UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

GIOVANA CÁSSIA DE FREITAS LEMESZENSKI

**Protoflavonoides e meroterpenos de
espécies de *Piper***

Versão corrigida da tese defendida conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG

04/06/2013

GIOVANA CÁSSIA DE FREITAS LEMESZENSKI

**Protoflavonoides e meroterpenos de
espécies de *Piper***

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

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

L552p Lemeszenski, Giovana Cássia de Freitas
Protoflavonoides e meroterpenos de espécies de *Piper* /
Giovana Cássia de Freitas Lemeszenski. -- São Paulo, 2013.
203p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Produtos naturais 2. Quimiometria I. T. II. Kato, Massuo
Jorge, orientador.

547.7 CDD

Giovana Cássia de Freitas Lemeszenski

Protoflavonoides e meroterpenos de espécies de *Piper*

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

Aprovado em 05 de abril de 2013.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Instituição: Instituto de Química – USP

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Angelo Cunha Pinto

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Reinaldo Carmino Bazito

Instituição: Instituto de Química – USP

A Deus.

Aos meus pais Cleide e Luis Carlos.

Aos meus irmãos André e Mônica.

Ao meu esposo Daniel.

Com amor e gratidão por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química pela oportunidade em realizar este trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela orientação, compreensão, ensinamentos e pelos conselhos no decorrer destes seis anos de trabalho.

À FAPESP e ao CNPq pelas bolsas concedidas e pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da SPG do IQ-USP pela atenção e apoio.

Ao Gilberto Franchi e à Profa. Maria Claudia Max Young pelos ensaios realizados.

Ao Dr. João Marcos Batista Junior (Instituto de Química – UNESP) pela colaboração nos cálculos de DFT.

Ao Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti (UFPB) e Msc. Harold Hilarion Fokoue (LQPN-IQUSP) pela colaboração nos cálculos de quimiometria.

À Profa. Dra. Elsie F. Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro) pela identificação das espécies vegetais.

Ao Dr. Frederico Drumont Martins, Chefe da Floresta Nacional de Carajás (ICMBio – MMA) e a Cia Vale pela colaboração nas coletas das plantas.

Aos amigos e colegas do LQPN: Adalberto, Alberto, Aline, Anderson, Augusto, Camila, Celso, Cristina, Edgard, Erica, Fábio Chaves, Fábio Rodrigues, Graça, Harold, Homero, Juliana, Joca, Joaquim Matheus, Karina, Lucas, Lydia, Marcilio, Mariana, Mauro, Nidia, Renata, Vitor Bueno, Vitor Ferraz e Yasmin.

Aos amigos e colegas do IQ: Viviane, Tati, Claudinei, Denise, Georgia, Lya, Luciana, Emerson e Fernanda, pela amizade.

Aos colegas da Central Analítica, pelas análises realizadas, pelo apoio e amizade: Alessandra, Alfredo, Cristiane, Denize, Emerson, Fernando, Janaína, Luzia, Márcio Nardelli, Márcio Santos, Margarida, Michele, Miriam, Nanci e Rebeca.

À minha família, principalmente por compreender minha ausência e me apoiar no decorrer deste trajeto.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Cada planta tem centenas de substâncias
e uma delas pode ser mais importante do que uma galáxia.”

(Otto R. Gottlieb)

RESUMO

Freitas Lemeszenski, G.C. **Protoflavonoides e meroterpenos de espécies de *Piper***. 2013. 203p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As espécies da família Piperaceae, *Piper bowiei*, *P. caldense*, *P. carniconnectivum* e *P. permucronatum* apresentam uma característica morfológica em comum que são os frutos pendentes e globosos. Seus extratos brutos foram submetidos às análises de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear e os espectros obtidos submetidos às análises quimiométricas por PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise por agrupamento hierárquico) a fim de obter uma diferenciação entre as espécies ou observar suas possíveis similaridades. Os resultados obtidos em uma análise preliminar estimularam-nos a realizar o estudo fitoquímico em busca de seus constituintes majoritários. Foram isoladas e identificadas treze substâncias, sendo quatro meroterpenos e nove flavonoides, dos quais seis são descritos pela primeira vez. Ensaios de atividade antifúngica e antitumoral foram realizados levando em consideração relatos da literatura de substâncias com estruturas similares.

Palavras Chave: Piperaceae, *Piper*, protoflavonoides, meroterpenos, metabolôma.

ABSTRACT

Freitas Lemeszenski, G.C. **Protoflavonoids and meroterpenes from *Piper* species**. 2013 203p. PhD Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Piperaceae species *Piper bowiei*, *P. caldense*, *P. carniconnectivum* and *P. permucronatum* have pendant fruits as a common morphological characteristic. Thus, their extracts were analyzed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance and submitted to chemometric analysis by PCA (principal component analysis) and HCA (hierarchical cluster analysis) in order to get a differentiation between species and to observe their possible similarities. Based on the results obtained in a preliminary analysis the phytochemical studies were carried out on their crude extracts in order to identify their major constituents. The study allowed the identification of thirteen compounds, being four meroterpenes and nine flavonoids, six of which were described for the first time. Biological activity assays were performed taking into account the potential activities reported for similar compounds.

Keywords: Piperaceae, *Piper*, protoflavonoids, meroterpenes, metabolome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de <i>Piper</i> (Jaramillo; Manos, 2001)...	22
Figura 2. Estrutura da aristolactama caldensina.....	24
Figura 3. Imagens da planta <i>P. caldense</i>	24
Figura 4. Imagem da planta <i>P. carniconnectivum</i>	26
Figura 5. Metabólitos isolados das raízes de <i>Piper carniconnectivum</i>	26
Figura 6. Estrutura da protoapigenona (55).....	35
Figura 7. Efeito dos substituintes na atividade antitumoral das protoflavonas (Lin; Nakagawa-Goto; et al., 2007).....	35
Figura 8. Processamento da matriz por PCA resultando nos gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i>	42
Figura 9. Processamento da matriz por HCA resultando no dendrograma.	43
Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE-UV-Vis (254 nm) do extrato bruto das folhas de <i>P. caldense</i> (K842-FA).....	50
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das folhas de <i>P. caldense</i> (K-842 FA, CDCl_3 , 500 MHz).	51
Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV-Vis (254 nm) do extrato bruto das folhas de <i>P. bowiei</i> (K-364FA).....	52
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das folhas de <i>P. bowiei</i> (K-364 FA, CDCl_3 , 200 MHz).	52
Figura 14. Cromatograma obtido por CLAE de K-1022 FA.	54
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do extrato K-1022 FA (500 MHz, CDCl_3).	54
Figura 16. Cromatograma CLAE de K-1441 FA.	55
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H de K-1441 FA (500 MHz, CDCl_3).	56
Figura 18. Cromatograma CLAE de K-1441 FrA.	57
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H de K-1441 FrA (500 MHz, CDCl_3).	57
Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE de K-1600 FC.	58
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do extrato K-1600 FC (500 MHz, CDCl_3).	59
Figura 22. Reação de metilação das substâncias 12 e 13	60
Figura 23. Reação de acetilação da substância 12	61
Figura 24. Reação de hidrogenação catalítica das substâncias 8 e 12	62
Figura 25. Diagrama ilustrativo da bioautografia dos extratos brutos.	63
Figura 26. Diagrama ilustrativo da bioautografia das substâncias puras.	64
Figura 27. Gráfico de <i>scores</i> de (PC1 v PC2) com base nos dados de ESIMS dos extratos de espécies de <i>Piper</i> (61% de variância).	72

Figura 28. Gráfico de <i>loadings</i> com base nos dados de ESIMS dos extratos de espécies de <i>Piper</i> (61% de variância).	73
Figura 29. Estruturas das substâncias 1 e 2 .	77
Figura 30. Espectro de massas (IE) das substâncias a) 1 e b) 2 .	77
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de 1 (200 MHz, CDCl_3).	78
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C de 1 (50 MHz, CDCl_3).	79
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de 2 (500 MHz, Acetona- d_6).	80
Figura 34. Estruturas das substâncias 3 , 4 e 5 .	82
Figura 35. Estrutura da substância 3 .	82
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da substância 3 .	83
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H de 3 (Acetona- d_6 , 500 MHz).	83
Figura 38. Estrutura da substância 4 .	84
Figura 39. Espectro de massas de alta resolução de 4 (ESI-TOF).	85
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H de 4 (500 MHz, CDCl_3).	85
Figura 41. Correlações HMBC selecionadas de 4 .	86
Figura 42. Estrutura da substância 5 .	87
Figura 43. Espectro de massas de alta resolução da substância 5 (ESI-TOF).	87
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de 5 (500 MHz, Acetona- d_6).	88
Figura 45. Estruturas das substâncias 6 e 7 .	90
Figura 46. Espectro de massas (IE) das substâncias a) 6 e b) 7 .	90
Figura 47. Estrutura da substância 6 .	91
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de 6 (CDCl_3 , 300 MHz).	92
Figura 49. Estrutura da substância 7 .	93
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de 7 (Acetona- d_6 , 300 MHz).	93
Figura 51. Estruturas das substâncias 8 e 9 .	95
Figura 52. Estrutura da substância 8 .	95
Figura 53. Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-TOF) da substância 8 .	96
Figura 54. Espectro de absorção na região do infravermelho de 8 (KBr).	96
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H de 8 (500 MHz, CDCl_3).	97
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H de 8 (500 MHz, CDCl_3) (ampliação de 7,2 a 3,5 ppm).	98
Figura 57. Espectro de RMN de ^1H de 8 (500 MHz, CDCl_3) (ampliação 3,17 a 2,60 e de 2,60 a 2,00 ppm).	98
Figura 58. Principais correlações HMBC observadas nos anéis B e C de 8 .	99
Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C de 8 (125 MHz, CDCl_3).	100

Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C de 8 (125 MHz, CDCl_3) (ampliação de 210 a 120 ppm e de 105 a 30 ppm).	100
Figura 61. Correlações NOE (----) e HMBC (—) observadas no anel A de 8	101
Figura 62. Mapa de contorno HMBC de 8 (ampliação nas regiões de δ 13,5 a 3,0 ppm em F2 e de δ 80,0 a 220,0 ppm em F1).	101
Figura 63. Mapa de contorno do experimento 2D NOESY de 8 (ampliação na região de 7,5 a 3,5 ppm em F1 e F2).	102
Figura 64. Estrutura da substância 8	102
Figura 65. Estrutura da substância 9	103
Figura 66. Espectro de massas de alta resolução de 9 (ESI-TOF).	104
Figura 67. Espectro de absorção na região do Infravermelho de 9 (KBr).	104
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H de 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	105
Figura 69. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 9 de 6,5 a 1,5 ppm ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	106
Figura 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 9 de 3,2 a 1,5 ppm ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	106
Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C de 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).	107
Figura 72. Principais correlações NOE (----) e HMBC (—) observadas para 9	108
Figura 73. Mapa de contorno HSQC de 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	108
Figura 74. Mapa de contorno HMBC de 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	109
Figura 75. Mapa de contorno COSY de 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	109
Figura 76. Estrutura da substância 9	110
Figura 77. Estrutura da substância 8 com estereoquímica definida.	111
Figura 78. a) Espectro DC calculado para (2 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- 8 ; b) Espectro DC experimental obtido para 8 ; c) Espectro DC calculado para (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>)- 8	112
Figura 79. Estrutura da substância 9 com estereoquímica definida.	113
Figura 80. a) Espectro DC calculado para (2 <i>S</i> ,1' <i>S</i> ,2' <i>S</i>)- 9 ; b) Espectro DC experimental obtido para 9 ; c) Espectro DC calculado para (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i> ,2' <i>R</i>)- 9	113
Figura 81. Estrutura da substância 8a	114
Figura 82. Espectro de massas de alta resolução de 8a (ESI-TOF).	114
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 8a	115
Figura 84. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 8a (500 MHz, CDCl_3) na região de 3,1 a 1,7 ppm.	116
Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 8a	116
Figura 86. Estruturas das substâncias 10 e 11	118
Figura 87. Estrutura da substância 10	118
Figura 88. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de 10	119

