósseis vegetais vivos (Taylor and Hickey, 1984). Suas espécies podem ser encontradas em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, embora a grande maioria se encontre na parte central e norte da América do Sul (Steyemark, 1984).

As espécies de Piperaceae são predominantemente ervas, arbustos ou arvoredos, mas também podem ser epífitas ou suculentas, especialmente no caso de *Peperomias*.

Dentre todos os gêneros que compõem essa família, os dois principais, por ter o maior número de espécies são *Peperomia*, que alguns autores consideram família Peperomiaceae, com mais de 1000 e *Piper* com cerca de 700 espécies. A etimologia do nome *Peperomia* (“peper-omos” – grego: semelhante a *Piper*) é baseada na semelhança das flores desse gênero com as de *Piper*. (www.peperomia.net).

Sob o ponto vista econômico e comercial, o gênero *Piper* é o mais importante, tendo como principal exemplo, *P. nigrum* (pimenta-do-reino) cujos frutos maduros constituem-se na fonte da pimenta branca, enquanto o fruto verde é utilizado para a obtenção da pimenta negra. Os rizomas de *P. methysticum* fornecem uma bebida calmante, conhecida como kava-kava que é muito utilizada nas ilhas do Pacífico em diversas cerimônias (Singh, 1992). Os galhos de *P. futokadsura* são usados no tratamento de asma e artrite enquanto que na África Ocidental, preparações de folhas, raízes e sementes de *P. bettle* são empregadas internamente no tratamento de bronquite, doenças gastrointestinais, venéreas e reumatismo (Parmar et al. , 1997).

Espécies de *Peperomias* nativas são conhecidas nas ilhas do Oceano Índico, Pacífico e Caribe e poucas foram encontradas na África, Ásia e Oceania (www.peperomia.net). Muitas espécies são cultivadas, comercializadas e exportadas como plantas ornamentais. Como se observa (Foto 1), é grande o potencial de espécies de *Peperomias* com essa finalidade.

Foto 1: Exemplos de espécies de *Peperomia*

Peperomia blanda (Jacq.) Kunth

Peperomia nítida Dahlst.

Peperomia sincorana C. DC.

Peperomia argyreia (Miq.) E. Morren

Peperomia tricolor (L.) H. B. K.

Peperomia rotundifolia (L.) H. B. K.

M. J. Kato

No Perú, a família Piperaceae é representada por 381 espécies, sendo 226 endêmicas (www.sacha.org).

Tabela 1: Distribuição da família Piperaceae em gêneros.

Gêneros	Distribuição
<i>Chavica</i>	Indomalasia
<i>Macropiper</i>	Polinésia
<i>Manekia</i>	Índias Ocidentais
<i>Ottonia</i>	América do Sul
<i>Peperomia</i>	Pantropical
<i>Piper</i>	Pantropical
<i>Piperanthera</i>	Índias ocidentais
<i>Pothomorphe</i>	América Tropical
<i>Sarcorachis</i>	Índias Ocidentais, América Central e Sul
<i>Trianaeopiper</i>	Colômbia e Equador
<i>Verhuellia</i>	Índias Ocidentais

1.2. Metabólitos secundários de espécies de *Peperomia*

Os relatos de estudos químicos envolvendo espécies de *Peperomia* são pouco freqüentes na literatura quando se considera seu número estimado de espécies.

São raros os trabalhos envolvendo o estudo de óleos essenciais, pois somente *Peperomia rupestris* var. *rupestris* foi analisada onde constatou-se a predominância de 2-tridecanona (4,3%) (Diaz et al. , 1998). Destaca-se o elevado número de representantes de compostos aromáticos prenilados (Tabela 2) e também aqueles oriundos da via do acetato, freqüentemente caracterizados por uma longa cadeia alquílica. Os acilcicloexanodienos, isolados de *Peperomia proctorii* (Seeram et al. , 2000), haviam sido anteriormente isolados das sementes de *Virola elongata* e *V. sebifera* (Myristicaceae). Tais tipos de policetideos apresentam atividade cairomorial entre parasitóides de insetos (Mudd et al. , 1981).

Entre os compostos aromáticos observa-se alguns derivados de fenilpropanóides diméricos nos quais ligações carbono-carbono foram rompidas como nos casos das peperominas D, E, F (Govindachari et al., 1998; Monache et al., 1996). No caso da peperomina F, o carbono alifático ainda mantém uma oxigenação, o que poderia sugerir uma reação do tipo retro-Friedel-Crafts. Para a peperomina E, uma reação de desidratação poderia resultar na formação da ligação dupla. Porém, no caso da peperomina D, não seria possível vislumbrar uma reação deste tipo resultando diretamente em um carbono saturado. No caso da pelucidina, a quebra da ligação aparentemente ocorreu previamente quando da formação do estireno que, através da cicloadição [2+2] com outra unidade de C_6C_2 resultou na formação da pelucidina (Tabela 2) (Bayma et al., 2000).

Tabela 2: Metabólitos secundários isolados de espécies de *Peperomia*.

Substância	Planta (parte estudada)	Atividade	Referência
<p>3,3-diidro-2,7-dimetil-6-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2H-1-benzopirano-5-ol.</p>	<i>P. clusiifolia</i> (planta inteira)	-	Seeram et al., 1998.
<p>5-hidroxi-2-(14'-(E)-nonadecenil) cromona</p>	<i>P. vulcanica</i> (planta inteira)	-	Mbah et al. , 2002.
<p>5-hidroxi-2-[12'-(3'', 4'' - metilenodioxifenil) - dodecanil] cromona</p>	<i>P. vulcanica</i> (planta inteira)	-	Mbah et al. , 2002.
<p>peperobtusina A</p>	<i>P. obtusifolia</i> (parte aérea)	-	Tanaka et al., 1997.
<p>isopeperobtusina A</p>	<i>P. obtusifolia</i> (parte aérea)	-	Tanaka et al., 1997.

<p>peperobtusina B</p>	<i>P. obtusifolia</i> (parte aérea)	-	Tanaka et al. , 1997.
<p>ácido grifólico</p>	<i>P. galiodes</i> (planta inteira)	Atividade antiparasitária	Mahiou et al. , 1995.
<p>grifolina</p>	<i>P. galiodes</i> (planta inteira)	Atividade antiparasitária	Mahiou et al. , 1995.
<p>piperogalina</p>	<i>P. galiodes</i> (planta inteira) <i>P. obtusifolia</i> (parte aérea)	Atividade antiparasitária	Mahiou et al. , 1995 Tanaka et al. , 1997.
<p>galopiperona</p>	<i>P. galioides</i> (planta inteira)	-	Mahiou et al. , 1996.
<p>diidroquinona</p>	<i>P. galioides</i> (planta inteira)	-	Mahiou et al. , 1996.

<p>hidropoperona</p>	<i>P. galioides</i> (planta inteira)	Atividade antiparasitária	Mahiou et al. , 1996.
<p>peperomina A</p>	<i>P. dindigulensis</i> (parte aérea)	-	Govindachari et al. , 1998.
<p>peperomina D</p>	<i>P. glabella</i> (planta inteira)	-	Monache and Compagnone et al. , 1996
<p>peperomina E</p>	<i>P. dindigulensis</i> (parte aérea)	-	Govindachari et al. ,1998.
<p>pelucidina</p>	<i>P. pellucida</i> (Parte aérea)	-	Bayma et al. , 2000.

<p>2,3-dihidro-5,8-dihidroxi-2-pentadecil-4H-benzopirano-4-ona</p>	<i>P. proctorii</i> (planta inteira)	-	Seeram et al. , 2000.
<p>2-Acilociclohexano-1,3-diona</p>	<i>P. proctorii</i> (planta inteira)	-	Seeram et al. , 2000.
<p>proctoriona C</p>	<i>P. proctorii</i> (planta inteira)	-	Seeram et al. , 2000.

1.3. Cromenos

1.3.1 Ocorrência e atividade biológica de cromenos

Os cromenos constituem-se numa classe de produtos naturais de ocorrência restrita a espécies de Rutaceae, Liliaceae, Ciperaceae e Piperaceae, porém a maioria é descrita a partir de espécies de Asteraceae, especificamente nas tribos Asteraee, Eupatoriaee, Heliantheaee, Inuleaee e Senecioneaee. Estas substâncias têm sido encontradas em folhas, caules e mais raramente em raízes com teores de até 5% em peso seco (Proksch and Rodriguez, 1983).

Os cromenos estão formados por um anel benzênico e um pirânico, que apresenta uma dupla olefínica conjugada entre os carbonos C3-C4.

Figura 1. Sistema heterocíclico do 2*H*-cromeno (Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, 1993)

Dentre os cromenos isolados de Asteraceae (Tabela 3), merecem destaque os precocenos I e II que são produtos de grande importância biológica por estarem envolvidos no controle da metamorfose, esterilização e inibição de reprodução sexual de insetos e ainda danificando embriões (Bowers et al., 1976 a, b). A encecalina e 7-hidroxi encecalina apresentam atividade fototóxica em microrganismos (Proksch et al., 1983).

Uma comparação mais detalhada entre os cromenos isolados de Asteraceae e de Piperaceae pode ser feita a partir das tabelas 3 e 4.

Em um grande número de casos, observa-se que os cromenos de Asteraceae são derivados de acetofenona enquanto que, no caso de Piperaceae, são derivados de ácidos benzóicos.

Tabela 3: Cromenos isolados de Asteraceae

Substância	Planta (Tribo)	Atividade	Referência
<p>Precoceno I</p>	<i>Ageratum houstonianum</i> <i>A. conyzoides</i> (Eupatorieae)	Metamorfose precoce, esterilização, inibição de reprodução sexual em insetos e danificação de embriões.	Anthonsen et al. , 1970. Bowers et al. , 1976 a, b.
<p>Precoceno II</p>
<p>Encecalin</p>	<i>Encelia halimifolia</i> <i>E. laciniata</i> <i>E. palmeri</i> <i>E. ventorum</i> (Heliantheae)	Atividade fototóxica em microorganismos.	Proksch et al. , 1982 Proksch et al. , 1983 a , b.
<p>7-hidroxi encecalin</p>
<i>Eupatoriinae Ripasrium</i> <i>Eupatoriinae Rugosum</i> (Heliantheae)	-	Taylor et al. , 1971. Lin et al. , 1974.

<p><i>Fluorensia cernua</i></p> <p><i>Fluorensia Heterolepis</i> (Heliantheae)</p>	-	<p>Proksch et al. , 1983 a.</p> <p>Bohlmann et al. , 1979.</p>
<p><i>Helichrysum monticola</i> (Inuleae)</p>	-	<p>Bohlmann et al. , 1980.</p>
<p><i>Leontonyx spatulatus</i></p> <p><i>Leontonyx Squarrosus</i> (Inuleae)</p>	-	<p>Bohlmann et al. , 1978.</p>
<p><i>Encelia Farinosa</i> (Heliantheae)</p>	-	<p>Proksch et al. , 1983 a.</p>
<p><i>Helichrysum stoechas</i> (Inuleae)</p>	-	<p>Hänsel et al. , 1980.</p>

Tabela 4: Cromenos isolados de Piperaceae

Substância	Planta	Atividade	Referência
<p>Ácido 2,2 dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>Piper aduncum</i>	Atividade antitumoral	Baldoqui et al. , 1999.
<p>2,2-dimetil-3-hidroxi-6-carboxicromano-carboxilato de metila</p>	<i>Piper dilatatum</i>	Atividade fungicida	Terreaux et al. , 1998.
<p>Ácido 2,2 dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>Piper aduncum</i>	Atividade fungicida e moluscicida	Orjala et al. , 1993a.
<p>2,2 dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6- carboxilato de metila</p>	<i>Piper aduncum</i>	-	Moreira et al. , 1998.