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H de 10 (CDCl_3 , 500 MHz).....	120
Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C de 10 (CDCl_3 , 125 MHz).....	121
Figura 91. Estrutura da substância 11	121
Figura 92. Espectro de massas de alta resolução de 11 (ESI-TOF).	122
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H de 11 (MeOD, 500 MHz).	123
Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C de 11 (MeOD, 125 MHz)	123
Figura 95. Estruturas das substâncias 12 e 13	125
Figura 96. Estrutura da substância 12	125
Figura 97. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de 12	126
Figura 98. Espectro de absorção na região do infravermelho de 12	126
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H de 12 (500 MHz, MeOD).	128
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H de 12 (500 MHz, MeOD), ampliação de 5,38 a 5,05 ppm e de 1,76 a 1,53 ppm.....	128
Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C de 12 (125 MHz, MeOD).	129
Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C de 12 (125 MHz, MeOD), ampliação de 42 a 15 ppm e de 175 a 113 ppm.....	130
Figura 103. Mapa de contorno de HSQC de 12 (125 MHz, MeOD), ampliação 8,0 a 1,2 ppm em F1 e de 160,0 a 0,0 ppm em F2.	130
Figura 104. Correlações HMBC selecionadas para a substância 12	131
Figura 105. Ampliação do mapa de contorno HMBC de 12 (de δ 4,85 a 7,70 ppm em F1 e de δ 10,0 a 190,0 ppm em F2)	132
Figura 106. Ampliação do mapa de contorno HMBC de 12 (de δ 3,50 a 1,40 ppm em F1 e de δ 10,0 a 180,0 ppm em F2).	132
Figura 107. Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY de 12 (500 MHz, MeOD).....	133
Figura 108. Correlações NOE observadas para 12	134
Figura 109. Mapa de contorno ^1H - ^1H NOESY de 12 (500 MHz, MeOD).	134
Figura 110. Estrutura da substância 13	135
Figura 111. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de 13	135
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H de 13 (500 MHz, CDCl_3).....	136
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C de 13 (125 MHz, CDCl_3).....	137
Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C de 13 (125 MHz, CDCl_3) (Ampliação).....	137
Figura 115. Correlações NOE observadas para 13	138
Figura 116. Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY de 13 (500 MHz, MeOD).....	139
Figura 117. Mapa de contorno ^1H - ^1H NOESY de 13 (500 MHz, MeOD).	139
Figura 118. Estruturas das substâncias 12a , 12b , 12c e 13a	141
Figura 119. Espectro de massas de alta resolução (ESI $^+$) de a) 12a ; b) 12b ; c) 12c	142

Figura 120. Estrutura do derivado 12a .	142
Figura 121. Espectro de RMN de ^1H de 12a (500 MHz, CDCl_3).	143
Figura 122. Espectro de RMN de ^1H de 12a (500 MHz, CDCl_3) ampliação de 4,2 a 1,4 ppm.	143
Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C de 12a (125 MHz, CDCl_3) ampliação de 171 a 108 ppm e de 62 a 9 ppm.	144
Figura 124. Estrutura do derivado 12b .	146
Figura 125. Espectro de RMN de ^1H de 12b (MeOD, 300 MHz).	146
Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C de 12b (MeOD, 75 MHz).	147
Figura 127. Estrutura do derivado 12c .	149
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H de 12c (MeOD, 400 MHz)	149
Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C de 12c (125 MHz, MeOD).	150
Figura 130. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135^\circ$ de 12c (125 MHz, MeOD).	151
Figura 131. Estrutura do derivado 13a .	152
Figura 132. Espectro de RMN de ^1H de 13a (CDCl_3 , 500 MHz)	152
Figura 133. Espectro de RMN de ^{13}C de 13a (CDCl_3 , 125 MHz).	153
Figura 134. Placas de CCDA reveladas com UV ($\lambda=254$ nm), esporos de <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> .	157
Figura 135. Estrutura da substância protoapigenona.	158
Figura 136. Substâncias submetidas ao ensaio de atividade antitumoral (5 , 6 e 8) e controles positivos (Gleevec e vincristina)	159
Figura 137. Substâncias submetidas ao ensaio de atividade antitumoral (8 , 8a e 9)	160
Figura 138. Gráfico de <i>scores</i> (PC1 v PC2) (61% de variância) com base nos dados de ESIMS, por injeção direta, dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	164
Figura 139. Gráfico de <i>loadings</i> (61% de variância) com base nos dados de ESIMS, por injeção direta, dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	164
Figura 140. Cromatogramas CLAE-UV de alguns extratos.	166
Figura 141. Gráfico de <i>scores</i> (PC1 v PC2) (82% de variância) com base nos dados de CLAE-EM, dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	167
Figura 142. Gráfico de <i>loadings</i> (82% de variância) com base nos dados de CLAE-EM dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	168
Figura 143. Gráfico de HCA para análise de CLAE-EM.	169
Figura 144. Gráfico de <i>scores</i> (PC1 v PC2) (66% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	171
Figura 145. Gráfico de <i>loadings</i> (82% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	171
Figura 146. Gráfico de <i>scores</i> (PC1 v PC2) (71% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de <i>Piper</i> .	172

Figura 147. Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 v PC2) (71% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de <i>Piper</i>	173
Figura 148. Gráfico de HCA para análise de RMN de ^1H da fase orgânica.....	174
Figura 149. Gráfico de <i>scores</i> (PC1 v PC2) (55% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (D_2O) dos extratos de espécies de <i>Piper</i>	175
Figura 150. Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 v PC2) (55% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (D_2O) dos extratos de espécies de <i>Piper</i>	175
Figura 151. Gráfico de HCA para análise de RMN de ^1H da fase hidroalcoólica. ..	176
Figura 152. Biossíntese de meroterpenos e flavonóides em espécies de <i>Piper</i>	179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de <i>Piper</i> (continua).	29
Tabela 2. Protoflavonoides de ocorrência natural (continua).	36
Tabela 3. Gradiente de eluição realizado na CLAE.	47
Tabela 4. Local de coleta das espécies estudadas.	49
Tabela 5. Extratos preparados para estudo fitoquímico.	50
Tabela 6. Linhagens de células leucêmicas testadas.	64
Tabela 7. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por ESI-EM – infusão direta.	66
Tabela 8. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por CLAE-EM e RMN de ^1H	67
Tabela 9. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por ESI-EM- Infusão direta.	71
Tabela 10. Substâncias isoladas e identificadas de <i>P. caldense</i> , <i>P. bowiei</i> , <i>P. permucronatum</i> e <i>P. carniconnectivum</i> (continua).	74
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1 e RMN de ^1H de 2	81
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 3 , 4 e 5 (500 e 125 MHz).	89
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 6 e 7 (300 e 75 MHz).	94
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 8 (500 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	103
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 9 (500 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	110
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 8a (500 e 125 MHz, CDCl ₃).	117
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 10 e 11 (500 e 125 MHz).	124
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 12 e 13 (500 e 125 MHz).	139
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) obtidos para a substância 12a	145
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 300 e 75 MHz) obtidos para a substância 12b	148

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 500 e 125 MHz) de 12c	151
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) obtidos para a substância 13a	154
Tabela 23. Atividade antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	156
Tabela 24. Citotoxicidade de 5 , 6 e 8 para as linhagens de células leucêmicas K-562 e NALM-6.	159
Tabela 25. Citotoxicidade de 8 , 8a e 9 para as doze linhagens de células leucêmicas avaliadas.	160
Tabela 26. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por PCA.....	162
Tabela 27. Espécies de <i>Piper</i> analisadas por CLAE-EM e RMN de ^1H	165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI	Ionização química à pressão atmosférica
CC	Cromatografia em coluna
CL	Cromatografia líquida
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DC	Dicroísmo circular
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometria de massas
EM-ESI	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
EM-IE	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCA	<i>Hierarchical cluster analysis</i> (Análise por agrupamento hierárquico)
IE	Ionização por elétrons
TDDFT	<i>Time-dependent density functional theory</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Relação massa carga
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
PC	<i>Principal component</i> (Componente principal)
PCA	<i>Principal components analysis</i> (Análise de componentes principais)
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
TOF	<i>Time of flight</i> (Tempo de voo)
t_R	Tempo de retenção

δ	deslocamento químico em ppm
s	simpleto
sl	simpleto largo
d	duplete
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplo duplete
dddd	duplo duplo duplo duplete
dt	duplo tripleto
dl	duplete largo
t	tripleto
td	triplo duplete
tsep	triplo septuplete
m	multiplete

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 FAMÍLIA PIPERACEAE	22
1.1.1 <i>Piper caldense</i>	23
1.1.2 <i>Piper bowiei</i>	25
1.1.3 <i>Piper permucronatum</i>	25
1.1.4 <i>Piper carniconnectivum</i>	25
1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM <i>PIPER</i>	27
1.2.1 Meroterpenos	27
1.2.2 Protoflavonoides.....	34
1.3 ANÁLISES METABOLÔMICAS DE PLANTAS	38
1.3.1 Preparo da amostra.....	38
1.3.2 Aquisição de dados	39
1.3.3 Quimiometria	41
Análise exploratória.....	41
Padrão de reconhecimento não supervisionado	42
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 ESPECIFICAÇÕES DE MATERIAIS, INSTRUMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS	45
3.1.1 Solventes utilizados em cromatografia	45
3.1.2 Cromatografia líquida	45
3.1.3 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa	46
3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência	46
3.1.5 Espectrometria de Massas	47
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear	47
3.1.7 Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis.....	47
3.1.8 Espectroscopia na região do Infravermelho.....	48
3.1.9 Polarímetro.....	48
3.1.10 Espectropolarímetro	48
3.2 MATERIAL VEGETAL	48
3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	49
3.3.1 Preparo dos extratos brutos.....	49
3.3.2 Metabólitos de <i>Piper caldense</i>	50
3.3.3 Metabólitos de <i>Piper bowiei</i>	52
3.3.4 Metabólitos de <i>Piper permucronatum</i>	53
3.3.5 Metabólitos de <i>P. carniconnectivum</i> (K-1441).....	55
3.3.6 Metabólitos de <i>P. carniconnectivum</i> (K-1600).....	58

3.4	OBTENÇÃO DE DERIVADOS	59
3.4.1	<i>Reação de metilação</i>	60
	Preparação do diazometano	60
	Metilação.....	60
3.4.2	<i>Reação de acetilação</i>	61
3.4.3	<i>Hidrogenação catalítica</i>	61
3.5	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	62
3.5.1	<i>Atividade antifúngica</i>	62
3.5.2	<i>Atividade antitumoral</i>	64
3.6	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	65
3.6.1	<i>Preparo dos extratos</i>	66
	Extratos para injeção direta.....	66
	Preparo dos extratos para CLAE-EM e RMN de ¹ H.....	67
3.6.2	<i>Obtenção de dados</i>	68
	Análise por ESI-EM (Injeção direta)	68
	Análise por CLAE-EM	68
	Análise por RMN de ¹ H	69
3.6.3	<i>Processamento dos dados</i>	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
4.1	ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS EXTRATOS.....	71
4.2	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS	74
4.3	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO CROMENOS 1 E 2	77
4.4	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FLAVONAS 3, 4 E 5	82
	Substância 3	82
	Substância 4	84
	Substância 5	86
4.5	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FLAVANONAS 6 E 7	90
	Substância 6	91
	Substância 7	92
4.6	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS 8, 9 E 8A	95
	Substância 8	95
	Substância 9	103
	Configuração absoluta de 8 e 9	111
	Substância 8a	114
4.7	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 10 E 11	118
	Substância 10	118
	Substância 11	121

4.8	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 12, 13 E DERIVADOS	125
	Substância 12	125
	Substância 13	135
	Substâncias 12a , 12b e 12c e 13a	141
4.9	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	155
	4.9.1 <i>Avaliação da atividade antifúngica contra Cladosporium cladosporioides e Cladosporium sphaerospermum.</i>	155
	4.9.2 <i>Atividade antitumoral</i>	158
4.10	ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	162
	4.10.1 <i>Espectrometria de massas com injeção direta</i>	163
	4.10.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas</i> 165	
	4.10.3 <i>Ressonância magnética nuclear da fase orgânica</i>	169
	4.10.4 <i>Ressonância magnética nuclear da fase hidroalcoólica</i>	174
4.11	VIAS BIOSINTÉTICAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS	178
5.	CONCLUSÕES	180
6.	REFERÊNCIAS	182
	APÊNDICE A –ESPECTROS DE MASSAS POR INJEÇÃO DIRETA DOS EXTRATOS ANALISADOS POR PCA	189
	APÊNDICE B - ESPECTROS DE RMN DE ¹H DOS EXTRATOS ANALISADOS POR PCA (FASE ORGÂNICA)	191
	APÊNDICE C - ESPECTROS DE RMN DE ¹H DOS EXTRATOS ANALISADOS POR PCA (FASE HIDRO ALCOÓLICA)	192
	SUMULA CURRICULAR	193
	ANEXO A - CÁLCULOS DE DFT DAS SUBSTÂNCIAS 8 E 9	197

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Piperaceae

A família Piperaceae, uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas, pertence à ordem Piperales e é constituída por cinco gêneros, sendo os mais representativos *Piper* e *Peperomia* com cerca de 2000 e 1700 espécies, respectivamente (Jaramillo; Manos, 2001). As espécies de *Peperomia* são em sua maioria de pequeno porte, suculentas e muitas vezes epífitas, enquanto que espécies de *Piper* são geralmente arbustos ou pequenas árvores. A maior diversidade de espécies de *Piper* encontra-se na região neotropical, com cerca de dois terços das espécies descritas (Figura 1) (Dyer; Dodson; Richards, 2004; Jaramillo; Manos, 2001; Quijano-Abril; Callejas-Posada; Miranda-Esquivel, 2006).

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de *Piper* (Jaramillo; Manos, 2001).

Essa é uma família bastante comum nas formações florestais brasileiras, particularmente na Mata Atlântica, onde espécies do gênero *Piper* são pequenos arbustos ou árvores sub-lenhosas, comuns no sub-bosque, sendo facilmente reconhecidos mesmo em estado vegetativo pela presença de caules articulados com nós foliares geniculados e folhas simples e alternadas. As inflorescências são

particularmente distintas contendo de dezenas a milhares de minúsculas flores em frutos verticais ou pendentes (Dyer; Dodson; Richards, 2004; Souza, 2005).

Poucas espécies possuem importância econômica, com exceção de *Piper nigrum*, que é a fonte da pimenta do reino, uma das pimentas mais utilizadas no mundo e das raízes de *P. methysticum*, fonte de Kava ou chá de cava-cava, que são utilizadas como ansiolítico (Dyer; Dodson; Richards, 2004).

Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Piper*, realizados com cerca de 15 % das espécies, levaram à descoberta de muitos metabólitos secundários, principalmente alcalóides, amidas, lignanas, neolignanas, terpenos, derivados de ácidos benzoicos e flavonóides, com um alto potencial de bioatividade (Dyer; Dodson; Richards, 2004; Parmar et al., 1997; Scott et al., 2008; Sengupta; Ray, 1987).

Espécies de *Piper* presentes nas regiões tropicais e subtropicais têm sido amplamente investigadas devido às inúmeras substâncias biologicamente ativas nelas presentes, o que justifica seu amplo uso na medicina popular como remédios para dores no estômago, agentes anti-inflamatórios, antipiréticos, contra asma, e até como repelentes de insetos (Leite et al., 2012; Parmar et al., 1997).

1.1.1 *Piper caldense*

A espécie *Piper caldense* C.DC. (Figura 3) conhecida como “pimenta d’agua” é utilizada na Paraíba como sedativo, antídoto para picadas de cobras e para tratamento de dores de dente (Cardozo-Junior; Chaves, 2003). Esta é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência no nordeste, centro-oeste, sudeste e região sul, sendo encontrada principalmente na Mata Atlântica (Guimarães et al., 2012).

Estudos realizados com as raízes de *Piper caldense* levaram ao isolamento da aristolactama caldensina (Figura 2) (Cardozo-Junior; Chaves, 2003).

Figura 2. Estrutura da aristolactama caldensina.

Figura 3. Imagens da planta *P. caldense*.

1.1.2 *Piper bowiei*

Piper bowiei Yunck., uma espécie endêmica do Brasil é encontrada na Mata Atlântica nas regiões de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Guimarães et al., 2012). Não há relatos na literatura sobre o estudo químico desta planta.

1.1.3 *Piper permucronatum*

Piper permucronatum Yunck. é encontrada predominantemente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Guimarães et al., 2012). Não há relatos de estudos fitoquímicos na literatura, sendo somente relatado o estudo da composição de seu óleo essencial, que é constituído predominantemente pelos arilpropanoides miristicina (25,6%), dilapiol (54,7%), asaricina (8,6%) e elemicina (9,9%) (De Moraes et al., 2007).

1.1.4 *Piper carniconnectivum*

Piper carniconnectivum C. DC. (Figura 4) é uma espécie encontrada na região norte do Brasil, principalmente na região Amazônica (Guimarães et al., 2012). Estudos realizados com as raízes desta planta levaram ao isolamento e identificação de quatro flavonoides C-metilados (**1-4**), uma cumarina (**5**) e três derivados ciclopentenodiônicos (**6-7**) (Figura 5) (Facundo; Braz, 2004; Facundo et al., 2004).

Figura 4. Imagem da planta *P. carniconectivum*.

Figura 5. Metabólitos isolados das raízes de *Piper carniconectivum*.

1.2 Metabólitos secundários em *Piper*

As espécies de *Piper* são conhecidas por apresentarem uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos, como alcaloides, amidas, flavonoides, lignanas, neolignanas, terpenos e meroterpenos, como cromenos e derivados de ácidos benzoicos prenilados, os quais têm apresentado diversas atividades biológicas como antifúngica, antioxidante, bactericida, tripanossomicida, inseticida e citotóxica (Batista et al., 2008; Flores et al., 2008; Flores et al., 2009; Kato; Furlan, 2007; Parmar et al., 1997; Yamaguchi et al., 2006).

Dentre as substâncias bioativas obtidas a partir de espécies de *Piper*, é possível destacar a grandisina, uma lignana tetraidrofurânica de *P. solmsianum*, que apresentou atividade tripanossomicida *in vitro* contra *T. cruzi* (Martins et al., 2003) e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Cabral et al., 2009), e as amidas de *P. tuberculatum* que apresentaram atividade inseticida contra lagarta da soja e contra a broca da cana-de-açúcar (Navickiene et al., 2007) e mais recentemente, atividade moluscicida (Rapado et al., 2011) e schistossomicida (Moraes et al., 2011).

1.2.1 Meroterpenos

Produtos naturais provenientes de via biossintética mista e que são parcialmente derivados da via dos terpenoides são denominados meroterpenos. Uma grande quantidade de meroterpenos é descrita na literatura, como fenilpropanoides, alcaloides e flavonoides contendo cadeia lateral isoprênica (Geris e Simpson, 2009).

Diversos meroterpenos tem sido identificados nas plantas da família Piperaceae, principalmente os derivados de ácido benzoico, os quais têm

apresentado inúmeras atividades biológicas demonstrando o potencial desta classe de substâncias. Dentre estes compostos destacam-se os antifúngicos (**1, 3, 5, 6, 11-16, 19, 25 e 31**) (Lago et al., 2004), antioxidantes (**29-31**) (Yamaguchi et al., 2006), bactericidas (**1, 27, 36, 44-47, 50, 53 e 54**) (Rüegg et al., 2006), leishmanicidas (**1-4, 17, 25, 26, 38-44, 46, 48 e 50**) (Cabanillas et al., 2012; Flores et al., 2009) e os tripanossomicidas (**2, 4 e 31**) (Flores et al., 2008) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de *Piper* (continua).

Substância	Planta	Atividade	Referência
<p>1 R¹=H 2 R¹=OH</p>	(1) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. hostmannianum</i> ; <i>P. glabratum</i>	Antifúngica; Bactericida; <i>Leishmanicida</i>	(Lago et al., 2009; Lago et al., 2004; Orjala, J. et al., 1993)
	(2) <i>P. glabratum</i> ;	Leishmanicida; tripanossomí- da;	(Flores et al., 2008)
<p>3 R¹=H R²=OH 4 R¹=R²=OH 5 R¹=H R²=OOH</p>	(3) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. dilatatum</i> ; <i>P. hostmannianum</i> ; <i>P. glabratum</i> ;	Antifúngica; <i>Leishmanicida</i> ;	(Diaz; Arias; Joseph-Nathan, 1987; Lago et al., 2009; Orjala, Jimmy et al., 1993; Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998) (Flores et al., 2008; Lago et al., 2004)
	(4) <i>P. glabratum</i> ;	Leishmanicida; tripanossomí- da;	(Flores et al., 2008)
	(5) <i>P. aduncum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2009)
(6) <i>P. gaudichaudianum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2004)
<p>7 R¹=R²=H 8 R¹=CH₃ R²=H 9 R¹=H R²=OH 10 R¹=CH₃ R²=OH</p>	(7) <i>P. dilatatum</i> ;		(Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998)
	(8) <i>P. taboganum</i> ; <i>P. dilatatum</i> ;		(Roussis; Ampofo; Wiemer, 1990; Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998)
	(9) <i>P. lanceaefolium</i> ;		(Lopez; Ming; Towers, 2002)
	(10) <i>P. lanceaefolium</i> ;		(Lopez; Ming; Towers, 2002)

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de *Piper* (continuação).

(11) <i>P. aduncum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2004)
<p>(12) R¹=H (13) R¹=CH₃</p>	(12) <i>P. hostmannianum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2004)
	(13) <i>P. hostmannianum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2009)
<p>(14) R¹=R²=H (15) R¹=CH₃ R²=H (16) R¹=CH₃ R²=OH</p>	(14) <i>P. aduncum</i> ;	Antifúngica;	(Baldoqui et al., 1999; Lago et al., 2004)
	(15) <i>P. taboganum</i> ; <i>P. aduncum</i> ; <i>P. hostmannianum</i> ; <i>P. dilatatum</i> ;	Antifúngica;	(Baldoqui et al., 1999; Diaz; Arias; Joseph-Nathan, 1987; Lago et al., 2004; Orjala, Jimmy et al., 1993; Roussis; Ampofo; Wiemer, 1990; Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998)
	(16) <i>P. aduncum</i> ;	Antifúngica;	(Baldoqui et al., 1999; Lago et al., 2004; Orjala, Jimmy et al., 1993)
<p>(17) R¹=H (18) R¹=CH₃</p>	(17) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. dennisii</i> ;	Leishmanicida;	(Cabanillas et al., 2012; Orjala, Jimmy et al., 1993)
	(18) <i>P. aduncum</i> ;		(Baldoqui et al., 1999)
(19) <i>P. gaudichaudianum</i> ;	Antifúngica;	(Lago et al., 2004)
<p>(20) R¹=H (21) R¹=OH</p>	(20) <i>P. hostmannianum</i> ;		(Diaz; Arias; Joseph-Nathan, 1987)
	(21) <i>P. dilatatum</i> ;		(Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998)

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de *Piper* (continuação).

<p>22 R¹=H R²=OH 23 R¹=CH₃ R²=H 24 R¹=CH₃ R²=OH</p>	(22) <i>P. lanceaefolium</i> ;		(Lopez; Ming; Towers, 2002)
	(23) <i>P. taboganum</i> ; <i>P. gaudichaudianum</i> ; <i>P. dilatatum</i> ;		(Lago et al., 2004; Roussis; Ampofo; Wiemer, 1990; Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998)
	(24) <i>P. lanceaefolium</i> ;		(Lopez; Ming; Towers, 2002)
<p>25 R¹=R²=H 26 R¹=H R²=CH₃ 27 R¹=R²=CH₃</p>	(25) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. gaudichaudianum</i> ;	Leishmanicida; Antifúngica;	(Flores et al., 2009) (Flores et al., 2008; Lago et al., 2004)
	(26) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. dennisii</i> ;	Leishmanicida;	(Baldoqui et al., 1999; Cabanillas et al., 2012; Flores et al., 2009) (Lago et al., 2004)
	(27) <i>P. aduncum</i> ;	Bactericida;	(Orjala, J. et al., 1993)
(28) <i>P. aduncum</i> ;		(Orjala, Jimmy et al., 1993)
(29) <i>P. crassinervium</i> ;	Antioxidante;	(Yamaguchi et al., 2006)
(30) <i>P. crassinervium</i> ;	Antioxidante; antifúngica;	(Lago et al., 2004; Lopes et al., 2008; Yamaguchi et al., 2006)
(31) <i>P. crassinervium</i> ;	Antioxidante; antifúngica; tripanossomí- cida;	(Lago et al., 2004; Lopes et al., 2008; Yamaguchi et al., 2006)

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de *Piper* (continuação).

<p> 32 R¹=R²=H 33 R¹= H R²=CH₃ 34 R¹=CH₃ R²=H 35 R¹=R²=CH₃ </p>	(32-35) <i>P. marginatum</i> ;		(Maxwell; Rampersad, 1988)
<p>(36) <i>P. multiplinervium</i>;</p>	Bactericida;		(Rüegg et al., 2006)
<p>(37) <i>P. arieianum</i>;</p>			(Green; Treadwell; Wiemer, 1999)
<p> 38 R¹=H 39 R¹=OH </p>	(38) <i>P. heterophyllum</i> ; <i>P. arieianum</i> ; (39) <i>P. heterophyllum</i> ;	Leishmanicida;	(Flores et al., 2009)
<p>(40) <i>P. arieianum</i>; <i>P. heterophyllum</i>;</p>	Leishmanicida;		(Flores et al., 2009; Green; Treadwell; Wiemer, 1999)
<p> 41 R¹=H 42 R¹=OH </p>	(41) <i>P. heterophyllum</i> ; (42) <i>P. heterophyllum</i> ;	Leishmanicida;	(Flores et al., 2009)
<p>(43) <i>P. heterophyllum</i>;</p>	Leishmanicida;		(Flores et al., 2009)

Tabela 1. Derivados de ácidos benzoicos de espécies de *Piper* (conclusão).