<p>2,2 dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p>	<p><i>Piper hostmannianum</i></p> <p><i>Piper dilatatum</i></p> <p><i>Piper taboganum</i></p>	Atividade fungicida	<p>Diaz et al. , 1987.</p> <p>Terreaux et al. , 1998.</p> <p>Roussis et al. , 1990.</p>
<p>Ácido 2-metil-2-[4'-meti- 3'-pentenil]-2H-1-benzopirano-carboxílico</p>	<p><i>Piper lhotzkyanum</i></p>	-	<p>Moreira et al. , 1998.</p>

1.3.2 Origem biossintética de cromenos

Os cromenos estão constituídos por um anel benzênico e uma unidade de isopreno. Inicialmente especulava-se que o anel benzênico fosse derivado da p-hidroxiacetofenona via ácido chiquimico, mas estudos biossintéticos posteriores envolvendo precocenos de *Ageratum conyzoides* demonstraram um caminho alternativo.

Figura 2. Precocenos isolados de *Ageratum conyzoides*

Estudos de incorporação de acetato de sódio-[2- ^{14}C] e ácido mevalônico-[2- ^{14}C], indicaram incorporação do [2- ^{14}C]-acetato no núcleo aromático e do ácido mevalônico no grupo *gem*-dimetila dos precocenos (Figura 2). Tais experimentos permitiram sugerir que a biossíntese dos precocenos envolveria três unidades de acetato e uma de ácido mevalônico, via policetílica (Vyas and Mulchandani, 1980).

As substâncias isoladas da família Asteraceae (Tabela 3) sugerem que a rota biossintética envolvida é predominantemente policetílica.

Os policetídeos constituem-se um grupo de produtos naturais de ampla ocorrência, sendo exemplificadas por sub-classes distintas incluindo ácidos graxos, poliacetilenos e muitas substâncias aromáticas (Dewick, 1984). O complexo multienzimático envolvido na formação destes produtos é conhecido como policetídeo sintase (PKS) (Mann, 1994).

Na biossíntese de ácidos graxos, após a etapa de condensação de Claisen entre acetil-S-CoA (ou homólogo) e malonil-S-CoA (Esquema 1) resulta em um composto β -dicarbonílico (Esquema 2), que sofre etapas de reduções seguidas de eliminações e hidrogenações. No caso da formação de compostos aromáticos, a cadeia policetometilênica ou poli- β -cetometilênicas é preservada e cicliza-se

formando diversos compostos aromáticos (Esquema 3).

No caso da cadeia policetometilênica formada pela reação entre o acetil-SCoA e três moléculas de malonil-SCoA, resulta em uma cadeia contendo oito átomos de carbonos, que pode dobrar-se pelo menos de duas maneiras mas formando anéis de seis membros (Esquema 3). Através do caminho A, a reação de ciclização inicia-se com uma reação de condensação de aldol intramolecular, seguida de desidratação, enolização e hidrólise do tioéster para gerar o ácido orselínico, um produto natural freqüentemente observado em liquens (Narui et al., 1996). Através do caminho B, a ciclização inicia-se com uma reação de condensação de Claisen intramolecular, seguida de enolização e hidrólise do tioéster para gerar o floracetofenona (Esquema 3).

Esquema 1. Formação do malonil-SCoA

Esquema 2. Etapas preliminares da formação da cadeia policetometilênica.

Esquema 3. Ciclização de fenóis simples (Dewick, 1984)

Entre os dados publicados de espécies do gênero *Peperomia* os produtos isolados de *P. galioides* são bastante representativos em termos de origem. São três difenóis prenilados: o ácido grifólico, grifolina e piperogalina (Mahiou et al. , 1995). No caso do ácido grifólico, o ácido orselínico sofre reações de alquilação com três de unidades de pirofosfato de 3,3-dimetilalila ou com uma de pirofosfato de farnesila (Esquema 4).

Esquema 4. Proposta biossintética para os fenóis de *Peperomia galioides*

A segunda substância, grifolina, é possivelmente formada por descarboxilação do ácido glifólico. A piperogalina teria esta última como precursor imediato, seguida de alquilação por um grupamento 3,3-dimetilalila na posição do carbono descarboxilado.

De *P. clusiifolia* (Seeram et al. , 1998) foi isolado um benzopirano (Figura 3) cuja estrutura sugere também como precursor o ácido orselínico que, de maneira semelhante ao piperogalina, sofreu descarboxilação e duas alquilações nos mesmos carbonos. A biossíntese proposta neste caso (Esquema 5) consiste

de uma unidade de pirofosfato de 3,3-dimetilalila na posição *orto* à metila aromática, enquanto que, para a segunda alquilação, propõe-se duas etapas consecutivas. Inicialmente uma alquilação com uma unidade de pirofosfato de isopentenila e, na seqüência, a ligação dupla sofre um ataque nucleofílico pelo oxigênio do grupamento hidroxílico gerando o anel heterocíclico. Simultaneamente, a ligação dupla sofre uma adição electrófila com uma unidade de 3,3-dimetilalila, originando a substância A (Esquema 5). Como etapa final, a dupla olefínica do anel heterocíclico seria gerada como resultado de uma reação de oxidação.

Cabe destacar que essa substância pode ter sofrido a ciclização gerando o anel heterocíclico, um passo metabólico adicional além dos observados com outros metabólitos de *P. galioides*. No entanto, não observa a ligação dupla alifática característica dos cromenos.

Figura 3. 3,3-Diido-2, 7-dimetil-6-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2H-1-benzopirano-5-ol.

Esquema 5. Proposta biossintética para benzopirano em *P. clusiifolia*.

Substâncias semelhantes isoladas de *P. obtusifolia* incluem a piperogalina, um difenol (também isolado em *P. galioides*) e dois fenóis, isopeperobtusina A e peperobtusina A, cujas estruturas sugerem ser resultados de ciclização dos grupos hidroxílicos 1 e 2 dos fenóis da piperogalina (Tanaka et al. , 1997) (Figura 4).

No entanto, apesar de *P. obtusifolia* apresentar substâncias ciclizadas, também não se constata a ligação dupla alifática característica dos cromenos.

Figura 4. Substâncias isoladas de *P. obtusifolia*.

O ácido orselínico deve ser precursor de benzopiranos e cromenos, mas também de quinonas como aqueles isolados de *P. galioides* (Figura 5), piperogalono e galopiperono (Mahiou et al. ,1996).

Figura 5. Quinonas isoladas de *P. galioides*, Mahiou, et al. ,1996

As propostas biossintéticas para essas quinonas apresentam-se no esquema 6, o ácido orselínico (substância 1) sofre alquilação com uma unidade de pirofosfato de 3,3-dimetilalila e uma de pirofosfato de isopentenila para gerar a substância 4 (Esquema 6). De forma semelhante à biossíntese proposta para o benzopirano acima (Esquema 5), a ligação dupla sofre ataque nucleofílico pelo oxigênio do grupo hidroxílico gerando o anel heterocíclico. Uma adição electrófila com uma unidade de 3,3-dimetilalila fornece a substância 5. Posteriormente, a ligação dupla olefínica é gerada como resultado de uma oxidação fornecendo o cromeno 6, metabólito isolado de *P. clusiifolia*, que passa por uma série de reações de oxidação (desidrogenação) obtendo-se a substância 11 ou galopiperono, isolado de *P. galioides*.

Esquema 6. Proposta biossintética para as quinonas isoladas de *P. galioides* (Mahiou et al. ,1996).

Uma rota alternativa para a biossíntese do galopiperono envolveria a alquilação do ácido orselínico, pelo pirofosfato de 3,3-dimetila e de geranila

gerando a substância 2 e a ligação dupla do 3,3-dimetilalila sofreria uma reação de epoxidação, seguido do ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila fenólica formando um anel de seis membros (substância 12). Posteriormente, ocorreria uma reação de desidratação produzindo 7 com conjugação estendida, que passa por uma série de reações de oxidação resultando finalmente no galopiperono (substância 11).

Outra rota alternativa poderia ser a sequência 1, 2, 3 e 11, das quais as três últimas foram isoladas de *P. galioides*. E, com uma pequena variação das seqüências anteriormente propostas, pode-se seguir a sequência 9, 10 e 11.

Na biossíntese do piperogalono, o ácido orselínico é prenilado, gerando o ácido grifólico (substância 2), que sofre reações de oxidação para fornecer a substância 3, o piperogalono.

1.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

A utilização de bioensaios visando o isolamento de substâncias ativas vem sendo cada vez mais empregada pelos fitoquímicos em função de inúmeros testes biológicos sensíveis e simples atualmente disponíveis. Como consequência, um grande número de produtos naturais biologicamente ativos têm sido descritos de plantas, organismos marinhos, insetos, fungos e bactérias.

O alvo do bioensaio pode ser do tipo preliminar para a simples detecção de uma determinada atividade e, entre essas, a citotóxica tal qual o uso de larvas de camarão, ou específicos, que podem resultar na detecção de um alvo direto (Rezende, 1998).

O primeiro tipo utiliza organismos inferiores como invertebrados, microrganismos, plantas e algas para bioensaios de bancada. O segundo é normalmente utilizado após a detecção de atividade prévia, sendo realizado através de bioensaios frente a bactérias e fungos, sistemas subcelulares isolados como enzimas, receptores ou organelas; células vegetais ou animais, órgãos isolados de vertebrados, ou ainda com animais superiores inteiros.

No presente trabalho foi utilizado o ensaio fungicida do tipo específico na detecção de um alvo direto com a justificativa no fato de que cromenos isolados de espécies de Piperaceae como *Piper aduncum* (Baldoqui et al 1999) e também amidas de *P. tuberculatum* e *P. arboreum* haviam apresentado atividade semelhante (Silva et al. 2000; Navickiene et al, 2000).

1.4.1. ENSAIO ANTIFÚNGICO

Agentes antifúngicos são utilizados tanto na clínica humana e veterinária, quanto para proteção de plantas, sementes, solos e pinturas. Podem ser protetores foliares, conservantes de produtos industriais e madeira.

No Brasil, doenças causadas por fungos fitopatogênicos têm ocasionado grandes perdas em culturas agrícolas, dentre as quais podem ser citadas a "ferrugem" de cereais, causada por *Puccinia graminis*; o "cancro da haste" da soja, causada por *Diaporthe phaseolorum*; e a "vassoura de bruxa", causada por *Crinipellis pernicioso*, que causou danos imensos aos cacauzeiros do Sul da Bahia. Na fase pós-colheita, outros fungos podem causar grandes prejuízos à agricultura,

o que tem obrigado os agricultores a utilizar agrotóxicos, geralmente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Atualmente, vários países da Europa têm feito restrições às importações de frutas tropicais mesmo que contenham baixas concentrações de agrotóxicos, com tendência a evoluir para a exigência de só permitir a entrada de produtos agrícolas totalmente isentos de agrotóxicos. Isto exigência gera uma demanda no sentido de descoberta de novas substâncias naturais e/ou sintéticas que possam atuar como biofungicidas (www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos).