<p> 44 R¹=R²=H 45 R¹=H R²=CH₃ 46 R¹=CH₃ R²=H 47 R¹=R²=CH₃ </p>	(44) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. acutifolium</i> ; <i>P. dennisii</i> ;	Bactericida; Leishmanicida;	(Cabanillas et al., 2012; Flores et al., 2008; Orjala, J. et al., 1993)
	(45) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. acutifolium</i> ;	Bactericida;	(Flores et al., 2008; Orjala, J. et al., 1993)
	(46) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. dennisii</i> ;	Bactericida; Leishmanicida;	(Cabanillas et al., 2012; Orjala, J. et al., 1993)
	(47) <i>P. aduncum</i> ;	Bactericida;	(Orjala, J. et al., 1993)
<p> 48 R¹=H 49 R¹=CH₃ </p>	(48) <i>P. acutifolium</i> ;	Leishmanicida;	(Flores et al., 2008)
	(49) <i>P. acutifolium</i> ;		(Flores et al., 2008)
(50) <i>P. aduncum</i> ; <i>P. dennisii</i> ;	Leishmanicida; bactericida;	(Cabanillas et al., 2012; Flores et al., 2009; Orjala, J. et al., 1993)
(51) <i>P. acutifolium</i> ;		(Flores et al., 2008)
(52) <i>P. acutifolium</i> ;		(Flores et al., 2008)
<p> 53 R¹=H 54 R¹=CH₃ </p>	(53-54) <i>P. aduncum</i> ;	Bactericida;	(Orjala, J. et al., 1993)

1.2.2 Protoflavonoides

Flavonoides contendo anel B não aromático são também denominados de protoflavonoides e representam uma sub-classe de produtos naturais das mais raras. Os principais relatos de ocorrência desta classe de flavonoides são em espécies de samambaias das famílias Thelypteridaceae, Equisetaceae e Dryopteridaceae (Noro et al., 1969; Wada, Hiroshi et al., 1987; Wei et al., 2011) pertencentes à divisão das Pteridófitas, com vinte substâncias relatadas, relacionando a principal ocorrência deste esqueleto em plantas primitivas. Em Angiospermas, há apenas um relato da ocorrência de quatro substâncias na espécie *Ongokea gore* (Olacaceae) (Jerz; Waibel; Achenbach, 2005) (**Tabela 2**).

Estudos de atividade biológica realizados com protoflavonoides têm relatado que esta classe de substâncias apresenta um grande potencial citotóxico, apresentando resultados promissores contra inúmeras linhagens de células tumorais. Apesar de sua atividade não ser tão potente (~1µM) em comparação aos fármacos cisplatina, vicristina e taxol (~2 nM), por exemplo, estudos realizados com a combinação dessas substâncias com as drogas atualmente utilizadas no tratamento do câncer têm apresentado um aumento no potencial citotóxico (Lin, A.-S. et al., 2005; Liu et al., 2011; Wei et al., 2011).

Entre os protoflavonoides identificados, a protoapigenona (Figura 6) tem sido bastante investigada e apresentou inibição do crescimento de células tumorais de câncer de ovário *in vitro* e *in vivo* (MDAH-2774 e SKOV3) sem grandes efeitos colaterais. Sua administração combinada com o fármaco cisplatina no tratamento de células MDAH-2774 aumentou significativamente a inibição em relação à demonstrada por cada uma das substâncias isoladamente (Chang; Su; et al., 2008).

Figura 6. Estrutura da protoapigenona (55).

A potencial atividade citotóxica demonstrada pela protoapigenona motivou também a realização de sua síntese total e a avaliação da atividade de seus análogos, bem como o estudo de sua relação estrutura atividade. Isso permitiu demonstrar que a presença de duplas ligações simétricas no anel B faz a protoflavona exibir uma atividade citotóxica maior quando comparada com a presença de apenas uma dupla ligação. A presença de alguns substituintes, como o grupo metoxílico na posição C-7 do anel B, demonstrou aumentar a seletividade e potencializar sua atividade contra diferentes tipos de linhagens de células tumorais (Figura 7) (Lin; Nakagawa-Goto; et al., 2007).

Figura 7. Efeito dos substituintes na atividade antitumoral das protoflavonas (Lin; Nakagawa-Goto; et al., 2007).

Tabela 2. Protoflavonoides de ocorrência natural (continua).

Protoflavonoide	Nome	Planta	Atividade	Referência
<p>55 R¹= H 56 R¹= Me</p>	(55) Protoapigenona	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae); <i>Phegopteris decursive-pinnata</i> (Thelypteridaceae) <i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);	Antitumoral	(Chang; Su; et al., 2008; Chang; Wu; et al., 2008; Lin, A. S. et al., 2005; Pouny et al., 2011; Wei et al., 2011)
	(56) Protogenkwanona	<i>Pseudophegopteris hirtirachis</i> (Thelypteridaceae); <i>Phegopteris decursive-pinnata</i> (Thelypteridaceae)		(Pouny et al., 2011; Wada, H. et al., 1987)
<p>57 R¹=H, R²=H 58 R¹=H, R²=Glu 59 R¹=Me, R²=H</p>	(57) Protoapigenina	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae); <i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);	Antitumoral	(Lin, A. S. et al., 2005; Wei et al., 2012)
	(58)	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae); <i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae); <i>Equisetum arvense</i> (Equisetaceae);		(Hauteville et al., 1981; Lin, A. S. et al., 2005; Wei et al., 2012)
	(59) Protogenkwanina	<i>Pseudophegopteris hirtirachis</i> (Thelypteridaceae); <i>Equisetum arvense</i> (Equisetaceae);		(Hauteville et al., 1981; Wada, H. et al., 1987)
<p>60 R¹=Ac, R²=H 61 R¹=H, R²=Ac 62 R¹=H, R²=H</p>	(60-62)	<i>Pseudophegopteris hirtirachis</i> (Thelypteridaceae);		(Wada, H. et al., 1987)
(63) Protofarrerol	<i>Leptorumohra miqueliana</i> (Dryopteridaceae);		(Akahori et al., 1970; Fukushima et al., 1969; Murakami et al., 1987; Noro et al., 1969)
<p>64 R¹=H, R²=H 65 R¹=H, R²=OH 66 R¹=Me, R²=OH 67 R¹=H, R²=OMe</p>	(64) 2',3'-di-hidroproto-genkwanona	<i>Phegopteris connectilis</i> (Thelypteridaceae); <i>Phegopteris decursive-pinnata</i> (Thelypteridaceae);	Antitumoral	(Adam, 1999; Pouny et al., 2011)
	(65)	<i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);		(Wei et al., 2011)
	(66) 2',3'-di-hidro-2'-hidroxiprotoapi-genina	<i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae); <i>Phegopteris decursive-pinnata</i> (Thelypteridaceae)	Antitumoral	(Pouny et al., 2011; Wei et al., 2011)
	(67) 5',6-di-hidro-6'-metoxiprotoapi-genina	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae); <i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);	Antitumoral	(Lin, A. S. et al., 2005; Wei et al., 2012)

Tabela 2. Protoflavonoides de ocorrência natural (conclusão).

	(68) Di- hidroprotofarrerol	<i>Leptorumohra miqueliana</i> (Dryopteridaceae);		(Fukushima et al., 1969)
	(69) (2S)- ongokein-4'-ona	<i>Ongokea gore</i> (Olacaceae);		(Jerz; Waibel; Achenbach, 2005)
	(70) Tetra-hidro- protogenkwanona	<i>Pseudophegopteris hirtirachis</i> (Thelypteridaceae);		(Wada, H. et al., 1987)
 71 R ¹ = H, R ² = H 72 R ¹ = Me, R ² = H 73 R ¹ = H, R ² = Glu	(71)	<i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);		(Wei et al., 2012)
	(72) Tetra-hidro- protogenkwanina	<i>Pseudophegopteris hirtirachis</i> (Thelypteridaceae);		(Wada, H. et al., 1987)
	(73)	<i>Macrothelypteris viridifrons</i> (Thelypteridaceae);		(Wei et al., 2012)
	(74) Flavotorresina	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae);		(Lin; Chang; et al., 2007)
	(75)	<i>Macrothelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae);		(Tang et al., 2010)
	(76) (2S)-cis-4'- hidroxi-ongokeina (77) (2S)-trans-4'- hidroxi-ongokeina	<i>Ongokea gore</i> (Olacaceae);		(Jerz; Waibel; Achenbach, 2005)
	(78) (2S)-4'-4'- dimetoxi- ongokeina	<i>Ongokea gore</i> (Olacaceae);		(Jerz; Waibel; Achenbach, 2005)

1.3 Análises metabolômicas de plantas

O termo metaboloma compreende o conjunto de todos os metabólitos primários e secundários presentes em um determinado organismo. A análise metabolômica de plantas é a chave para a compreensão da complexidade de seu metabolismo e da ligação entre genótipos e fenótipos (Villas-Bôas et al., 2005).

A obtenção do metaboloma constitui-se num grande desafio, visto que a quantidade de metabólitos presente em uma única planta pode chegar a 30.000. Além da grande quantidade de metabólitos, outra limitação está relacionada com a presença de substâncias com uma grande variedade estrutural, com diferentes tamanhos, polaridades, estabilidade e reatividade, o que dificulta a realização da análise de todo o metaboloma utilizando uma única técnica analítica (Verpoorte; Choi; Kim, 2010).

A análise metabolômica consiste em três partes experimentais distintas: preparo da amostra, aquisição de dados e tratamento de dados, e os principais desafios são a padronização e a reprodutibilidade de todas as etapas (Schripsema, 2010).

1.3.1 Preparo da amostra

Inúmeras metodologias referentes ao preparo de amostra para as análises metabolômicas estão descritas na literatura, no entanto, o ponto mais importante nesta etapa é obter um método eficaz (Verpoorte; Choi; Kim, 2010).

Após a coleta do material é necessário realizar uma etapa de *quenching*, que consiste em realizar mudanças bruscas de temperatura através do congelamento

em nitrogênio líquido, por exemplo, reduzindo assim o aparecimento de artefatos resultantes da atividade enzimática.

Para a determinação do método de extração dos metabólitos deve-se considerar a técnica analítica a ser utilizada na etapa seguinte. Assim, a seleção da polaridade das substâncias deverá envolver o tipo de solvente extrator, podendo ser utilizadas misturas de solventes com polaridades distintas. A qualidade do material e solventes utilizados também é importante para evitar a presença de contaminantes e inserção de artefatos, além disso, o material a ser extraído pode ser fresco, liofilizado ou seco. Um aspecto de grande importância é a realização de amostragem adequada para se obter um suporte estatístico para a análise em questão.

1.3.2 Aquisição de dados

Atualmente nenhum método analítico simples ou combinado é suficiente para detectar todos os metabólitos em um organismo. Diversas técnicas analíticas vêm sendo utilizadas nas análises metabolômicas, principalmente cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas (CG-EM e CLAE-EM), injeção direta no espectrômetro de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) (Allwood; Goodacre, 2010).

A escolha da melhor técnica deve levar em consideração quais são os metabólitos de interesse, além das vantagens e desvantagens de cada técnica. A técnica de CG-EM é aplicada na separação, identificação e quantificação de diferentes classes de metabólitos, principalmente os voláteis, de baixa polaridade e termoestáveis. A presença de uma biblioteca para comparação torna possível a identificação de grande parte dos metabólitos. Para os metabólitos de média

polaridade muitas vezes é necessário acrescentar uma etapa de derivatização, o que dificulta a identificação de metabólitos desconhecidos (Villas-Bôas et al., 2005).

Na análise de CLAE-EM podem ser analisados os metabólitos de média e alta polaridade presentes em matrizes complexas com alta sensibilidade na detecção. O acoplamento da cromatografia líquida com espectrometria de massas permite a análise de metabólitos termicamente instáveis e não voláteis. No entanto há limitações quanto ao uso das fases móveis utilizadas na separação cromatográfica, fazendo-se necessário o uso de fases móveis e tampões voláteis, quando necessário. As principais fontes de ionização empregadas são *electrospray* (ESI) e ionização química sob pressão atmosférica (APCI). O ESI é utilizado principalmente para a ionização de compostos polares e o APCI para os de menor polaridade (Allwood; Goodacre, 2010; Villas-Bôas et al., 2005).

A injeção direta no espectrômetro de massas também pode ser utilizada para uma identificação rápida dos metabólitos presentes, sendo frequentemente necessária a realização de fragmentação para a identificação e caracterização destes. Neste tipo de análise há uma grande interferência da matriz da amostra, pois não há uma etapa prévia de separação cromatográfica (Villas-Bôas et al., 2005).

O emprego de RMN permite analisar diferentes classes de metabólitos primários e secundários. Os experimentos de RMN 2D são também utilizados para a elucidação estrutural dos principais constituintes da mistura. De uma forma geral, a RMN possibilita obtenção de resultados quantitativos, no entanto, a principal desvantagem é sua baixa sensibilidade, principalmente quando são analisadas matrizes complexas, sendo necessária uma quantidade muito maior (cerca de 10 a 50 mg) de material em comparação às técnicas de espectrometria de massas (menos de 1 mg) (Kim; Choi; Verpoorte, 2010, 2011).

1.3.3 Quimiometria

A quimiometria constitui-se em uma área dentro da química onde os dados são processados por métodos estatísticos ou matemáticos com a finalidade de identificar padrões e expressá-los de uma maneira mais simplificada, evidenciando as similaridades e diferenças existentes entre eles. Existem diversas técnicas quimiométricas, como a análise de componentes principais (PCA), análise por agrupamento hierárquico (HCA), entre outros (Brereton, 2003).

As técnicas quimiométricas podem ser de análise exploratória de dados, reconhecimento de padrão não supervisionado, reconhecimento de padrão supervisionado, modelos de regressão, entre outros.

Análise exploratória

A análise exploratória de dados consiste principalmente na técnica de análise de componentes principais (PCA) e é utilizada no processamento de dados complexos e com muitas variáveis, como os cromatográficos e espectrais. Busca-se uma simplificação desses dados para um sistema composto por componentes principais (PCs), que representam o conjunto total das variáveis presentes e que descrevam a variância dos mesmos. Nesta análise é possível observar as relações entre os dados, como as diferenças e similaridades, no entanto, algumas vezes as variáveis não podem ser correlacionadas, impossibilitando a obtenção de um bom resultado (Manly, 2008).

No PCA, a matriz original, contendo muitas variáveis, é reduzida através de uma transformação matemática resultando em dois gráficos, os quais podem ser interpretados mais facilmente. No gráfico de *scores*, que possui o mesmo número de

linhas da matriz original, é apresentado o resultado em função da quantidade de amostras analisadas onde é possível observar as similaridades e diferenças entre elas. No gráfico de *loadings*, que possui o mesmo número de colunas da matriz original, apresenta o resultado em função das variáveis presentes na matriz (Figura 8). As PCs descrevem a variância dos dados, em porcentagem, a qual está diretamente relacionada com a quantidade de dados originais utilizados para a obtenção dos gráficos (Brereton, 2003; Livingstone, 1995; Wold; Esbensen; Geladi, 1987).

Figura 8. Processamento da matriz por PCA resultando nos gráficos de *scores* e *loadings*.

Padrão de reconhecimento não supervisionado

O padrão de reconhecimento não supervisionado consiste principalmente na análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e é utilizado com a finalidade de evidenciar as similaridades entre padrões de dados.

A base da HCA é a realização dos cálculos das distâncias entre objetos em um espaço multidimensional. Essas distâncias são usadas para a construção de um diagrama, conhecido também como dendrograma, o qual permite a identificação de

grupos de similaridades entre as amostras (Figura 9) (Brereton, 2003; Livingstone, 1995).

Figura 9. Processamento da matriz por HCA resultando no dendrograma.

No HCA as distâncias pequenas indicam uma maior similaridade entre as amostras, e distâncias maiores indicam que estas são distintas entre si. Várias metodologias podem ser empregadas nos cálculos das distâncias, sendo as principais: ligação simples (vizinho mais próximo), ligação completa (vizinho mais distância) e método de Ward (Brereton, 2003).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar técnicas metabolômicas para a análise de um conjunto de espécies vegetais com o propósito de realizar um estudo fitoquímico. Os extratos de *Piper bowiei*, *P. caldense*, *P. carniconnectivum* e *P. permucronatum*, espécies com frutos pendentes, foram analisados por técnicas espectrométricas (ESI), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução e Ressonância Magnética Nuclear, e os dados obtidos foram submetidos à análise quimiometria (PCA e HCA).

O trabalho também teve como objetivo a caracterização dos agrupamentos observados no PCA através do isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Finalmente, os produtos naturais isolados foram analisados quanto às atividades biológicas em função de suas características estruturais para as quais relatos haviam sido descritos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Especificações de materiais, instrumentos e técnicas utilizadas

3.1.1 Solventes utilizados em cromatografia

Os solventes utilizados nos procedimentos de extrações e eluições de colunas cromatográficas foram devidamente destilados e tratados pela Central de Solventes do Instituto de Química da USP. Nas análises de CLAE e CG foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck, Tedia e J.T. Baker), e água deionizada (18m Ω , Milli-Q, Millipore), todos filtrados e posteriormente desgaseificados.

3.1.2 Cromatografia líquida

As separações por cromatografia líquida (CL) foram realizadas utilizando uma coluna de vidro em diferentes dimensões. As separações por cromatografia líquida a vácuo (CLV) foram realizadas sob vácuo utilizando-se um funil de placa sinterizada acoplado a um kitassato.

As fases estacionárias utilizadas foram sílica Gel 60 de 0,070 – 0,200 nm (sílica comum) e 0,035-0,060 nm (sílica flash) (Acrós Organics ou Merck), C-18 preparativo (125 Å, 22-105 μ m) (Waters) e Sephadex LH-20 (GE Healthcare).

3.1.3 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em placas de alumínio revestidas com Sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm (Merck).

As cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) foram realizadas em placas de vidro de 20 x 20 cm revestidas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) com 1,0 mm de espessura.

Os reveladores utilizados foram lâmpada de ultravioleta em câmara escura nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e aspersão de solução de vanilina sulfúrica (5,1 g de vanilina, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 800 mL de etanol) seguida de aquecimento.

3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um sistema de cromatografia acoplado a um detector na região do UV-Vis com arranjo de diodos (Sistema CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo CMB-20A, equipado com um detector UV-DAD modelo SPD-20A, duas bombas modelo LC-20AD, forno de coluna CTO-20A e um injetor automático modelo SIL-20AC, controlados pelo software LC solutions (Shimadzu).

Foi utilizada coluna de fase reversa C-18 da marca Phenomenex (Luna C-18 (2) 250 x 4,6 mm – 5 μ) acoplada a uma pré-coluna de material equivalente.

O gradiente de eluição utilizado nas separações por CLAE foi constituído pelos eluentes A: H₂O - 0,1% ácido fórmico e B: ACN - 0,1% ácido fórmico (**Tabela 3**).

Tabela 3. Gradiente de eluição realizado na CLAE.

Tempo (min)	%B
0.01	20
2.00	20
25.00	100
30.00	100
32.00	20
35.00	20

3.1.5 Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas (ESI) foram realizadas nos equipamentos ESQUIRE 3000 plus, MicrOTOF e MicrOTOF-Q (Bruker Daltonics) para identificação das amostras por injeção direta ou por CLAE acoplada à espectrometria de massas.

As análises por espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons foram realizadas cromatógrafo Shimadzu modelo GCMS-QP5050

3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN foram realizadas nos espectrômetros Bruker DPX 300 (300 MHz), Bruker DRX 500 (500 MHz), Varian Inova 300 (300 MHz) e Varian Gemini 200 (200 MHz). As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (CDCl_3 , CD_3OD , Acetona- d_6 , D_2O e DMSO- d_6 , Aldrich).

3.1.7 Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis

As análises de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1650 PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

3.1.8 Espectroscopia na região do Infravermelho

As análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas no espectrômetro BOMEM-MB100. As amostras sólidas foram analisadas em KBr (proporção 1 mg amostra: 100 mg KBr) e as líquidas viscosas em filme com cerca de 0,01 mm de espessura.

3.1.9 Polarímetro

O ângulo de desvio de luz plano polarizada $[\alpha]_D$ foi medido em um polarímetro da marca Perkin-Elmer, modelo 343, equipado com uma lâmpada de sódio e utilizando uma célula de quartzo de 100 mm de caminho óptico.

3.1.10 Espectropolarímetro

As curvas de dicroísmo circular foram obtidas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J-720 e utilizando uma célula de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

3.2 Material Vegetal

As espécies: *Piper bowiei*, *Piper caldense*, *Piper carniconnectivum* e *Piper permucronatum* foram selecionadas para estudo considerando o fato terem sido pouco estudadas e por terem em comum a presença de frutos pêndulos e globosos. Os espécimes estudados foram coletados com a autorização para atividades com finalidade científica número 15780-3 (ICMBio e Sisbio) e vêm sendo mantidos na estufa para plantas do Laboratório de Química de Produtos Naturais no Instituto de Química da USP. As espécies foram identificadas pela Profa. Dra. Elsie Franklin

Guimarães no Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (**Tabela 4**)

Tabela 4. Local de coleta das espécies estudadas.

Espécie	Código	Local de coleta
<i>P. bowiei</i>	K-364	São Paulo – SP
<i>P. caldense</i>	K-484	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	K-842	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	K-951	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	K-1209	Ubatuba – SP
<i>P. permucronatum</i>	K-310	São Paulo – SP
<i>P. permucronatum</i>	K-1022	Cubatão – SP
<i>P. permucronatum</i>	K-1210	Ubatuba - SP
<i>P. permucronatum</i>	K-1220	Ubatuba - SP
<i>P. carniconnectivum</i>	K-976	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	K-978	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	K-991	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	K-1441	Belterra – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	K-1600	Manaus – AM

3.3 Extração e purificação dos metabólitos secundários

3.3.1 Preparo dos extratos brutos

Para o estudo fitoquímico foi selecionada uma planta de cada espécie coletada. Os diversos órgãos de cada planta (folhas, caule, galhos, frutos e raízes) foram separados e secos em uma estufa a 50 °C por 48 horas e moídos em um moinho de facas.

O material foi extraído com AcOEt ou CHCl₃/MeOH por 3 dias a temperatura ambiente. O solvente foi filtrado e concentrado em um evaporador rotativo (Büchi). O material restante foi extraído novamente com o mesmo solvente e concentrado junto com o extrato anterior (**Tabela 5**). Após a filtração do extrato das folhas de *P.*

carniconnectivum, este foi submetido a uma extração líquido-líquido com adição de 250 mL de H₂O, apenas a fase orgânica CHCl₃ foi submetida ao fracionamento.

Tabela 5. Extratos preparados para estudo fitoquímico.

Espécie/código da planta	Parte da planta	Massa de material seco (g)	Solvente de extração	Código	Massa extrato
<i>P. caldense</i> (K-842)	Folhas	10,5	AcOEt	K-842 FA	2,6 g
<i>P. bowiei</i> (K-364)	Folhas	11,7	AcOEt	K-364 FA	1,7 g
<i>P. permucronatum</i> (K-1210)	Folhas	50,0	AcOEt	K-1210 FA	7,0 g
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1441)	Folhas	14,0	AcOEt	K-1441 FA	3,5 g
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1441)	Frutos	5,0	AcOEt	K-1441 FrA	1,4 g
<i>P. carniconnectivum</i> . (K-1600)	Folhas	15,1	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	K-1600 FC	1,6 g

3.3.2 Metabólitos de *Piper caldense*

Através das análises de CLAE (Figura 10) e RMN de ¹H (Figura 11) foi possível verificar a presença de um composto majoritário (t_R=19.5 min) no extrato bruto das folhas de *P. caldense* (K- 842 FA).

Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE-UV-Vis (254 nm) do extrato bruto das folhas de *P. caldense* (K842-FA).

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das folhas de *P. caldense* (K-842 FA, CDCl_3 , 500 MHz).

O extrato K-842 FA foi submetido a um fracionamento por CLV utilizando como fase estacionária sílica comum ($h = 10 \text{ cm}$, $\varnothing = 10 \text{ cm}$) e eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e MeOH. Neste fracionamento foram obtidas doze frações que foram analisadas por CCDA e posteriormente por CLAE. A substância majoritária da fração K-842FA 3 foi purificada por CCDP utilizando-se como eluente hexano: AcOEt (3:2), que levou ao isolamento da flavona **4**.

Através da análise de CLAE foi possível detectar o metabólito majoritário do extrato, na fração K-842FA 6, que foi fracionada por CC utilizando-se eluição gradiente com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, a fase estacionária utilizada foi Sílica gel 60 comum. Neste fracionamento foram obtidas dez frações e na fração K-842FA 6.5 foi identificado o ácido caldensínico (**12**), composto majoritário do extrato.

3.3.3 Metabólitos de *Piper bowiei*

Através das análises de CLAE (Figura 12) e RMN de ^1H (Figura 13), foi possível verificar a presença de um composto majoritário ($t_R=23.4$ min) no extrato das folhas de *P. bowiei* K- 364 FA.

Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV-Vis (254 nm) do extrato bruto das folhas de *P. bowiei* (K-364FA).

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das folhas de *P. bowiei* (K-364 FA, CDCl_3 , 200 MHz).

O extrato K-364 FA foi submetido a um fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando como fase estacionária sílica comum ($h = 10\text{ cm}$, $\varnothing = 10\text{ cm}$) e eluição gradiente com hexano, AcOEt e MeOH. Neste fracionamento foram obtidas quatorze frações.

As frações foram analisadas por CCDA e a fração K-364FA 2 foi submetida à uma CCDP utilizando-se como fase móvel a mistura hexano e AcOEt (9:1), levando ao isolamento da substância **1**, o cromeno 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila.

A fração K-364FA 5 foi fracionada por CC utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e eluição isocrática com MeOH. Foram obtidas dez frações, sendo que na fração K-364FA 5.7 foi identificada a substância **2**, cromeno 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila. Na fração K-364FA 5.5 foi identificada a substância **6**, a flavanona di-hidrowogonina, constituinte majoritário do extrato.