A avaliação da atividade antifúngica é facilmente realizada em função da facilidade de visualização do efeito inibitório da substância sobre o crescimento. Os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, utilizados nos ensaios realizados neste trabalho, são patogênicos para as plantas e, um resultado positivo neste ensaio pode ser considerado um indicador para uma possível atividade contra fungos patogênicos humanos. Constitui-se num exemplo espécies do gênero *Cladosporium* que causam cromoblatocitose, uma micose crônica de pele e tecidos subcutâneos (Rezende, 1998)

Estes fungos apresentam micélio, esporos aéreos e ciclos de vida complexos, podendo desenvolver colônias do tipo leveduriformes, associadas às funções vegetativas/reprodutivas, ou filamentosas. Este dimorfismo presente nas colônias pode ser controlado em laboratório, variando-se o pH do meio de cultura, a temperatura de incubação, a pressão de O₂ e a própria composição do meio de cultura. Os fungos apresentam crescimento mais lento que bactérias necessitando, geralmente de sete a quinze dias de incubação. Em geral, são sensíveis as incidências diretas da luz, devido à ação fungicida da radiação ultravioleta, mas muitas espécies requerem luz para seu desenvolvimento, enquanto outras são inibidas ou permanecem indiferentes.

Pelos fatos anteriormente citados e devido à dificuldade no combate as micoses sistemáticas associadas a doenças imunodeficientes, tal como a AIDS, faz-se necessária a busca de novos compostos de potencial com atividade antifúngica com menos efeitos colaterais.

Neste trabalho os extratos de folhas e caules de *Peperomia villipetiola* foram submetidos à verificação de suas possíveis atividades contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* através do método bioautográfico que permite direcionar o isolamento e a identificação de

seus constituintes ativos.

1.5 Objetivos

- Descrição dos principais metabólitos secundários, através do fracionamento cromatográfico dos extratos de polaridade média das folhas e do caule de *Peperomia villipetiola*, e a determinação estrutural das substâncias isoladas que foi baseada em análises espectrométricas.
- Obter dados para a quimiotaxonomia da química da família Piperaceae, especialmente de espécies de *Peperomia*, que são pouco investigadas. Especificamente neste caso, foi escolhida a espécie *Peperomia villipetiola*, uma espécie peruana, em função da carência de dados sobre as espécies que lá ocorrem, sendo que a maior parte é endêmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

2.1.1. Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

- Bruker, modelo AC-200, de 200Hz.
- VARIAN, modelo DPX-300, de 300Hz.
- Bruker DRX-500, de 500Hz.

2.1.2. Espectrômetro de massas

- Espectrômetro Shimadzu modelo MS-QP-5050, acoplado a um cromatógrafo Shimadzu, modelo CG-17A (IQ-USP), com ionização por impacto de elétrons (70 eV), equipado com coluna capilar DB5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro.

2.1.3. Espectrofotômetro no Infravermelho

- Espectrofotômetro Bomen 100, Perkin Elmer, empregando-se pastilha KBr ou filme.

2.1.4. Espectrofotômetros no Ultravioleta

- Philips U-300.

2.1.5. Cromatógrafo líquido de alta eficiência

- Bomba: Shimadzu, modelo LC-10AD, com detector SPD-10AD Shimadzu, integrador CBM-10A e injetor automático Shimadzu SIL-10A, utilizando coluna analítica de fase reversa, Supelcosil LC-18, 25 cm x 4,6 mm, 5µm da Supelco.

2.2. Materiais

2.2.1. Cromatografia em camada delgada analítica ou comparativa

2.2.1.1. Fase estacionária

- Para cromatografia em camada planar comparativa (CPC) utilizou-se, como fase estacionária sílica gel 60 F 254 com partículas de tamanho 4-45 µm e espessuras de 0,50 mm, da Merck sob suporte de alumínio.

2.2.1.2. Agentes reveladores

- As revelações foram efetuadas com irradiação de luz na região do UV (254 e 360 nm) ou sulfato cérico seguido de aquecimento.
-

2.2.2. Cromatografia em camada delgada preparativa

2.2.1.1. Fase estacionária

- Foram utilizados dois tipos de cromatografia em camada delgada preparativa: a planar (CPP) e a radial (CRP), utilizando-se, em ambos casos, como fase estacionária, sílica gel 60 PF 254 com partículas de 4-45 µm e uma espessura de 1mm para a planar e 2 mm para a radial.

2.2.2.2. Agentes reveladores

- As revelações foram efetuadas com irradiação de luz na região do UV (254 e 360 nm).

2.2.3. Cromatografia em coluna (CC)

2.2.3.1. Fase estacionária

- A fase estacionária empregada para cromatografia em coluna sob vácuo foi sílica gel 60 com partículas de 63-210 µm da Merck.

2.2.3.2. Solventes

- Para cromatografia, utilizaram-se solventes P.A. da Supren e Synth.

2.2.4. Outros solventes

- Solvente deuterado da Acros, CDCl₃.

2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

2.2.5.1. Fase estacionária

- Coluna analítica de fase reversa, Supelcosil LC-18, 25cm x 4,6mm, 5µm.

2.2.5.2. Fase móvel

- Utilizaram-se como eluentes MeOH grau CLAE da Merck e água MilliQ.

2.2.6. Material Botânico

- O espécime da *Peperomia villipetiola* (Foto 2) foi adquirido pelo Dr. Guillermo Delgado Paredes no Mercado Modelo de Chiclayo, numa loja de plantas medicinais no dia 2 de março de 2001. O espécime é procedente de Miracosta, província de Chota, departamento de Cajamarca, numa altitude entre 1800 e 2000 m.s.n.m.
- O material vegetal foi identificado pelo M. Sc. botânico Santos Llatas Quiroz, diretor do herbário Pedro Ruiz Gallo (Lambayeque-Perú), da Faculdade de Ciências Biológicas, de acordo com a descrição realizada por William Trelease na coleção "Flora of Perú" de F. Macbride (1936). Uma

amostra do material vegetal está depositada neste herbário sob os números 12146 e 12147.

A classificação botânica da espécie *Peperomia villipetiola*, de acordo com o Sistema de classificação de Angiospermas proposto por Cronquist (1981) encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5: Classificação morfológica da família Piperaceae, Cronquist (1981)

Reino	Plantae
Divisão	Angiospermae A. Brau & Doill (Magnoliophyta)
Classe	Dicotyledonae
Subclasse	Magnolidae
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae Agardth
Gênero	<i>Peperomia</i>
Espécie	<i>villipetiola</i>

Foto 2: *Peperomia villipetiola*

2.3. Metodologia

2.3.1. Preparação dos extratos

Para preparar os extratos das folhas e os caules da *Peperomia villipetiola*, escolheu-se como solvente a mistura DCM:MeOH (2:1), visto que para a maioria dos estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Piper* e *Peperomia*, as substâncias presentes foram extraídas com solventes de alta, media e baixa polaridade, como MeOH, DCM, EtOAc, Ep, ou C₆H₆, e solúveis em DCM e EtOAc, optou-se pela utilização de DCM como solvente principal o DCM e MeOH como secundário, para uma extração eficaz.

- As folhas e o caule de *Peperomia villipetiola*, foram secadas em estufa a 40°C por 72 horas. Em seguida foram finamente divididos em um moinho de facas, obtendo-se 1,94 e 3,97g de pó das folhas e os caules, respectivamente.
- Para a extração, o pó foi tratado por um minuto com DCM:MeOH (2:1) (3x120mL) com auxílio de um homogeneizador Politron a uma velocidade de 1900 rpm.
- A etapa seguinte foi a filtração em gravidade e a concentração dos extratos no rotaevaporador, obtendo-se 0,26 e 0,44 g dos extratos de folhas e caule, respectivamente.

2.3.2. Análise preliminar dos extratos

2.3.2.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

- A análise preliminar dos constituintes químicos presentes nos extratos das folhas e dos caules foi baseada em cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando-se como eluentes uma mistura de Hex-EtOAc (8:2).
- Observou-se uma grande semelhança entre os dois extratos, motivo pelo qual, decidiu-se analisar os extratos através de CLAE, para obter um perfil mais definido, e devido a semelhança observada, reuniram-se os extratos das folhas e o caule, obtendo-se 0,7 g.

2.3.2.2-Análise dos extratos via CLAE

- A escolha da coluna e da fase móvel foi baseada nas análises realizadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em espécies de *Piper*. Experimentaram-se diversas condições, com a finalidade de obter uma boa separação das substâncias presentes em ambos extratos.

- A escolha do comprimento de onda para a detecção baseou-se nas análises feitas no laboratório e na literatura, que indicou que as substâncias de espécies de *Piper* e *Peperomia* apresentavam geralmente absorções aproximadamente em 290 nm, correspondentes às absorções benzenoídicas.

Tabela 6: Gradiente utilizado para a análise dos extratos das folhas e do caule da *Peperomia villipetiola* por CLAE.

Tempo (minutos)	% de MeOH	% de H ₂ O
5	40	60
35	100	0
40	100	0

- Concentração aproximada da amostra, 1mg/mL; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 15 µL; 290 nm.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu LC-10AD; detetor, SPD-10AD e controlador CBM-10A.

Figura 6. Cromatograma do extrato DCM:MeOH das folhas da *Peperomia villipetiola*, obtido por CLAE.

Figura 7. Cromatograma do extrato DCM:MeOH dos caules da *Peperomia villipetiola*, obtido por CLAE.

2.3.3. Fracionamento do extrato bruto e purificação das substâncias presentes em maior quantidade.

Em geral, os extratos brutos de plantas, mesmo quando utilizam-se solventes poucos polares, podem ser muito complexos e ricos em diversos componentes, dificilmente separáveis (Matos, 1984). Considerando-se que na extração utilizou-se uma mistura de solventes de polaridade intermediária e que a análise por cromatografia líquida indicou a presença de substâncias de polaridade variável, foi iniciada a purificação através do emprego de uma coluna cromatográfica com a finalidade de fracionar o extrato em misturas menos complexas.

Assim, o extrato reunido (0,7 gramas) foi aplicado a uma coluna cromatográfica sob vácuo (Sílica gel de 63-210 μm), que foi fracionado em 30 frações de (220 mL cada uma), usando-se como fase móvel uma mistura de eluentes Hex:EtOAc, com incremento gradual de polaridade. Através desse processo eluiu-se em etapas sucessivas, grupos de substâncias, os quais posteriormente puderam ser submetidos a etapas cromatográficas subseqüentes (Esquema 7).

Após a coleta de 30 frações, realizou-se um exame preliminar através de cromatografia de camada delgada de sílica utilizando-se como eluente uma mistura de Hex:EtOAc (8,5:1,5). Com base na semelhança, as 30 frações foram reunidas em oito frações. Posteriormente, as substâncias foram purificadas por cromatografia em placa preparativa de sílica utilizando-se esta mesma condição eluotrópica. No Esquema 7, observa-se o fracionamento do extrato bruto e a purificação das substâncias presentes. Na Tabela 7, observam-se os dados obtidos do fracionamento: massas das frações e % dos eluentes necessários para o fracionamento. Na tabela 8, observam-se as massas totais das substâncias isoladas do extrato, de acordo o esquema 7.

Esquema 7. Fracionamento do extrato bruto e purificação das substâncias presentes em maior quantidade.

Tabela 7: Massas das frações obtidas, (V:V) eluentes e frações reunidas do fracionamento cromatográfico em coluna (CC) do extrato reunido das folhas e o caule de *Peperomia villipetiola*.

Nº Fração	Massas (gramas)	Eluentes: Hex/EtOAc (V:V)	Grupo
1	-	-	-
2	0,0018	95:5	a
3	0,1115	95:5	a
4	0,2184	95:5	b
5	0,0642	9:1	c
6	0,0241	9:1	d
7	0,0115	9:1	d
8	0,0068	4:1	e
9	0,0055	4:1	e
10	0,0058	4:1	f
11	0,0007	4:1	f
12	0,0062	4:1	f
13	0,0035	4:1	f
14	0,0107	3:2	g
15	0,0526	3:2	g
16	0,0452	3:2	g
17	0,0213	3:2	g
18	0,0112	3:2	g
19	0,0085	3:2	g
20	0,0067	3:2	g
21	0,0067	3:2	h
22	0,0075	3:2	h
23	0,0098	3:2	h
24	0,0039	3:2	h
25	0,0048	3:2	h
26	0,0074	3:2	h
27	0,0077	2:3	h
28	0,0071	2:3	h
29	0,0080	0:1	h
30	0,0178	MeOH	h
Total	0,6969		

Tabela 8: Massas obtidas das substâncias isoladas do extrato, de acordo o esquema 7.

Substância	Massa (mg)
PVL1	118,21
PVL2	29,44
PVL3	106,92
PVL4	29,89
PVL5	126,94
PVL6	24,50
PVL7	72,69
Miristicina	4,00
PVL2+ PVL4	1,10
PVL1+ PVL2+ PVL3	21,47
PVL1+ PVL2+ PVL3 + PVL4	1,00
PVL4+ PVL7	4,89
PVL6+ impureza polar	15,90

2.4. Ensaio antifúngico bioautográfico com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*

O ensaio fungicida foi realizado no laboratório de Fisiologia e Bioquímica de plantas no instituto de Botânica, a técnica empregada neste experimento foi a bioautografia direta (Homans, 1970), executada pela Dra Maria Cláudia Marx Young.

A detecção de substâncias fungitóxicas foi realizada após a eluição dos constituintes químicos em CPC de sílica gel (Hostettmann, 1990). Após a evaporação do solvente, o cromatograma é borrifado com suspensão conidial de fungo contendo nutrientes necessários para crescimentos da colônia.

A solução contendo os nutrientes é previamente autoclavada a 120°C por 20 minutos. Adicionam-se ainda 10 mL de uma solução de glicose para cada 60 mL da suspensão de esporos.

Numa etapa seguinte faz-se a incubação da placa em atmosfera úmida por 2-3 dias a 25°C. Após este período verifica-se há zonas de inibição que comprova a presença de substâncias fungitóxicas. As zonas de inibição são visualizadas diretamente na placa de CPC, como manchas brancas contra um fundo cinza-escuro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. 3-Metoxi-4,5-metilenodioxi-alil-benzeno (Miristicina)

O espectro de RMN de ^1H da amostra obtida apresentou entre os sinais mais intensos, dois singletos característicos de grupamentos metoxílicos e metilenodioxifenílicos em 3,88 δ (3H, s) em 5,92 δ (2H, s), respectivamente. Observou-se também dois dubletos em 6,37 δ (1H, s, $J = 1,4$ Hz) e 6,34 δ (1H, s, $J = 1,4$ Hz), cujas constantes de acoplamento são compatíveis de acoplamento *meta*. Finalmente, observou-se um dubleto em 3,28 δ (2H, d, $J = 6,6$ Hz) que associados aos sinais de hidrogênios alílicos e olefínicos em 5,92 (1H, m), 5,02 (1H, dd; 1,7; 8,0 Hz) e 5,08 δ (1H, dd; 1,7; 17,0 Hz) permitiram sugerir a substância como o fenilpropanóide miristicina (4,5-Metilenodioxi-3-metoxi alil-benzeno, figura 8). O espectro de massas (CG-EM) da substância apresentou pico relativo ao íon molecular (M^+) em 192.20 Da (Figura 9, página 86), que associado aos íons fragmentários m/z 177, m/z 165, 161, 91 e 77, foram compatíveis com a estrutura sugerida.

A confirmação de sua identidade foi feita através da comparação cromatográfica (CCDC) com o uso de padrão autêntico, isolado previamente de *Piper regnellii* (Benevides et al. 1999).

Figura 8. 4,5-Metilenodioxí,3-metoxi -alil-benzeno (miristicina)

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) observados para a miristicina.

Posição (H)	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J/Hz)
2	6,37 (1H, d, 1,4 Hz)
6	6,34 (1H, d, 1,4 Hz)
7	3,28 (2H, d, 6,6 Hz)
8	5,92 (1H, m)
9a	5,02 (1H, dd, 1,7, 8,0 Hz)
9b	5,08 (1H, dd, 1,7, 17,0 Hz)
OMe	3,88 (s, 3H)
OCH ₂ O	5,92 (s, 2H)

3.2. Cromenos

3.2.1. Grupo I: PVL1 e PVL2

A análise elementar da substância **PVL1** apresentou dados compatíveis com a fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_4$. O espectro de massas apresentou o pico molecular em M^+ , 248.10 Da (Figura 10) e o pico base em m/z 233, justificado pela eliminação de um radical metílico (Esquema 8, página 49) gerando um cátion estável, característico de um 2,2-dimetil-cromeno (Budzikiewicz, 1964). No caso da substância **PVL2**, a fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_4$ resultou da análise elementar e do espectro de massas que apresentou o pico molecular em m/z 262.25 Da (Figura 22). Seu espectro de massas apresentou ainda o pico base em m/z 247 também devido à eliminação de um radical metílico (Esquema 9, página 50), característico de 2,2-dimetil-cromenos (Budzikiewicz, 1964). Esse dado sugeriu a princípio que **PVL2** fosse **PVL1** metilado.

O espectro na região do IV da substância **PVL1** (Figura 11) apresentou bandas de absorção em 3.447 cm^{-1} (banda larga) relativo ao grupo hidroxílico quelado e, em 1.644 cm^{-1} , uma banda característica de estiramento de carbonila, correspondente a carbonila quelada. O espectro de **PVL2** (Figura 23) não apresentou banda de estiramento de hidroxila, mas sim de estiramento da carbonila de éster aromático em 1.729 cm^{-1} . Adicionalmente, ambas apresentaram bandas entre $2.975\text{--}2.850\text{ cm}^{-1}$, devidas à deformação axial de C-H da metila e um conjunto ainda em $1.634\text{--}1.602/1.462\text{--}1.441\text{ cm}^{-1}$ devido aos estiramentos C=C de ligação dupla conjugada e de anéis aromáticos.

Os espectros no UV da **PVL1** e **PVL2** (Figura 12 e 24) apresentaram cada um dois máximos de absorção em 252 (22.970), 258 (23.332), 290 (3.929) e em 236 e 286 (banda larga) nm (ϵ 18.791 e 10.983), respectivamente, indicativas de sistemas conjugados. Onde as absorções de menor intensidade em **PVL1** e **PVL2** são correspondentes as transições $n\text{--}\pi^*$ de carbonilas.

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **PVL1** e **PVL2**, apresentaram em geral o mesmo padrão de sinais e acoplamentos. Observaram-se sinais relativos ao sistema AB em $5,52\text{ }\delta$ (1H, d, $J=10,0\text{ Hz}$) e $6,69\text{ }\delta$ (1H, d, $J=10,0\text{ Hz}$), que associadas aos singletos relativos aos grupos *gem*-dimetílicos em $1,43\text{ }\delta$ (6H) permitiram caracterizar o sistema 2,2-dimetil-2H-1-cromeno (Baldoqui et al., 1999).

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **PVL1** (Figura 13) e **PVL2** (Figura 25) apresentaram sinais correspondentes a um único hidrogênio aromático em 6,19 e 6,23 δ , respectivamente, indicando a presença de um anel aromático pentasubstituído. Observaram-se singletos correspondentes a grupos metílicos ligados a anel aromático em 2,46 e 2,29 δ , respectivamente. As principais diferenças, além dos deslocamentos dos sinais acima mencionados, refere-se à presença de uma hidroxila quelada (11,97 δ , 3H, s) em **PVL1**, portanto, em posição *orto* ao grupo carboxílico, confirmando as informações extraídas do espectro no IV. Observou-se no caso de **PVL2**, um sinal em 3,81 δ , relativo a um grupo metoxílico que confirmaria a sugestão preliminar inferida a partir dos dados de EM.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos, são relativamente protegidos e compatíveis com suas posições *orto* à oxigênio, mas como diversas alternativas seriam aceitáveis como propostas estruturais recorreu-se aos dados de RMN de ^{13}C (Figuras 14 e 24, Tabela 10) para a elaboração de propostas estruturais. Os deslocamentos químicos foram compatíveis com estruturas de cromenos derivados de ácidos benzóicos. O cromeno **PVL1** apresentou 13 sinais pertencentes aos 14 carbonos do cromeno, enquanto **PVL2** apresentou 14 sinais pertencentes aos 15 carbonos. O sinal adicional em **PVL2** foi atribuído ao carbono metoxílico (55,62 δ), ausente em **PVL1**. Foram confirmadas as presenças dos ésteres metílicos através dos pares de sinais em 172,41/51,79 δ para **PVL1** e 168,44/51,74 δ em **PVL2**. O sinal correspondente ao carbono carbinólico C2 foi confirmado pelos sinais em 77,28 δ e 76,41 δ para **PVL1** e **PVL2**, respectivamente.

Nos espectros de RMN de ^{13}C - Dept 135° e HETCOR da **PVL1** (Figura 15 e 16, Tabela 10) e **PVL2** (27 e 28, Tabela 10), foram observados sinais comuns, correspondentes à porção cromênica, sendo dois correspondentes aos carbonos CH olefinicos e duas metilas geminais que apresentam um mesmo sinal. Constatou-se ainda a presença de uma metila aromática, um C-H aromático e uma metoxila de éster.

Figura 17. Estruturas das substâncias **PVL1** e **PVL2**.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para **PVL1** e **PVL2**.

Posição (C)	PVL1		PVL2	
	δ ^1H (multiplicidade, J/Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (multiplicidade, J/Hz)	δ ^{13}C
2	-	77,28 (C)	-	76,41 (C)
3	5,52 (d, 10, 1H)	127,42 (CH)*	5,53(d, 10, 1H)	128,62 (CH) *
4	6,69 (d, 10, 1H)	116,37 (CH)*	6,59(d, 10, 1H)	116,47 (CH) *
4a	-	107,29 (C)	-	108,64 (C)
5	-	159,80 (C)	-	155,66 (C)
6	-	105,10 (C)	6,23(s, 1 H)	104,79 (CH) *
7	-	142,74 (C)	-	137,34 (C)
8	6,19 (s, 1 H)	111,86 (CH)*	-	116,04 (C)
8a	-	157,53 (C)	-	151,59 (C)
9	2,46 (s, 3 H)	24,41 (CH_3) *	2,29 (s, 3 H)	20,26 (CH_3) *
10/11	1,43 (s, 6 H)	28,26 (CH_3)*	1,39 (s, 6 H)	27,57 (CH_3)*
1'	-	172,41 (C)	-	168,44 (C)
2'	3,92 (s, 3 H)	51,79 (CH_3)*	3,87 (s, 3 H)	51,74 (CH_3) *
1''	-	-	3,81 (s, 3 H)	55,62 (CH_3) *
Ar-OH	11,97 (s, 1 H)	-	-	-

* Multiplicidade obtida por RMN de $^{13}\text{C}/\text{Dept } 135^\circ$ associada aos dados do espectro HETCOR (300 MHz, δ (J) Hz, CDCl_3).

A análise dos espectros de HMBC de **PVL1** (Figura 18) e **PVL2** (Figura 29) permitiram confirmar e atribuir a porção correspondente ao anel heterocíclico do cromeno através das correlações entre o hidrogênio H3 e os carbonos C2, C4a e C10/11, entre o hidrogênio H4 e os carbonos C2, C5 e C8a.