3.3.4 Metabólitos de *Piper permucronatum*

Através das análises de CLAE (Figura 14) e RMN de ^1H (Figura 15) foi possível verificar a presença de dois compostos ($t_R=14.5$ e 16.5 min) no extrato das folhas de *P. permucronatum* K- 1022 FA.

Figura 14. Cromatograma obtido por CLAE de K-1022 FA.

Figura 15. Espectro de RMN de ¹H do extrato K-1022 FA (500 MHz, CDCl₃).

O extrato K-1210FA (2,7 g) foi submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV) utilizando fase estacionária reversa C-18 (h = 5 cm, ø = 10 cm). O extrato foi solubilizado em 90 mL de MeOH e à solução foram adicionados 10 mL de água, com a intenção de precipitar ácidos graxos e clorofila. A mistura foi então submetida à filtração (4 X 100 mL de MeOH:H₂O - 9:1). A solução foi concentrada em um evaporador rotativo e submetida ao fracionamento cromatográfico por CLV

utilizando-se como fase estacionária sílica flash ($h = 7$ cm, $\varnothing = 10$ cm) e eluição gradiente com hexano, AcOEt e MeOH. Neste fracionamento foram obtidas quatorze frações. Na fração K-1210FA-4 foi identificada a substância **7**, a flavanona sakuranetina, que foi purificada por CC ($h = 25$ cm, $\varnothing = 3,5$ cm) utilizando-se como fase estacionária sílica flash e eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e MeOH. Na fração K-1210FA-12 foi identificada a substância **3**, que foi purificada por CL utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 ($h = 45$ cm, $\varnothing = 2,5$ cm) e eluição isocrática com MeOH. Esta substância foi identificada como a flavanona 7-O-metil-luteolina

3.3.5 Metabólitos de *P. carniconnectivum* (K-1441)

Através das análises de CLAE (Figura 16) e RMN de ^1H (Figura 17) do extrato K-1441 FA foi possível verificar a presença de um composto majoritário ($t_R = 11.0$ min) no extrato das folhas de *P. carniconnectivum* K- 1441 FA.

Figura 16. Cromatograma CLAE de K-1441 FA.

O extrato K-1441 FA (3,5 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico por CLV utilizando-se como fase estacionária sílica Gel 60 Comum ($h = 5$ cm, $\varnothing = 5$

cm) e eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e metanol. As quatorze frações obtidas foram analisadas por CCDA, CLAE e RMN, levando à identificação de duas novas substâncias. Na fração K-1441FA-9 foi identificada a substância **8**, que foi purificada por CL utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 ($h = 50$ cm, $\varnothing = 2,5$ cm) e eluição isocrática com MeOH. Na fração K-1441FA-12 foi identificada a substância **9**, através do procedimento de recristalização utilizando MeOH.

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H de K-1441 FA (500 MHz, CDCl_3).

No extrato dos frutos de *P. carniconnectivum* (K-1441 FrA) observou-se a predominância de uma substância em $t_R = 25,5$ min, através das análise de CLAE (Figura 18) e RMN de ^1H (Figura 19).

Figura 18. Cromatograma CLAE de K-1441 FrA.

Figura 19. Espectro de RMN de ¹H de K-1441 FrA (500 MHz, CDCl₃).

O extrato K-1441 FrA (3,5 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico por CLV utilizando-se como fase estacionária sílica Gel 60 Comum (h = 10 cm, ø = 5 cm) e eluição gradiente com os solventes hexano, AcOEt e metanol. Foram obtidas treze frações. As frações obtidas foram analisadas por CCDA, CLAE e RMN, levando à identificação de duas novas substâncias, na fração K-1441FrA-5 foi identificada a substância **13**, que foi purificada por CL utilizando-se como fase

estacionária sílica comum ($h = 40$ cm, $\varnothing = 2,5$ cm) no modo gradiente com os solventes hexano, AcOEt e MeOH.

3.3.6 Metabólitos de *P. carniconnectivum* (K-1600)

Através das análises de CLAE (Figura 20) e RMN de ^1H (Figura 21) foi possível verificar a presença de três compostos majoritários ($t_R = 9,0$, $12,0$ e $15,0$ min) no extrato das folhas de *P. carniconnectivum* K-1600 FC. Este extrato apresentou um perfil cromatográfico diferente do obtido para as folhas de *P. carniconnectivum* K-1441-FA.

Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE de K-1600 FC.

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do extrato K-1600 FC (500 MHz, CDCl_3)

O extrato K-1600 FC (1,6 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico por CLV utilizando-se como fase estacionária sílica Gel 60 Comum ($h = 7$ cm, $\varnothing = 5$ cm) e eluição gradiente com hexano, AcOEt e MeOH. Foram obtidas dez frações. Os compostos majoritários **5**, **10** e **11** foram identificados nas frações K-1600FC-6, 4 e 9, respectivamente, e foram purificados por CCDP utilizando-se como eluente hexano:AcOEt (2:3).

3.4 Obtenção de derivados

A obtenção de derivados dos metabólitos secundários isolados foi realizada para as substâncias **8**, **12** e **13**, conforme procedimentos descritos a seguir, com a finalidade de obter substâncias com variedade estrutural para o estudo de atividade biológica.

3.4.1 Reação de metilação

Preparação do diazometano

A um balão de destilação de 500 mL, equipado com condensador de tubo reto (sem juntas esmerilhadas), contendo uma solução de 0,1 mol de *N*-metil-*N*-nitroso-*para*-tolueno-sulfonamida (Diazald®) em 240 ml de éter etílico foi adicionado uma solução de KOH (0,1 mol) em 7 ml de água destilada e 25 ml de etanol. A seguir, esta mistura foi aquecida em torno de 35°C em um banho de água quente a 45°C e a solução destilada de diazometano foi coletada em frasco refrigerado.

Metilação

As substâncias **12** e **13** (80 e 72 mg, respectivamente) foram tratadas com excesso de solução etérea de diazometano e deixadas em repouso por 12 horas à temperatura ambiente. A formação dos produtos desejados foi verificada por CCDA. Os produtos de cada uma das reações foram separados por CCDP utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (7:3). Foram obtidos 70 mg de **12a** (rendimento: 88%) e 55 mg de **13a** (rendimento: 76%) (Figura 22).

Figura 22. Reação de metilação das substâncias **12** e **13**.

3.4.2 Reação de acetilação

A substância **12** (140 mg, 0,3 mmol), foi dissolvida em excesso de anidrido acético (1,0 mmol) a qual foram adicionadas Et₃N (1,0 mmol) e DMAP (4-*N,N*-dimetil-aminopiridina (0,03 mmol) (Figura 23). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente (Virsu et al., 2001). O produto **12c** (70 mg, rendimento: 50%) foi purificado por CCDP utilizando-se como eluente hexano: AcOEt (2:3).

Figura 23. Reação de acetilação da substância **12**.

3.4.3 Hidrogenação catalítica

As substâncias **8** e **12** (30 mg, 100 mg) foram dissolvidas em 3 mL de metanol, e foram adicionados 2 mg e 5 mg, respectivamente, de catalisador Pd-C (10%) (Aldrich) (Figura 24). A mistura foi colocada sob agitação em um reator em atmosfera de hidrogênio à pressão de 4 atm por 3 horas. Os produtos **12c**, **8a** foram purificados por CCDP utilizando-se como eluente uma mistura de diclorometano e metanol (9,5:0,5) para a substância **12c** (80 mg, rendimento: 80%), e para a substância **8a** (22 mg, rendimento: 73%) foi utilizada uma mistura de hexano e AcOEt (2:3).

Figura 24. Reação de hidrogenação catalítica das substâncias **8** e **12**.

3.5 Ensaios de atividade biológica

3.5.1 Atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica dos extratos brutos e das substâncias isoladas foram realizados em colaboração com o Instituto de Botânica de São Paulo, sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young. As amostras foram ensaiadas contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Ambas as espécies foram selecionadas por produzirem uma grande quantidade de esporos e apresentarem crescimento uniforme em condições de cultura *in vitro*.

Uma avaliação qualitativa do potencial fungitóxico foi realizada com os extratos brutos das espécies em estudo através da metodologia de bioautografia (Homans; Fuchs, 1970). Este ensaio consiste na observação da ação inibitória de extratos e substâncias antifúngicas sobre esporos de fungos utilizados para revelação das placas cromatográficas.

Para a realização dos experimentos com os extratos brutos, as amostras (400 μ g) foram aplicadas em placas comerciais de sílica PF₂₅₄ (MERCK) sob suporte de

alumínio e eluídas com fase móvel adequada para a separação cromatográfica de cada extrato. Após a evaporação completa do solvente as placas foram aspergidas com uma solução contendo glicose, sais e os esporos dos fungos reveladores, e em seguida incubadas a 25°C, em câmara escura por 48 horas. Após o tempo de incubação pôde-se observar o crescimento do fungo na superfície da placa, sendo que nas regiões onde são encontradas substâncias com atividade antifúngica não há crescimento do fungo, sendo observados os halos de inibição (Figura 25).

Figura 25. Diagrama ilustrativo da bioautografia dos extratos brutos.

Após a purificação dos metabólitos secundários dos extratos, foram realizados ensaios para determinação do limite de detecção da atividade, através da variação da concentração da amostra aplicada na placa. Os resultados foram comparados com a atividade de substâncias antifúngicas padrão, como a nistatina.

As substâncias puras foram dissolvidas em 10µl de MeOH nas quantidades 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg e aplicadas em uma placa cromatográfica de alumínio

revestida com sílica PF_{254} (Merck). As placas foram incubadas nas mesmas condições realizadas com os extratos brutos (Figura 26).

Figura 26. Diagrama ilustrativo da bioautografia das substâncias puras.

3.5.2 Atividade antitumoral

O ensaio de atividade antitumoral foi realizado pelo CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância – Unicamp) através da colaboração com o farmacêutico Gilberto Carlos Franchi Junior. As amostras foram testadas contra doze linhagens de células leucêmicas *in vitro* (**Tabela 6**).

Tabela 6. Linhagens de células leucêmicas testadas.

Linhagem de célula	
K562, HL60, NB4	Leucemia mielóide
P39	Síndrome mielodisplásica (SMD)
NAMALWA, DAUDI, RAMOS	Linfoma de Burkitt
JURKAT, MOUT4	Leucemia linfoblástica aguda T
U937	Linfoma histiocítico
NALM6, B15	Leucemia linfoblástica aguda B

Neste ensaio as células neoplásicas foram distribuídas em uma placa com 96 poços (100 µL células/poço contendo meio RPMI 1640 (Sigma R6504) suplementando com 10% de soro fetal bovino (Gibco 16000-044), 1% de penicilina

(10,000 IU / ml) e 10mg/ml de estreptomicina (15,070 Gibco). A placa contendo as células foi mantida em estufa umidificada a 97% com temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação, as substâncias a serem testadas foram dissolvidas em 0,1 % de DMSO nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 e 0,00001 µg/ml e adicionadas às placas contendo as células.

Para a contagem das células, todas as etapas do ensaio foram automatizadas utilizando a estação de manuseamento líquido epMotion® 5070 (Eppendorf, Vaudaux, Schonenbuch, Switzerland). A placa foi incubada novamente por 48 horas a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT (Sigma M2128), utilizando um sal de tetrazólio (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio. A densidade óptica foi medida por espectrofotometria em 570 nm (Bio-Tek Power Wave XS). O valor de IC₅₀ foi determinado considerando os 50% da atividade em relação a células de controle. Neste ensaio foi utilizado como controle positivo o princípio ativo vincristina (Freshney, 1987).

3.6 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA foi realizada com os dados obtidos a partir dos extratos das plantas estudadas utilizando-se duas técnicas de espectrometria de massas, sendo uma por injeção direta e outra por CLAE-EM ambas com ionização por *electrospray*. Outra técnica utilizada na obtenção de dados para a PCA foi RMN de ¹H.

3.6.1 Preparo dos extratos

Extratos para injeção direta

Aproximadamente 500 mg de material fresco (**Tabela 7**) foram congelados em nitrogênio líquido, triturados e homogeneizados em um almofariz. Cerca de 20 mg do material triturado foram submetidos à extração utilizando 1 mL de solvente AcOEt, que em seguida foram agitados em um vortex por 30 s. A solução foi mantida em agitação em um agitador automático ($T = 25^{\circ} \text{C}$) por 48 horas seguida da centrifugação à temperatura ambiente por 10 min em uma rotação de 12000 rpm. O sobrenadante (200 μL) foi separado e seco. O extrato seco foi acondicionado em freezer à temperatura de -20°C até o momento das análises.

Tabela 7. Espécies de *Piper* analisadas por ESI-EM – infusão direta.