A escolha entre as diversas possibilidades estruturais para **PVL1** e **PVL2**, envolvendo os substituintes metílicos, hidroxílicos (ou metoxílicos) e o éster, (Tabela 11) foi baseada nas correlações observadas nos espectros de RMN/HMBC. No caso de **PVL1** observou-se correlação entre o hidrogênio do grupo hidroxílico com os sinais relativos aos carbonos C4a, C5 e C6, que permitiu a definição do grupo hidroxílico no C5. Considerando que a hidroxila está quelada, o carbono C6 deve sustentar a função éster. O posicionamento da metila aromática em C7 foi definida pelas correlações de seus hidrogênios com os sinais relativos aos carbonos C6, C7 e C8.

Finalmente, o hidrogênio H8 apresentou correlações com os carbonos vizinhos metílico e C8a. Portanto, o cromeno **PVL1** foi proposto como sendo 5-hidroxi-7-metil-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 17).

No caso de **PVL2**, o hidrogênio aromático apresentou-se correlacionado com os carbonos C4a, C8, C5 e também com carbono metílico C9. Considerando que este último carbono, o C5, estaria correlacionada com o H4, foi possível propor para **PVL2** a estrutura 7-metil-5-metóxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-8-carboxilato de metila (Figura 17).

Figura 21. Algumas correlações observadas no espectro HMBC de PVL1 e PVL2 (CDCl₃, 500 e 125 MHz).

Tabela 11. Dados de HMBC (CDCl₃, 500 e 125 MHz) para PVL1 e PVL2.

Posição (H)	PVL1	PVL2
	HMBC (H → C)	HMBC (H → C)
3	C2, C4a, C10/11	C2, C4a, C10/11
4	C2, C5, C8a.	C2, C5, C8a.
6	-	C4a,C5,C8,C9
8	C4a, C6, C8a, C9.	-
9	C6, C7, C8.	C6, C7,C8
10/11	C2, C3.	C2,C3
2'	C1'	C1'
1''	-	C5
Ar-OH	C4a, C5, C6.	-

Esquema 8. Proposta de fragmentação do cromeno **PVL1** no espectrômetro de massas.

Esquema 9. Proposta de fragmentação do cromeno **PVL2** no espectrômetro de massas.

3.2.2. Grupo II: PVL3 e PVL4

As substâncias **PVL3** e **PVL4** tiveram suas fórmulas moleculares propostas como $C_{14}H_{16}O_4$ e $C_{15}H_{18}O_4$, de acordo com os dados fornecidos pelos dados de análise elementar e espectrometria de massas. Os espectros de massas apresentaram, além dos íons moleculares (m/z 248.15 Da para **PVL3**; m/z 262.10 Da para **PVL4**), o pico base em m/z 233 e m/z 247 para **PVL3** (Figura 31) e **PVL4** (Figura 41) respectivamente, devido às eliminações de um radical metílico (Esquema 10 e 11) (Budzikiewicz, 1964). E, de maneira semelhante aos cromenos do grupo I, **PVL4** poderia ser **PVL3** metilada.

O espectro no IV de **PVL3** (Figura 32) apresentou bandas de absorção similares ao da **PVL1**, entre as quais se observam em 3.442 cm^{-1} característico do estiramento do grupo hidroxílico que estaria quelado por uma carbonila aromática que absorve em 1.655 cm^{-1} .

No caso de **PVL4** (Figura 42), observou-se banda de absorção característica de estiramento da carbonila do éster aromático em 1.731 cm^{-1} , mas não se observou a banda característica do grupo hidroxílico quelado próxima a 3.400 cm^{-1} . Configurou-se novamente um par de cromenos sendo **PVL4**, um produto metilado de **PVL3**.

Os espectros no UV de **PVL3** e **PVL4** (Figura 33 e 43) apresentam dois máximos de absorção em 247 e 251 nm (ϵ 26462 e 25994) e em 283 e 225 nm (ϵ 6679 e 23854) respectivamente. Observou-se ainda as bandas de absorção de carbonila conjugada em 318 nm (Baldoqui et al., 1999).

O espectro de RMN de ^1H da **PVL3** (Figura 34, Tabela 12) apresentou sinais semelhantes àqueles apresentados por **PVL1** (5-hidroxi-7-metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila) indicando a possibilidade de **PVL3** ser um cromeno isomérico. Observou-se sinal correspondente à hidroxila quelada em 11,39 δ , o que coadunaria com as diferenças nos espectros no IV quando comparado com aquele de **PVL4** (Figura 44, Tabela 12). Novamente as diferenças nas fórmulas moleculares e a semelhança dos sinais, indicaram que **PVL4** seria um produto metilado ou um isômero de **PVL2**.

Os dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C de **PVL3** e **PVL4** (Figura 35 e 45, Tabela 12) foram importantes para a elucidação estrutural destes cromenos. Observou-se no caso de **PVL3**, que somente alguns sinais foram similares aos

apresentados pela **PVL1**. Assim dos treze sinais de **PVL3**, seis deles apresentaram deslocamentos próximos aos de **PVL1**, enquanto os sete restantes (C4a ao C9) diferiram, apoiando a possibilidade da isomeria entre eles. No caso de **PVL4**, o espectro de RMN de ^{13}C apresentou 14 sinais semelhantes aos observados no espectro de **PVL2**, esses dados junto com os de RMN de ^1H , permitiu sugerir a possibilidade de tratar-se de um cromeno isomérico de **PVL2** e possivelmente o produto metilado de **PVL3**.

Nos espectros de RMN de ^{13}C - Dept 135° e HETCOR (Tabela 12) da **PVL3** (Figura 36 e 37) e **PVL4** (Figura 46 e 47), de maneira semelhante aos cromenos do grupo I, foram observados seis sinais comuns a ambos. Como era esperado, **PVL4** apresentou um sinal a mais do que **PVL3**, atribuída ao carbono metoxílico (55,82 δ), compatibilizando-se com os dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C e ^1H .

Dentre as correlações observadas no espectro de HMBC do cromeno **PVL3** (Figura 38, Tabela 13), aqueles envolvendo a metoxila com a carbonila do éster (H-2' com 1'C=O), confirmou o grupo funcional. No entanto, diferentemente de **PVL1**, foram observadas correlações entre os hidrogênios da metila H9 com o carbono C4a e de H4 com o carbono C5, possibilitando definir a posição de substituição do grupo metila na posição C5. Por sua vez, os hidrogênios metílicos H9 apresentaram correlação com o carbono C6. Considerando a pressuposição de uma hidroxila quelada (IV e RMN de ^1H), as correlações entre o sinal do hidrogênio hidroxílico com os carbonos C6, C7 e C8 e, finalmente, as correlações entre o hidrogênio aromático H8 com os carbonos C4a, C6, C7 e C8a, foi possível determinar **PVL3** como 7-hidroxi-5-metil-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 51).

A estrutura do cromeno **PVL4** foi definida como sendo o derivado metilado de **PVL3** em função da compatibilidade dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 44, 45, Tabela 13). Considerando a introdução da metila adicional (C1'') e as correlações do C7 com os hidrogênios metoxílicos (H1'') e aromático H8 observadas no espectro de HMBC (Figura 48, tabela 13), foi possível determinar **PVL4** como 5-metil-7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 51).

Figura 39. Estruturas das substâncias **PVL3** e **PVL4**.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para **PVL3** e **PVL4**.

Posição (C)	PVL3		PVL4	
	δ ^1H (multiplicidade, J/Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (multiplicidade, J/Hz)	δ ^{13}C
2	-	76,22(C)	-	76,02
3	5,60 (d, 10,1 H)	128,75 (CH)*	5,55 (d, 10,1H)	128,30 (CH) *
4	6,56 (d, 10,1 H)	119,12 (CH)*	6,44 (d, 10,1H)	118,76 (CH) *
4a	-	113,86 (C)	-	113,09
5	-	137,39 (C)	-	132,34
6	-	106,4 (C)	-	117,11
7	-	164,03 (C)	-	157,23
8	6,29 (s, 1 H)	102,90 (CH)*	6,28 (s, 1H)	98,13 (CH) *
8a	-	158,86 (C)	-	155,24
9	2,48 (s, 3 H)	17,55 (CH ₃) *	2,20 (s, 3H)	15,36 (CH ₃) *
10/11	1,41(s, 6 H)	28,01 (CH ₃)*	1,40 (s, 6H)	27,72 (CH ₃) *
1'	-	172,16 (C)	-	169,00
2'	3,93 (s, 3 H)	51,91 (CH ₃)*	3,89 (s, 3H)	52,04 (CH ₃) *
1''	-	-	3,77 (s, 3H)	55,82 (CH ₃) *
Ar-OH	11,39 (s, 1H)	-	-	-

* Multiplicidade obtida por RMN de ^{13}C /Dept 135° associada aos dados do espectro HETCOR (300 MHz, δ (J) Hz, CDCl_3).

Figura 40. Algumas correlações observadas no espectro HMBC de **PVL3** e **PVL4**.

Tabela 13. Dados de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) para **PVL3** e **PVL4**.

Posição (H)	PVL3	PVL4
	HMBC (H $\rightarrow$ C)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
3	C2, C4a,C10/11	C2, C4a,C10/11
4	C2, C4a,C5,C8a	C2,C4a,C5,C8a
8	C4a,C6,C7,C8a	C4a,C6,C7,C8a
9	C4a,C5,C6	C4a,C5,C6
10/11	C2,C3	C2, C3
2'	C1'	C1'
1''	-	C7
Ar-OH	C6,C7,C8	-

Esquema 10. Proposta de fragmentação da substância **PVL3** no espectrômetro de massas.

Esquema 11. Proposta de fragmentação da substância **PVL4** no espectrômetro de massas

3.2.3. Grupo III: PVL5, PVL6 e PVL7.

As análises elementares e os espectros de massas das substâncias **PVL5** (Figura 52) e **PVL6** (Figura 63), associados à contagem de hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , permitiram sugerir as fórmulas moleculares $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$ e $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$, respectivamente. Ainda que não tenha sido possível observar os picos correspondentes aos íons moleculares em m/z 250 e 264, respectivamente, os espectros apresentaram os íons fragmentários em m/z 232 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 13 %) e m/z 217 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+-\text{CH}_3$, 100 %) para **PVL5** (Esquema 12, pg. 63), tais modos fragmentacionais, que não haviam sido observados nos espectros de massa dos Grupos I e II, também foram observados para **PVL6** (Esquema 13, pg. 64), resultando nos picos m/z 246 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 13%) e m/z 231 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+-\text{CH}_3$, 100 %). O primeiro é resultante do efeito *orto* enquanto o segundo envolve a eliminação de um radical da mesma maneira que os outros cromenos. Assim, caracteriza-se para os representantes deste grupo a eliminação de molécula de água, sugerindo a presença de funções álcool e/ou de ácido benzóico.

A análise elementar da substância **PVL7**, associado aos dados do espectro de massas (pico molecular em m/z 306.15 Da), foi compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (Figura 70). O espectro de massas apresentou pico base em m/z 291, novamente devido à eliminação de um radical metílico (Esquema 14, pg. 65), típico de 2,2-dimetilcromenos (Budzikiewicz, 1964).

No espectro IV da substância **PVL5** (Figura 53) destaca-se a presença de uma banda larga e intensa entre $2.500\text{--}3.600\text{ cm}^{-1}$, que foi atribuída às superposições de bandas das hidroxilas de ácido carboxílico, álcool metílico e de fenol. Observou-se em 1.724 cm^{-1} uma banda relativa à carbonila de ácido carboxílico.

O espectro de IV da substância **PVL6** (Figura 64) apresentou uma banda (larga e intensa) em 3.444 cm^{-1} , o qual foi atribuída à superposição das bandas de estiramento dos grupamentos hidroxílico do ácido carboxílico e do álcool metílico; a banda de $\text{C}=\text{O}$ de ácido carboxílico foi observada em 1.757 cm^{-1} .