Espécie	Parte da planta	Código	Local de coleta
<i>Piper bowiei</i>	Folhas	K-364 F	São Paulo – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-484 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-842 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-842 G	Ubatuba – SP
<i>P.r caldense</i>	Frutos	K-842 Fr	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-842 S	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-951 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-951 G	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Frutos	K-951 Fr	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-951 S	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Caule	K-951C	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Raiz	K-951 R	Santa Tereza – ES
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-310 F	São Paulo – SP
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-1022 F	Cubatão – SP
<i>P. permucronatum</i>	Galhos	K-1022 G	Cubatão – SP
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-963 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-976 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-978 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-991 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-989 F	Carajás – PA

Preparo dos extratos para CLAE-EM e RMN de ^1H

Os extratos para CLAE-EM (**Tabela 8**) foram preparados em triplicata utilizando o mesmo procedimento realizado no preparo para análise por injeção direta.

Para os extratos de RMN de ^1H , aproximadamente 500 mg de material fresco foram congelados em nitrogênio líquido, triturados e homogeneizados em um almofariz. Cerca de 50 mg do material triturado foram transferidos para um tubo *ependorf* de 2 mL e submetido à extração utilizando uma mistura de 700 μL de solvente CHCl_3 , 350 μL de CH_3OH e 350 μL de H_2O . A mistura foi agitada em um vortex por 30 s e mantida em repouso por 20 min à temperatura ambiente, seguida de nova agitação no vortex por 30 s e centrifugada por 20 min a 12000 rpm.

Foram coletados 400 μL da fase hidroalcoólica e 200 μL da fase CHCl_3 , separadamente, e transferidos para um tubo *Eppendorf*. As soluções foram secas e acondicionadas à -20°C até o momento da análise.

Tabela 8. Espécies de *Piper* analisadas por CLAE-EM e RMN de ^1H .

Espécie	Código	Local coleta
<i>P. caldense</i>	K1209A	Ubatuba-SP
	K1209B	Ubatuba-SP
	K1209C	Ubatuba-SP
	K1569A	Cunha-AM
	K1569B	Cunha-AM
	K1581A	Cunha-AM
<i>P. permucronatum</i>	K1210A	Ubatuba-SP
	K1210B	Ubatuba-SP
	K1210C	Ubatuba-SP
	K1220A	Ubatuba-SP
	K1220B	Ubatuba-SP
<i>P. carniconectivum</i>	K1441A	Belterra-PA
	K1441B	Belterra-PA
	K1441C	Belterra-PA
	K1600A	Cunha-AM
	K1600B	Cunha-AM

3.6.2 Obtenção de dados

Análise por ESI-EM (Injeção direta)

As amostras secas foram dissolvidas em 1 mL de MeOH e filtradas com filtros de 0,45 µm. A análise por espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Quattro II triploquadrupolo (Micromass, Manchester, U.K.) com ionização por *electrospray* (ESI+) no modo positivo, voltagem do capilar 4,5 kV e do skimmer 70 V, o fluxo do gás nitrogênio de nebulização e de secagem foi de 250 e 30 L/h. O fluxo da fase móvel foi de 50 µL/min. As amostras foram analisadas por infusão direta e os dados processados pelo programa *Masslynx* (Micromass) versão 3.2.

Os dados dos espectros de massas foram convertidos ao formato ASCII através do programa *Masslynx* (Micromass) e exportados para o programa Excel (Microsoft) onde foi elaborada a matriz de dados. As variáveis selecionadas na matriz foram os valores de massas na faixa de m/z 100 a 650 Da obtidos para cada extrato.

Análise por CLAE-EM

As amostras secas foram dissolvidas em 1 mL de MeOH e filtradas com filtros de 0,45 µm. As análises de CLAE-EM foram realizadas no equipamento MicrOTOF-Q II (Bruker) acoplado à um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, composto por uma controladora CBM-20A, duas bombas LC-20AD, um detector UV-Vis (dois canais) SPD-20A, injetor automático SIL-20AC e forno de coluna CTO-20A. Foi utilizada coluna de fase reversa C-18 da marca Phenomenex (Luna C-18 150 x 4,6 mm – 5µ) acoplada a uma pré-coluna de material equivalente.

Os eluentes utilizados foram A: H₂O-0.1% ácido fórmico e B: ACN-0,1% ácido fórmico. O método cromatográfico utilizado nesta análise foi 0.01-1.00 min – 20%B; 1.00-15.00 min – 20 a 100%; 15.00-18.00 min – 100%; 18.00-20.00 min – 100-20%, fluxo 0,2 mL.min⁻¹.

Os espectros de massas obtidos foram transformados em netCDF e transportados para uma matriz em duas dimensões através do algoritmo disponibilizado na aplicação *web* XCMS Online (Tautenhahn et al., 2012). As variáveis selecionadas na matriz foram os valores de massas na faixa de *m/z* 100 a 1000 Da obtidos para cada extrato em função do tempo de retenção e intensidade dos picos.

Análise por RMN de ¹H

Para cada amostra, o extrato seco correspondente a fase hidroalcoólica (CH₃OH+H₂O) foi dissolvido em 600 µL de D₂O e transferido para um tubo de RMN de 5 mm e o extrato seco correspondente a fase orgânica (CHCl₃) foi dissolvido em 600 µL de CDCl₃ e transferido para um tubo de RMN de 5 mm. Os experimentos de RMN de ¹H foram realizados no equipamento de RMN de 500 MHz, modelo Avance III da Bruker Biospin (Alemanha).

Os parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ¹H foram os seguintes: sequência de pulso de 90° (zg), TD= 64K, DS= 4, NS= 64, SW= 12,9836 ppm (ou 6493,506 Hz), AQ= 5,046s, FID res= 0,099083Hz, O1= 3125,81 Hz (ou O1P= 6,250 ppm), d1= 2s. O processamento do espectro foi realizado através da transformada de Fourier utilizando multiplicação exponencial, SI= 64K e lb=0,3 Hz. O espectro transformado teve sua fase e linha de base ajustadas, e foi referenciado através do

sinal do TMS em 0,00 ppm, para amostra em CDCl_3 e através do sinal do TPS em 0,00 ppm, para amostra em D_2O .

Por fim, foi realizada a integração do espectro em faixas de 0,02 ppm (10,00 Hz). Os valores dos deslocamentos químicos médios das faixas integradas e suas integrais foram transferidos para uma matriz elaborada no programa Excel (Microsoft).

3.6.3 Processamento dos dados

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Msc. Harold H. Fokoue (LPQN-IQUSP). As matrizes de dados obtidas para cada uma das técnicas analíticas foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) utilizando-se o software *The Unscrambler* (versão 9.5, CAMO Process AS, Noruega), no qual foi realizada a normalização pela média. Os dados foram visualizados (gráficos de *scores* e *loadings*) de acordo com as componentes principais mais representativas.

Para análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi utilizado o programa Statistica (versão 11, StatSoft, EUA). Os cálculos foram realizados utilizando distância Euclidiana e o método de Ward.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise dos componentes principais (PCA) dos extratos

Com a finalidade de obter uma visão geral das similaridades entre as espécies de *Piper* estudadas, os extratos foram preparados e analisados por EM. Os espectros obtidos foram então submetidos ao PCA.

As quatro espécies analisadas, que possuem frutos pendentes e globosos, *P. caldense*, *P. bowiei*, *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* foram coletadas em diferentes regiões (**Tabela 9**).

Tabela 9. Espécies de *Piper* analisadas por ESI-EM- Infusão direta.

Espécie	Parte da planta	Código	Local de coleta
<i>P. bowiei</i>	Folhas	K-364 F	São Paulo – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-484 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-842 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-842 G	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Frutos	K-842 Fr	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-842 S	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-951 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-951 G	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Frutos	K-951 Fr	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-951 S	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Caule	K-951C	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Raiz	K-951 R	Santa Tereza – ES
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-310 F	São Paulo – SP
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-1022 F	Cubatão – SP
<i>P. permucronatum</i>	Galhos	K-1022 G	Cubatão – SP
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-963 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-976 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-978 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-991 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-989 F	Carajás – PA

Na análise das amostras por PCA (Figura 27) os componentes principais (PC1 e PC2) representam aproximadamente 61% dos dados. No gráfico *scores* foi possível observar a formação de três agrupamentos distintos, de acordo com a

espécie, sendo o grupo principal (I) constituído majoritariamente pelos extratos de *P. caldense*, além dos galhos de *P. permucronatum* (K1022G). No grupo II observou-se a presença dos extratos de *P. carniconnectivum*, e no grupo III as amostras de *P. bowiei* e *P. permucronatum* foram agrupadas, mas não foram diferenciadas entre si.

Figura 27. Gráfico de scores de (PC1 v PC2) com base nos dados de ESIMS dos extratos de espécies de *Piper* (61% de variância).

No gráfico de *loadings* (Figura 28) foi possível observar os valores das variáveis que tiveram uma maior contribuição para a discriminação observada no gráfico de scores, nesta análise os valores das variáveis são os valores de *m/z* obtidos na análise de EM-ESI. Nas amostras de *P. carniconnectivum* a variável de *m/z* 335 Da foi a que apresentou maior influência no agrupamento das amostras desta espécie, enquanto para *P. bowiei* e *P. permucronatum* a maior contribuição foi da variável *m/z* 287 Da. No grupo principal, constituído pelas amostras de *P. caldense*, observou-se a presença de inúmeras variáveis na faixa de *m/z* 450 Da.

Com os resultados observados, nesta análise preliminar, iniciou-se o estudo fitoquímico das espécies de *Piper* com a finalidade de caracterizar os valores observados no gráfico de *loadings* através do isolamento e determinação estrutural dos principais constituintes químicos.

4.2 Substâncias isoladas e identificadas

O estudo fitoquímico realizado com as espécies *Piper caldense*, *P. bowiei*, *P. permucronatum*, *P. carniconnectivum* levou ao isolamento e identificação de 13 substâncias (**Tabela 10**).

Tabela 10. Substâncias isoladas e identificadas de *P. caldense*, *P. bowiei*, *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* (continua).

Cromenos
<i>P. bowiei</i> (K-364 Folhas)																							
	(1) 2,2-dimetil-2 <i>H</i> -1-benzopiran-6-carboxilato de metila																							
	<i>P. bowiei</i> (K-364 Folhas)																							
	(2) 8-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -1-benzopiran-6-carboxilato de metila																							
Flavonas
<i>P. permucronatum</i> (K-1210 Folhas)																							
	(3) 7-O-metil-luteolina																							
	2-(3',4'-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-metoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona																							
	<i>P. caldense</i> (K-951 Folhas)																							
	(4) velutina																							
5-hidroxi-2-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-7-metoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona																								
<table><tr><th></th><th>R¹</th><th>R²</th><th>R³</th><th>R⁴</th></tr><tr><td>(3)</td><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OH</td><td>OH</td></tr><tr><td>(4)</td><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td><td>OH</td></tr><tr><td>(5)</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td><td>H</td><td>OH</td></tr></table>		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	(3)	H	OCH ₃	OH	OH	(4)	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	(5)	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	<i>P. carniconnectivum</i> (K-1600 Folhas)			
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴																			
	(3)	H	OCH ₃	OH	OH																			
(4)	H	OCH ₃	OCH ₃	OH																				
(5)	OCH ₃	OCH ₃	H	OH																				
(5) Scrofuleina																								
5-hidroxi-2-(4'-hidroxifenil)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona																								

Tabela 10. Substâncias isoladas e identificadas de *P. caldense*, *P. bowiei*, *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* (continuação).

Flavanonas
<i>P. bowiei</i> (K-364 Folhas)														
	(6) di-hidrowogonina (2 <i>S</i>)-2,3-di-hidro-5,7-di-hidroxi-2-fenil-8-metoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona														
	<i>P. permucronatum</i> (K-1210 Folhas)														
	(7) sakuranetina (2 <i>S</i>)-2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(4'-hidroxifenil)-7-metoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona														
	<table> <tr> <th></th><th>R¹</th><th>R²</th><th>R³</th></tr> <tr> <td>(6)</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>H</td></tr> <tr> <td>(7)</td><td>OCH₃</td><td>H</td><td>OH</td></tr> </table>				R ¹	R ²	R ³	(6)	OH	OCH ₃	H	(7)	OCH ₃	H	OH
	R ¹	R ²	R ³												
(6)	OH	OCH ₃	H												
(7)	OCH ₃	H	OH												
Protoflavonoides
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1441- Folhas)														
	(8) (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>)-2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxo-2'-cicloexen-1'-il)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona
Obtido através da hidrogenação de 8														
	(8a) (2 <i>S</i>)-2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxocicloexil)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1441- Folhas)														
	(9) (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>)-2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1',2'-dihidroxi-4'-oxocicloexil)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1600- Folhas)														
	(10) 5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxo-2',5'-cicloexadien-1'-il)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1600- Folhas)														
	(11) 5-hidroxi-2-(1',4'-di-hidroxi-4'-oxo-2',5'-cicloexadien-1'-il)-6,7-dimetoxi-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-ona														

Tabela 10. Substâncias isoladas e identificadas de *P. caldense*, *P. bowiei*, *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* (conclusão).