Entre as principais bandas no espectro no IV da substância **PVL7** (Figura 74) observou-se uma larga em 3.457 cm^{-1} de hidroxila quelada; e, desta vez, duas bandas de carbonilas, a primeira em 1.662 cm^{-1} , de benzoato e, uma segunda, mais intensa em 1.739 cm^{-1} , referente a carbonila de acetato. Os

restantes das absorções foram semelhantes aos dos outros cromenos anteriormente descritos.

Os espectros no UV das substâncias **PVL5** e **PVL6** apresentam máximos de absorções em 244, 296 (ϵ 35385 e 4500) e 243, 299 nm (ϵ 41198 e 6081) (Figuras 54 e 65), as absorções de menor intensidade correspondem às transições $n-\pi^*$ de carbonilas.

O espectro no UV de **PVL7** apresentou dois máximos de absorções em 247 e 327 nm (ϵ 39991 e 8465) (Figuras 75).

Nos espectros de RMN de ^1H deste conjunto, além dos sinais característicos dos cromenos (Tabela 14), foram diversas as diferenças observadas como se segue. Ao invés do sinal referente às metilas aromáticas (3H), observou-se singletos (2H) entre 5,1 e 5,4 δ (Tabela 14) indicando a oxidação para o álcool. A maior desproteção observada para os hidrogênios oxibenzílicos em **PVL7**, determinou que uma acetilação ocorrera neste álcool. Os dados de RMN de ^{13}C (Dept e Hetcor) foram plenamente concordantes com os fatos acima. Os carbonos carbinólicos primários foram observados em 69,20 (**PVL5**), 67,19 (**PVL6**) e 60,24 δ (**PVL7**), sendo que seu posicionamento em C5 foi inferido pelos dados observados nos espectros de HMBC (Tabela 15) através das correlações entre os H9 com C4a, C5, C6 incluindo a carbonila C1'. Os hidrogênios aromáticos H8 foram definidos nesta posição em função das correlações com os carbonos C4a, C8a, C6, C7 e C1'.

No espectro de RMN de ^1H do cromeno **PVL6** (Figura 65, página 136) foram observados sinais semelhantes aos de **PVL5**, exceto pela substituição do singlete largo em 7,62 δ (1H) pelo singlete referente a um grupo metoxílico (3,92 δ , 3H, s), cujo carbono correspondente foi observado em 56,11 δ em seu espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 14, página 61). Assim, foi possível determinar **PVL5** como o ácido 7-hidroxi-5-metanol-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico (Figura 60).

Ácido 7-hidroxi-5-metanol -
2,2-dimetil-2H-1-cromeno-
6-carboxílico (**PVL5**)

Figura 60. Estrutura da substância **PVL5**.

No caso de **PVL6**, o espectro de HMBC (Figura 69, página 140) apresentou correlação entre os hidrogênios metoxílicos (OCH_3) e o carbono C7 que o sustenta (Tabela 15, página 62). Deste modo, foi possível determiná-lo como o ácido 5-metanol-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico (Figura 71), um produto metilado de **PVL5**.

Ácido 5-metanol-7-metóxi -
2,2-dimetil-2H-1-cromeno,
6-carboxílico
(**PVL6**)

Figura 71. Estrutura da substância **PVL6**.

O espectro de RMN de ^1H da **PVL7** (Figura 75, página 145) apresentou um perfil semelhante ao do cromeno **PVL3**, porém acrescido de um singlete em 2,07 δ (s, 3H) e da metoxila do éster em 3,90 δ , e ainda de uma hidroxila quelatada em 11,32 δ (Tabela 14, página 61). Tais grupos funcionais foram confirmados no espectro de RMN de ^{13}C . Observou-se o grupo acetato os sinais em 170,62 e 20,74 δ , devido aos carbonos carbonílico e metílico (COCH_3), respectivamente. O éster metílico, através do sinal em 52,25 δ . O sinal em 60,24 δ foi atribuído ao carbono benzílico (OCH_2), agora mais protegido com relação a **PVL5** e **PVL6**, em

função do efeito γ exercido pela metila do grupamento acetato. O espectro de HMBC (Figura 80, página 149) apresentou correlações semelhantes aos observados para o cromeno **PVL5** e também entre o hidrogênio da metila do grupo acetato H-2'' e o correspondente carbono carbonílico do acetato C1''; o hidrogênio do grupo metoxílico H-2' e seu correspondente carbono do éster aromático C1', e ainda entre H9 e os carbonos C4a, C5, C6 e C1' (Tabela 15, página 62). Tais informações permitiram determinar a substância **PVL7** como sendo o produto acetilado de **PVL3**, o 5-acetoximetanol-7-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 82).

5-Acetoximetanol-7-hidroxi-2,2-
dimetil-2*H*-1-cromeno-6-
carboxilato de metila
(PVL7)

Figura 82. Estrutura da substância **PVL7**.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) para **PVL5**, **PVL6** e **PVL7**.

Posição (C)	PVL5		PVL6		PVL7	
	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
2		77,94 (C)		78,10 (C)		76,58 (C)
3	5,61 (d, 10,1H)	129,55 (CH)*	5,59 (d, 10,1H)	129,06 (CH)*	5,69 (d, 10, 1H)	130,47 (CH) *
4	6,13 (d, 10,1H)	116,42 (CH)*	6,15 (d, 10,1H)	116,35 (CH)*	6,53 (d, 10, 1H)	118,07 (CH) *
4a		108,46 (C)		107,64 (C)		115,42 (C)
5		142,81(C)		145,72 (C)		132,24 (C)
6		103,81(C)		105,98 (C)		106,19 (C)
7		157,35 (C)		159,60 (C)		163,91 (C)
8	6,33 (s, 1H)	103,73 (CH)*	6,35 (s, 1H)	99,99 (CH)*	6,46 (s, 1H)	105,61 (CH) *
8a		160,86 (C)		160,03 (C)		158,88 (C)
9	5,23 (s, 2H)	69,20 (CH ₂)*	5,15 (s, 2H)	67,19 (CH ₂)*	5,40 (s, 2H)	60,24 (CH ₂) *
10/11	1,45 (s, 6H)	28,26 (CH ₃)*	1,46 (s, 6H)	28,33 (CH ₃)*	1,43 (s, 6H)	28,03 (CH ₃) *
1'		172,27 (C)		168,84 (C)		170,99 (C)
2'					3,90 (s, 3H)	52,25 (CH ₃) *
1''			3,92 (s, 3H)	56,11 (CH ₃)*		170,62 (C)
2''					2,07 (s, 3H)	20,74 (CH ₃) *
CH ₂ OH	7,62 (s, 1H)					
Ar-OH					11,32 (s, 1H)	

* Multiplicidade obtida por RMN de $^{13}\text{C}/\text{Dept } 135^\circ$ associada aos dados do espectro HETCOR (300 MHz, δ (J) Hz, CDCl_3).

Figura 81. Algumas correlações observadas no HMBC das substâncias **PVL5**, **PVL6** e **PVL7**.

Tabela 15. Dados de HMBC (CDCl₃, 500 e 125 MHz,) para **PVL5**, **PVL6** e **PVL7**

Posição (H)	PVL5	PVL6	PVL7
	HMBC (H → C)	HMBC (H → C)	HMBC (H → C)
3	C2,C4a,C10/11	C2,C4,C10/11	C2,C4a,C10/11
4	C2,C4a,C5,C8a	C2,C4a,C5,C8a	C2,C4a,C5,C8a
8	C4a,C6,C7, C8a, C1'	C4a,C6,C7, C8a, C1'	C4a,C6,C7, C8a
9	C4a,C5,C6,C1'	C4a,C5,C6,C1'	C4a,C5,C6, C1'
10/11	C2,C3	C2,C3	C2,C3
2'	-	-	C1'
1''	-	C7	-
2''	-	-	C1''
Ar-OH	-	-	C6, C7,C8

Esquema 12. Proposta de fragmentação da substância **PVL5** no espectrômetro de massas

Esquema 13. Proposta de fragmentação da substância **PVL6** no espectrômetro de massas

Esquema 14. Proposta de fragmentação da substância **PVL7** no espectrômetro de massas.

3.3. Identificação cromatográfica dos cromenos PVL1-PVL7 caracterizadas.

Após o isolamento das substâncias obtidas, as mesmas foram analisadas por CLAE com o objetivo de identificar sua presença no cromatograma do extrato das folhas, utilizando a rampa desenvolvida (Tabela 6, pg 34).

Constatou-se que os principais constituintes foram isolados.

Figura 84. Identificação das substâncias **PVL1-PVL7** no cromatograma do extrato de folhas de *Peperomia villipetiola*.

3.4- Avaliação dos resultados biológicos

Ensaio antifúngico bioautográfico com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*

Os extratos das folhas, do caule e as substâncias purificadas de *Peperomia villipetiola* tiveram suas atividades avaliadas contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, pelo método de bioautografia direta aplicadas em placa cromatográfica de sílica, na dose de 100 e 400 µg.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 16, de maneira qualitativa, pois a finalidade inicial foi a de avaliar preliminarmente se as substâncias apresentavam alguma atividade fungicida frente a *Cladosporium*

cladosporioides e *Cladosporium sphaerospermum*.

Tabela 16. Valores do potencial de inibição do crescimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* nos extratos das folhas, do caule e das substâncias obtidas de *Peperomia villipetiola*.

Amostra	Quantidade (µg)	Bioautografia em camada delgada			
		<i>C. sphaerospermum</i>		<i>C. cladosporioides</i>	
		Rf	Potencial	Rf	Potencial
PVL1	100	0,84	*	0,84	*
PVL3	100	i	-	i	-
PVL2	100	0,83	*	0,83	*
PVL4	100	0,83	*	0,83	*
PVL7	100	0,85	***	0,85	***
PVL6	100	0,76	**	0,76	***
PVL5	100	0,78	*	0,78	*
EF•	400	0,40/0,48/0,61/ 0,76	*/*/***/ ***	0,40/0,48/0,61/ 0,76	*/*/***/ ***
EC•	400	0,61/0,71	**/**	0,40/0,48/0,61/ 0,71	*/*/***/ **

O eluente utilizado para a eluição foi solvente CHCl₃ / MeOH (9:1)

• EF e EC = Extrato das folhas e do caule de *Peperomia villipetiola*.

i: indica inativo, * : indica atividade fraca; ** : indica atividade moderada; *** : forte.

A substância **PVL3** não mostrou atividade frente ao crescimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, enquanto **PVL1**, **PVL2**, **PVL4** e **PVL5** apresentaram discreta atividade a 100 µg.

As substâncias com atividade moderada foram **PVL6** e **PVL7** frente aos dois fungos testados, e assim, foram determinadas as concentrações inibitórias mínima (CIM) necessárias para a inibição do crescimento da colônia em meio líquido para as duas substâncias . Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16.

Utilizou-se a nistatina como padrão, fungicida que comercialmente tem uso terapêutico como antimicótico em tratamentos contra um fungo semelhante a uma levedura, a *Candida albicans*, que pode provocar doença conhecida comumente como sapinho, ou monilíase, uma infecção fúngica bucal, entre outras como assaduras e vaginites (www.saudeinformacoes.com.br/bebe_sapinho.asp).

Tabela 17. Potencial de inibição do crescimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* das substâncias purificadas de *Peperomia villipetiola*.

Fungo Substância	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>						<i>C. cladosporioides</i>					
	100µg	50µg	25µg	10µg	5µg	1µg	100µg	50µg	25µg	10µg	5µg	1µg
PVL6	***	**	*	*	*	*	***	***	***	**	*	*
PVL7	**	**	**	**	**	**	***	***	***	***	***	**
Padrão (nistatina)				***	***	***				***	***	***

Eluente utilizado: CHCl₃ / MeOH (9:1).

Na avaliação preliminar constatou-se que as substâncias mais ativas entre os cromenos foram a **PVL6** e **PVL7**. A determinação da CIM indicou que **PVL6** era fortemente ativa contra *C. sphaerospermum* a 100µg e contra *C. cladosporioides* a 25µg. A **PVL7**, por sua vez, não apresentou linearidade de resposta mantendo-se moderadamente ativa na faixa de 100-1 µg contra *C. sphaerospermum*, mas fortemente ativa até 5 µg e moderadamente ativa até 1 µg.

As diferenças estruturais entre **PVL7** e **PVL3** envolvem a presença da função acetato (Esquema 15), sugerindo que a substituição deve ser essencial para a atividade da substância.

Comparação direta pôde ser realizada entre as substâncias **PVL5** e **PVL6** (Esquema 16), onde constatou-se um aumento da atividade quando o fenol é metilado, fato curioso, pois normalmente observa-se o inverso.

Esquema 15. Comparação entre as estruturas dos cromenos **PVL3** e **PVL7**.

Esquema 16. Comparação entre as estruturas dos cromenos **PVL5** e **PVL6**.

BIOGÊNESE DOS CROMENOS DE
Peperomia villipetiola

4. Biogênese dos cromenos isolados da *Peperomia villipetiola*.

Através da análise das estruturas dos cromenos isolados de *P. villipetiola* constata-se que porção aromática é oriunda do ácido orselínico que ocupa papel central na formação de todos os cromenos isolados (Esquema 17). A etapa de alquilação, mediada por uma prenilttransferase, poderia envolver o pirofosfato de 3,3-dimetilalila (oriunda da via do mevalonato ou da via do fosfato de metileritritol), ou ainda o pirofosfato de isopentenila. Esta reação ocorre nas duas posições livres do ácido orselínico resultando nos cromenos **PVL1/PVL2** e **PVL3-PVL7**. O produto intermediário **1** poderia ser epoxidado em **2** que, por sua vez, poderia sofrer ataque nucleofílico pelo oxigênio da hidroxila fenólica pelas rotas a ou b para gerar os produtos **3** ou **5** contendo anéis pirânicos. Em ambos casos, seguem-se reações de desidratação formando **4/6**, com o cromeno formado. O cromeno **PVL1** seria formado a partir da reação de metilação do ácido carboxílico **4**, enquanto o **PVL2**, de forma análoga, a partir de **6**.

Para a formação da outra série, envolvendo **PVL3-PVL7**, as reações seriam bastante semelhantes até a etapa de formação do cromeno **10**. Este seria metilado no ácido carboxílico para formar **PVL3** que, por sua vez, seria metilado na hidroxila fenólica, para originar **PVL4**. Aparentemente, o produto **10** seria o único que sofreria uma reação de oxidação na metila, gerando o álcool benzílico como em **PVL5**. Este seria o precursor direto que, por metilação originaria **PVL6** e, por acetilação, o cromeno **PVL7**. A suspeita do acetato ser artefato foi afastada através da análise por CLAE de um extrato preparado sem o uso de acetato de etila.

As etapas de formação do sistema cromênico a partir do ácido orselínico poderiam envolver de forma alternativa a alquilação pelo pirofosfato de isopentenila, cuja ligação dupla sofreria ataque nucleofílico pelo oxigênio de hidroxila fenólica, gerando também o anel de seis membros. A etapa final envolveria uma reação de desidrogenação semelhante ao que ocorre com ácidos graxos. Esta proposta é baseada na análise dos produtos isolados até o presente de espécies de *Peperomia*, entre os quais os difenóis prenilados isolados de *P. obtusifolia* (Tanaka et al. , 1997) que co-ocorrem com seus correspondentes produtos ciclizados. Observa-se no caso de *P. clusiifolia*, um benzopirano, entre outros compostos (Seeram et al. , 1998), onde os mesmos diferenciam-se de um cromeno pela ausência da ligação dupla.

O aspecto mais curioso é a formação dual de cromenos prenilados em Piperaceae, no qual nas espécies *Piper aduncum* (Baldoqui et al. , 1999), *P. gaudichaudianum* e *P. crassinervium* (artigos submetidos a publicação) têm sido freqüentemente isolados. No entanto, como em todos estes casos não se constatou a presença de metila ligada ao anel aromático, a origem destes compostos poderia ser através da via do ácido chiquímico, ou então pela via do acetato, mas seguida da eliminação da metila por oxidação.

Como apresentada na parte introdutória da dissertação, cromenos são comuns em espécies de Asteraceae e Piperaceae. No entanto, os estudos biossintéticos realizados com espécies em Asteraceae, mostraram que o anel fenólico é formado através da via policetídica e o anel pirânico via mevalonato (Vyas and Mulchandani, 1980).

Embora não se tenha realizado estudos biossintéticos em Piperaceae com respeito a cromenos, as substâncias **PVL1-PVL7** isoladas e caracterizadas da *Peperomia villipetiola* na tese, sugere que os mesmos devam ser provenientes da via policetídica, como os cromenos de Asteraceae. No entanto, o precursor policetometilênico de mesmo número de carbonos reage de maneira diferente, sugerindo a presença de diferentes complexos enzimáticos nas famílias.

Constata-se que através da via policetídica rotas predominantes fornecem os cromenos isolados da família Asteraceae, enquanto que no caso de espécies de Piperaceae, seus cromenos poderiam ser originados tanto da via policetídica, no caso de cromenos de espécies de *Peperomia*, quanto do ácido chiquímico no caso de cromenos do gênero *Piper* (Esquema 18). De qualquer forma, através de caminhos biossintéticos seriam produzidos produtos eventualmente com a mesma função biológica.

Sob o ponto de vista evolutivo, o gênero *Peperomia* parecer ser ancestral a *Piper* (Taylor and Hickey, 1996), mas não há evidências suficientes para definir o paralelismo entre a ancestralidade da via policetídica, o que é um fato comprovado através de diversos estudos, e sua expressão num gênero mais primitivo de Piperaceae.

Esquema 18. Rotas biossintéticas alternativas para a formação de cromenos em Piperaceae e Asteraceae.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5-CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. Este trabalho se constitui no primeiro estudo químico de *Peperomia villipetiola*, uma espécie endêmica do Perú e o Equador. O estudo do extrato de media polaridade das folhas e do caule resultou no isolamento de oito substâncias, sete cromenos (**PVL1-PVL7**), todos inéditos e um fenilpropanóide que foi identificado como miristicina.

5.2. O conjunto dos cromenos isolados e caracterizados possibilitou um perfilamento biossintético considerando que todos os cromenos possuem uma origem biossintética em comum, resultante da via policetídica (Esquema 17, página 73). Observam-se linhas biossintéticas baseadas na formação de cromenos do tipo **PVL1** e **PVL2** e, com certo predomínio, a formação dos cinco cromenos **PVL3-PVL7**. A formação de cromenos é predominante, considerando que não se isolou outros metabólitos pertencentes a outras classes, exceção feita a miristicina. Entretanto, a especificidade do sistema enzimático não é tão rigorosa a ponto de limitar a formação de somente um tipo de cromeno. Outra reação observada que conduz à formação de outros derivados ligeiramente modificados é a reação envolvendo o-metiltransferase que resultou na formação dos éteres metílicos aromáticos ou ésteres metílicos do ácido benzóico. A formação do anel heterocíclico cromênico envolve a substituição eletrofílica aromática sobre unidades isoprênicas, que pode envolver tanto a via do mevalonato quanto a via do fosfato de desoxilulose (Totté et al. 2000; Schwender et al. 1996).

5.3. Os cromenos apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. shaerospermum* em nível comparável aos controles positivos, especialmente a **PVL7**. Essa atividade tem sido uma característica constante em outros cromenos anteriormente isolados de espécies de *Piper* (Baldoqui et al. 1999). No entanto, uma investigação mais profunda no sentido de elucidar relações estrutura-atividade se faz necessário através da obtenção de um maior número de derivados e de análogos sintéticos.

5.4. As substâncias isoladas constituem-se num importante suporte para estudos quimiotaxonômicos e para estudos de biologia molecular do metabolismo

secundário. A presença predominante de cromenos de origem policetídica é claramente uma característica de espécies de *Peperomia*, sendo que sua origem biossintética, como sendo via policetídica, pôde ser sugerida pela presença de uma metila aromática. A principal questão que emerge deste trabalho envolve a função biológica dos cromenos, oriundos da via do ácido chiquímico e da via policetídica, em espécies de *Piper* e *Peperomias*. Quais seriam os fatores que levaram à produção convergente nessas espécies?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, N. R., Santos, S. C., De Miranda, E. G., and Ferri, P. H. (1997). A 2-acilciclohexanona-1,3-diona from *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, **46**, 1375.
- Anthonsen, T. and Chantarasukul, S. (1970). Ageratone and dihydroageratone, new benzofurane derivatives from *Ageratum houstonianum* Mill.. *Act Chem. Scand.* **24**, 721.
- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Cavaleiro, A. J., Young, M. C. M. and Furlan M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **51**, 899.
- Bayma, J. de C., Arruda, M. S. P., Müller, A. H., Arruda, A. C., Canto, W. C. C. (2000). A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. *Phytochemistry*, **55**, 779.
- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P. and Kato, M.J. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. *Phytochemistry*. **52**, 339.
- Bohlmann, F. and Suwita, A. (1978). Neue phloroglucin-derivate aus Leantonyx-arten sowie weitere verbindungen aus vertretern der tribus *lauleae*. *Phytochemistry*, **17**, 1929.
- Bohlmann, F. and Jakupovic, J. (1979). Neue sesquiterpene, triterpene, flavanone und andere aromatische verbindungen aus *Flourensia heterolepis*. *Phytochemistry*, **18**, 1189.
- Bohlmann, F. and Zdero, C. (1980). Diterpenes and tetranorditerpenes from *Acritopappus* species. *Phytochemistry*, **19**, 2695.
- Bowers, W. S., Ohta, T., Cleere, J. S., and Marsella, P. A. (1976 a). *Science*, **193**, 542.
- Bowers, W. S., (1976 b). The juvenile hormones. Ed. Gilbert
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C. and Williams, D. H. (1964). Structure elucidation of natural products by Mass spectrometry, Ed. Holden-Day, San Francisco. Vol. 2, pp 148.
- Campos, S. L. (1987). Guia dos compostos orgânicos e bioquímicos, Ed. Europress. pp. 92.
- Commission on nomenclature of organic chemistry (1993). A guide to IUPAC, nomenclature of organic compounds, Ed. Internacional union of Pure and Applied Chemistry Organic Chemistry Division. pp. 166.
-

- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering in plants, New York. Ed. Columbia University.
- da Silva, R. V., Navickiene, H.M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Meda, C. I., Young, M. C. M. and Furlan, M. (2001). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **58**, 521.
- de Diaz, A.M. P., Diaz, P. P. and Cardoso, H. (1988). Volatile constituents of *Peperomia subespatulata*. *Planta Medica*, **92**.
- Dewick, P. M. (1998). Medicinal Natural Products, A biosynthetic Approach. Ed. John Wiley & Sons., England.
- Dias dos S. P. R., Moreira, D. de L., Guimarães, E. F. and Kaplan, C. M. A. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*, **58**, 547.
- Diaz, P. P., Arias, T. and Joseph-Nathan, P. (1987). A chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and a C-methyl flavanone from the bark of *Piper hostmannianum*. *Phytochemistry*, **26**, 809.
- Garcia, E., Mendoza, V. and Gutiérrez, R. (1990). Constituents of *Peperomia campylotropa*. *Fitoterapia*, **61**, 90.
- Govindachari, T. R., Kumari, K. G. N. and Partho, P. D. (1998). Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. *Phytochemistry*, **49**, 2129.
- Hammond, G. B., Fernandez, I. D., Villegas, L. F. and Vaisberg, A. J. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Departament of Ancash , Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, **61**, 17.
- Hänsel, R., Cybulski, E. –M., Cubukcu, B., Mericli, A. H., Bohlmann, F. and Zdero, C. (1980). Neue pyron-derivate aus helichrysum-arten. *Phytochemistry*, **19**, 639.
- Homans, A. L. and Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal Chromatography*, **51**, 327.
- Hostettmann, K. and Marston, A. (1990). Studies in Natural Products Chemistry, Vol **7**, ed. Attaur-Rhaman, Elsevier, Amsterdam, pp 405.
- Joseph, H., Bessiere, J.M., Pellecuer, J. (1987). Volatile components of *Peperomia rotundifolia* (L.) Kth. *Flavour and Fragrance Journal*, **2**, 133.
-

- Kato, M.J., Lopes, L.M.X., Paulino Filho, H.F., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1985) Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*. *Phytochemistry*, **24**, 533.
- Lentz, D. L., Clark. A. M., Hufford, C., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C. M., Cordero, J., Ibrahimi, O. and Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **63**, 253.
- Lin, T. J., Ramstad, E. and Heinsteins, P. (1974). *In vivo* biosynthesis of isopentenylacetophenones in *Eupatorium rugosum*. *Phytochemistry*, **13**, 1809.
- Malquichagua S. K. (2003). Estudio químico de las hojas de *Peperomia villipetiola*. UNI-FC, Lima, Perú.
- Matos, F. J. A. (1984). Introdução à fitoquímica experimental, ed. UFC. Brazil.
- Mbah, J. A., Tchuendem, M. H. K, Tane, P. and Sterner, O. (2000). Two chromones from *Peperomia vulcanica*. *Phytochemistry*, **60**, 799.
- Mcbrige, F. J. (1936). Flora of Perú, Field Museum of Natural History-Botany, Vol. XIII. Ed. Field Museum Press, Chicago, USA. pp 105.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, A. and Cavé, A., (1995). Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galiodes*. *Journal Natural products*, **58**, 324.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, A., Cavé, A. (1996). New prenylated quinines from *Peperomia galiodes*. *Journal Natural Products*, **59**, 624.
- Mann, J. (1978). Secondary metabolism. Ed. Oxford University Press, Great Britain.
- Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J. B. Banthorpe, D. V. and Harbone, J.B. (1996). Natural Products, their chemistry and biological significance. Ed. Longman, Edinburgh Gate.
- Monache, D. F. and Compagnone, R. S. (1996). A secolignan from *Peperomia glabella*. *Phytochemistry*, **43**, 1097.
- Moreira, D. De L., Guimarães, E. F. and Kaplan, M. A. (1998). A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **48**, 1075.
- Mudd, A. (1981). Novel 2-acylcyclohexane-1,3-dione in the mandibular of Lepidopteran larvae, kairomones of *Ephestia kuehniella* Zeller. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans.* 2357.
-

- Narui, T., Takatsuki, S., Sawada, K., Okuyama, T., Culberson, C. F., Culberson, W. L. and Shibata, S. (1996). Lasallic acid, a tridepside from the lichen, *Lasallia asia-orientalis*. *Phytochemistry*, **42**, 839.
- Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Young, M. S. M., Bolzani, V. da S., Cavalheiro, A. J. and Furlan M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **55**, 621.
- Okunade, A. D., Hufford, C. D., Clark, A. M. and Lentz, D. (1997). Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*. *Phytotherapy Research*, **11**, 142.
- Olga, L. de U., (1988). Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. Ed. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J. Wright, A. D., Rali, and Sticher O. (1993a). Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **34**, 813.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J. Wright, A. D., Rali, T. and Sticher O. (1993b). Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medica*, **59**, 546.
- 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., and Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, **46**, 597.
- Proksch, P. and Rodriguez, E. (1982). High-performance liquid chromatography of chromenes and benzofurans from the genus *Encelia* (Asteraceae). *Journal Chromatography*, **240**, 543.
- Proksch, P. and Rodriguez, E. (1983 a). Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochemistry*, **22**, 2335.
- Proksch, P., Aregullin, M. and Rodriguez, E. (1983 b). A new benzopyranbenzofuran dimer from *Encelia ventorum*. *Planta Medica*, **47**, 224.
- Rezende, R. K. (1998). Estruturas e atividades biológicas de neolignanas ariltetralônicas e derivados de *Virola sebifera* (Aubl.). Dissertação de Mestrado, Instituto de Química-USP.
-

- Rios, J. L., Recio, M. C. and Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, **23**, 127.
- Roussis, V., Ampofo, S. A. and Wiemer, D. F. (1990), A prenylated benzoic acid derivate from leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry*, **29**, 1787.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K. and Rohmers, M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehydes 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green algae *Scenedesmus*. *Biochemistry Journal*, **316**, 73.
- Seeram, N. P., Jacobs, H., Nair, M. G., Mc Lean, S. and Reynolds, W. F. (1998) A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. *Phytochemistry*, **49**, 1389.
- Seeram, N. P., Lewis, A. W., Jacobs, H., Nair, M. G.; Mc Lean, S. and Reynolds, W. F. (2000) Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. *Journal Natural Products*, **63**, 399.
- Singh, Y. N. (1992). Kava-an overview. *Journal of Ethnopharmacology*, **37**, 13.
- Steyemark, A. S. (1984). Flora de Venezuela. Ed. Educación Ambiental, **2**, 2.
- Tanaka, T.; Asai, F. and Linuma, M. (1997). Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. *Phytochemistry*, **49**, 229.
- Taylor, D. W. and Wright, J. LA. (1971). Chromenes from *Eupatorium ripatium*. *Phytochemistry*, **10**, 1665.
- Taylor, D. W. and Hickey, J. L. (1984). Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. *Plant System Evolution*, **180**, 137.
- Taylor, D. W. and Wright, J. L. (1996). Flowering Plant Origin, Evolution and Phylogeny. Ed. Champan Hall.
- Terreaux, C., Gupta, M. P. and Hostettman, K. (1998). Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*, **49**, 1339.
- Totté, N., Charon, M., Compernelle, F., Babeuf, I., and Geuns, J. M. C. (2000). Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an *ent* - Kaurene derivate from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Phytochemistry*, **41**, 6407.
- Villegas, L. F., Fernandez, I. D., Maldonado, H., Torres, R., Zavaleta, A., Vaisberg, A. J. and Hammond, G. B. (1997). Evaluation of the wound-healing activity of
-

selected traditional medicinal plantas from Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**, 193.

Vyas, A.V. and Mulchandani, N. B. (1980). Biosynthesis of precocenes-I and -II, antijuvenile hormones. *Phytochemistry*, **19**, 2579.

www.peperomia.net

www.sacha.org

www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos, de Queiroz, O. R. da Silva, M., Young M.

C. M. , Pousada, B. H. e Martins, D. Substâncias fungitóxicas de *Morithamnus crassus*.

APÊNDICE

Figura 9. Espectro de massas da miristicina por I. E. (70 ev)

Figura 10. Espectro de massas de **PVL1** por I. E. (70 ev)

Figura 11. Espectro no IV da substância PVL1

Figura 12. Espectro no UV da substancia **PVL1**

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H de PVL1 (CDCl_3 , 300 MHz)

Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL1 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de **PVL1** (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 16. Espectro de HETCOR de **PVL1** (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 18. Espectro de HMBC de PVL1 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 19. Espectro ampliado de 1 até 4 δ do espectro de HMBC de **PVL1** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 20. Espectro ampliado de 5 até 7 δ do espectro de HMBC de **PVL1** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 22. Espectro de massas de PVL2 por I. E. (70 ev)

Figura 23. Espectro no IV da substância PVL2

Figura 24. Espectro no UV da substância PVL2

Figura 25. Espectro de RMN de ¹H de PVL2 (CDCl₃, 300 MHz)

Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C de **PVL2** (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL2 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 28. Espectro de HETCOR de PVL2 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 29. Espectro de HMBC de PVL2 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 30. Espectro ampliado de 5 a 7 δ do espectro de HMBC de PVL2 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 31. Espectro de massas de **PVL3** por I. E. (70 ev)

Figura 32. Espectro no IV da substancia PVL3

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Figura 33. Espectro no UV da substância PVL3

Figura 35. Espectro de RMN de ¹³C de PVL3 (CDCl₃, 75 MHz)

Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° de **PVL3** (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 37. Espectro de HETCOR de PVL3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 38. Espectro de HMBC de PVL3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 41. Espectro de massas de **PVL4** por I. E. (70 ev)

Figura 42. Espectro no IV da substância PVL4

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Figura 43. Espectro no UV da substância **PVL4**

Figura 44. Espectro de RMN de ¹H de PVL4 (CDCl₃, 300 MHz)

Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL4 (CDCl₃, 75 MHz)

Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL4 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 47. Espectro de HETCOR de PVL4 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 48. Espectro de HMBC de PVL4 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 49. Espectro ampliado de 0,5 até 4 δ do espectro de HMBC de PVL4 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 50. Espectro ampliado de 5 até 7 δ do espectro de HMBC de **PVL4** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 51. Espectro de massas de **PVL5** por I. E. (70 ev)

Figura 52. Espectro no IV da substância PVL5

Figura 53. Espectro no UV da substância **PVL5**

Figura 54. Espectro de RMN de ¹H de PVL5 (CDCl₃, 300 MHz)

Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C de PVL5 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL5 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 57. Espectro de HETCOR de PVL5 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 58. Espectro de HMBC de PVL5 (CDCl₃, 500 e 125 MHz)

Figura 59. Espectro ampliado de 4 até 7,5 δ do espectro de HMBC de **PVL5** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 62. Espectro de massas de **PVL6** por I. E. (70 ev)

Figura 63. Espectro no IV da substância PVL6

Figura 64. Espectro no UV da substância **PVL6**

Figura 65. Espectro de RMN de ^1H de PVL6 (CDCl_3 , 300 MHz)

Figura 66. Espectro de RMN de ¹³C de **PVL6** (CDCl₃, 75 MHz)

Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C -Dept 135° de PVL6 (CDCl_3 , 75 MHz)

Figura 68. Espectro de HETCOR de PVL6 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 69. Espectro de HMBC de **PVL6**(CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 70. Espectro ampliado de 3,5 até 6,5 δ do espectro de HMBC de PVL6 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 72. Espectro de massas de PVL7 por I. E. (70 ev)

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Figura 73. Espectro no IV da substância PVL7

Figura 74. Espectro no UV da substância PVL7

Figura 75. Espectro de RMN de ^1H de PVL7 (CDCl_3 , 300 MHz)

Figura 76. Espectro de RMN de ¹³C de PVL7 (CDCl₃, 75 MHz)

Figura 77. Espectro de RMN de ¹³C-Dept 135° de PVL7 (CDCl₃, 75 MHz)

Figura 78. Espectro de HETCOR de **PVL7** (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)

Figura 79. Espectro de HMBC de PVL7 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 80. Espectro ampliado de 0,5 até 2,5 δ do espectro de HMBC de PVL7 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

Figura 81. Espectro ampliado de 5 a 7 δ do espectro de HMBC de PVL7 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)