Derivados de ácidos benzoicos prenilados	
<i>P. caldense</i> (K-951 Folhas)
<p>(12) R¹=R²= H (12a) R¹=R²= CH₃ (12b) R¹= H R²= COCH₃</p>	<p>(12) ácido-3-[(2'<i>E</i>,6'<i>E</i>,10'<i>E</i>)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1'-il]-4,5-di-hidroxibenzoico, ácido caldensínico</p> <hr/> <p>Obtido através da reação de metilação de 12.</p> <hr/> <p>(12a) 3,4-dimetoxi-5-[11'-metoxycarbonil-3',7',15'-trimetilexadeca-2'<i>E</i>, 6'<i>E</i>, 10'<i>E</i>,14'-tetraen-1'-il]-benzoato de metila</p> <hr/> <p>Obtido através da reação de acetilação de 12.</p> <hr/> <p>(12b) ácido-3,4-bis-(acetiloxi)-5-[(2'<i>E</i>,6'<i>E</i>,10'<i>E</i>)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1-il] benzoico</p>
<p>Obtido através da reação de hidrogenação de 12.</p> <hr/> <p>(12c) Ácido benzenododecanoico-5-carboxi-2,3-di-hidroxi-ε,1-dimetil-α-(4-metilpentila)</p>
<i>P. carniconnectivum</i> (K-1441 Folhas)
<p>(13) R (13a) CH₃</p>	<p>(13) ácido-3-[(2'<i>E</i>,6'<i>E</i>,10'<i>Z</i>)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1'-il]-4-metoxibenzoico</p> <hr/> <p>Obtido através da reação de metilação de 13.</p> <hr/> <p>(13a) 4-metoxi-3-[11'-metoxycarbonil-3',7',15'-trimetilexadeca-2'<i>E</i>, 6'<i>E</i>, 10'<i>Z</i>,14'-tetraen-1'-il]-benzoato de metila</p>

4.3 Identificação estrutural do cromenos 1 e 2

As substâncias **1** e **2** (Figura 29) foram identificadas em pequena quantidade como um óleo a partir do extrato das folhas de *P. bowiei* (K-364 FA), suas estruturas foram determinadas a partir dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e por EM-IE.

Figura 29. Estruturas das substâncias **1** e **2**.

No espectro de massas de **1** obtido por EM-IE (Figura 30) observou-se um pico em m/z 218 Da correspondente a $[\text{M}]^{+*}$, compatível com a fórmula molecular proposta $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3$. O íon fragmentário com m/z 203 Da (pico base) indicou a perda de um grupo metílico. Para a substância **2** observou-se um pico em m/z 234 Da, correspondente a $[\text{M}]^{+*}$, sendo que a diferença de 16 Da observada, corresponde à presença de um grupo hidroxila na posição 8, sendo proposta a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

Figura 30. Espectro de massas (IE) das substâncias a) **1** e b) **2**.

No espectro de RMN de ^1H de **1** (200 MHz, CDCl_3) (Figura 31) observou-se a presença de um duplo duplete em δ 7,75 (J 2,2 e 8,4 Hz, 1H, H-7) e dois dubletos em δ 7,61 (2,2 Hz, 1H, H-5) e δ 6,70 (8,4 Hz, 1H, H-8) indicativos de um sistema aromático 1,2,4-trissubstituído. Observou-se também dois dupletos em δ 6,27 (9,9 Hz, 1H, H-4) e δ 5,58 (9,9 Hz, 1H, H-3) referentes aos hidrogênios da dupla ligação nas posições 3 e 4. O espectro apresentou ainda um simpleto em δ 3,80 (3H, H-12) correspondente aos hidrogênios da metoxila do grupo metílico e um simpleto em δ 1,38 (6H, H-9 e H-10) referente às metilas C-10 e C-11.

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

No espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Figura 32) observou-se sinais correspondentes a 12 átomos de carbono, sendo um correspondente a carbonila do grupo éster em δ 166,9 (C-9), um carbono metoxílico em δ 51,8, seis carbonos referentes ao anel aromático em δ 120,6 (C-4a), 131,1 (C-5), 122,5 (C-6), 131,0 (C-

7), 116,1 (C-8) e 157,1 (C-8a). Observou-se também dois carbonos olefínicos em 121,7 (C-3) e 128,1 (C-4), um carbono carbinólico em 77,4 (C-2) e dois carbonos referentes às metilas em 28,3 (C-10 e C-11).

Os dados de RMN e EM foram comparados com a literatura possibilitando a identificação da substância **1** como sendo o cromeno 2,2-dimetil-2*H*-1-benzopirano-6-carboxilato de metila (Diaz; Arias; Joseph-Nathan, 1987) (**Tabela 11**).

A ocorrência deste cromeno foi também relatada nas espécies *Piper aduncum* (Orjala, Jimmy et al., 1993), *P. dilatatum* (Terreaux; Hostettmann; Kurt, 1998), *P. hostmannianum* (Diaz; Arias; Joseph-Nathan, 1987), *P. mollicomum* (Lago et al., 2007) e *P. taboganum* (Roussis; Ampofo; Wiemer, 1990).

Figura 32. Espectro de RMN de ¹³C de **1** (50 MHz, CDCl₃).

No espectro de RMN de ¹H da substância **2** (Acetona-*d*₆, 500 MHz) (Figura 33) foram observados dois dupletos em δ 7,35 (1H, J 2,0) e δ 7,27 (1H, J 2,0)

indicativos de um sistema aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído com a presença de um grupo hidroxílico no carbono 8, diferenciando de **1** pela hidroxilação observada em C-8.

Os dados de RMN e EM de **2** foram comparados com a literatura levando à sua identificação como sendo o cromeno 8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-carboxilato de metila (Orjala, Jimmy et al., 1993) (**Tabela 11**).

A ocorrência deste cromeno foi também relatada nas espécies *Piper aduncum* (Orjala, Jimmy et al., 1993), *P. hostmannianum* (Lago et al., 2009) e *P. mollicomum* (Lago et al., 2007).

Figura 33. Espectro de RMN de ¹H de **2** (500 MHz, Acetona -d₆).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **1** e RMN de ^1H de **2**.

Posição	1				2	
	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H lit}^b$	$^{13}\text{C lit}^b$	$^1\text{H}^c$	$^1\text{H lit}^d$
2	-	77,4	-	77,2	-	-
3	5,58 (1H, d, 9,9)	121,7	5,66 (1H, d, 9,0)	121,5	5,81 (1H, d, 10)	5,66 (1H, d, 9,9)
4	6,27 (1H, d, 9,9)	128,1	6,40 (1H, d, 9,0)	127,9	6,46 (1H, d, 10)	6,35 (1H, d, 9,9)
4a	-	120,6	-	120,5	-	-
5	7,61 (1H, d, 2,2)	131,1	7,70 (1H, d, 2,0)	130,9	7,27 (1H, d, 2,0)	7,33 (1H, d, 1,8)
6	-	122,5	-	122,4	-	-
7	7,75 (1H, dd, 2,2 e 8,4)	131,0	7,85 (1H, dd, 2,0 e 7,5)	130,8	7,35 (1H, d, 2,0)	7,48 (1H, d, 1,8)
8	6,70 (1H, d, 8,4)	116,1	6,82 (1H, d, 7,5)	115,9	-	-
8a	-	157,1	-	156,9	-	-
9	-	166,9	-	166,6	-	-
10	1,38 (6H, s)	28,3	1,45 (6H, s)	28,3	1,45 (6H, s)	1,49 (6H, s)
11	1,38 (6H, s)	28,3	1,45 (6H, s)	28,3	1,45 (6H, s)	1,49 (6H, s)
OCH₃	3,80 (3H, s)	51,8	3,87 (3H, s)	51,7	3,82 (3H, s)	3,88 (3H, s)

^a CDCl₃, 200 e 50 MHz; ^b CDCl₃, 90 e 25,2 MHz (Diaz et al., 1987); ^c Acetona-*d*₆, 500 MHz; ^d CDCl₃, 300 MHz (Orjala, Jimmy et al., 1993), δ em ppm; J em Hz.

4.4 Identificação estrutural das flavonas 3, 4 e 5

As flavonas **3**, **4** e **5** (Figura 34) isoladas de *P. permucronatum*, *P. caldense* e *P. carniconectivum*, respectivamente, foram identificadas através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

Figura 34. Estruturas das substâncias **3**, **4** e **5**.

As fórmulas moleculares de **3**, **4** e **5** foram estabelecidas de acordo com os espectros de massas de alta resolução obtidos por EM-ESI.

Substância 3

Para a substância **3** (Figura 35), isolada de *P. permucronatum*, observou-se um pico em m/z 301,0723 Da no espectro de massas de alta resolução (Figura 36), compatível com a fórmula molecular proposta $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ (valor calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$: 301,0712 Da).

Figura 35. Estrutura da substância **3**.

Figura 36. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da substância **3**.

Na análise do espectro de RMN de ^1H de **3** observou-se sinais correspondentes a dez hidrogênios. O simpleto em δ 12,98 (1H, OH-5) foi atribuído a um hidrogênio de hidroxila quelatada. Observou-se um simpleto em δ 3,93 (3H) correspondente a um grupo metoxilíco ligado ao carbono C-7 do anel aromático (Figura 37).

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H de **3** (Acetona- d_6 , 500 MHz).

Foram observados também um duplo duplete em δ 7,50 (2,2 e 8,5 Hz, 1H, H-6') e dois dupletos em δ 7,52 (2,2 Hz, 1H, H-2') e 7,01 (8,5 Hz, 1H, H-5') indicativos de um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído, atribuídos aos hidrogênios do anel B da flavona. Os dupletos observados em δ 6,68 (2,3 Hz, 1H, H-8) e 6,32 (2,3 Hz, 1H, H-6) são indicativos de um sistema aromático 1,2,3,5-tetrassubstituído, e caracterizam o anel A da flavona. O simpleto observado em δ 6,61 (1H) corresponde ao hidrogênio olefínico H-3 do anel C.

Os dados de **3** de RMN de ^1H e ^{13}C (**Tabela 12**) foram comparados aos da literatura levando à sua identificação como sendo a flavona 2-(3',4'-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-metoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, também conhecida como 7-O-metil-luteolina (Ahmad et al., 2000). Este é o primeiro relato desta flavona em uma espécie de *Piper*.

Substância 4

Para a substância **4** (Figura 38), isolada de *P. caldense*, observou-se um pico em m/z 315,0863 Da, no espectro de massas de alta resolução (Figura 39), compatível com a fórmula molecular proposta $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (valor calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$: 315,0869 Da).

Figura 38. Estrutura da substância **4**.

Figura 39. Espectro de massas de alta resolução de **4** (ESI-TOF).

A flavona **4** apresentou a mesma substituição observada no anel A de **3**, um sistema aromático 1,2,3,5-tetrassubstituído com dois dupletos referentes aos hidrogênios meta em δ 6,49 (2,3 Hz, 1H, H-8) e 6,37 (2,3 Hz, 1H, H-6) (Figura 40).

O anel B apresentou sinais indicativos de um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído assim como observado em **3**, no entanto, com uma metoxila em C-3'. Foram observados um duplo duplete em δ 7,48 (2,1 e 8,4 Hz, 1H, H-6') e dois dupletos em δ 7,33 (2,1 Hz, 1H, H-2') e δ 7,04 (8,4 Hz, 1H, H-5'). O simpleto observado em δ 6,57 (1H) corresponde ao hidrogênio da olefínico H-3.

Figura 40. Espectro de RMN de ^1H de **4** (500 MHz, CDCl_3).

As posições das metoxilas foram determinadas através do espectro de HMBC, no qual foi possível observar as correlações dos hidrogênios em δ 3,89 com C-7, assim como os hidrogênios H-6 e H-8. Os hidrogênios da segunda metoxila em δ 4,01 se correlacionam com C-3' assim como H-5' e H-2' (Figura 41).

Figura 41. Correlações HMBC selecionadas de **4**.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **4** (**Tabela 11**). foram comparados aos da literatura levando à sua identificação como sendo a flavona hidroxil-2-(4'-hidroxil-3'-metoxifenil)-7-metoxil-4H-1-benzopiran-4-ona, também conhecida como velutina (Jensen et al., 1994). A ocorrência desta flavona em *Piper* foi relatada em *P. clarkii* (Jensen et al., 1994), *P. porphyrophyllum* (Rajudin et al., 2010) e *P. umbellata* (Baldoqui et al., 2009).

Substância 5

Para a substância **5** (Figura 42), isolada de *P. carniconnectivum*, observou-se um pico em m/z 315,0869 Da, no espectro de massas de alta resolução (Figura 43), compatível com a fórmula molecular proposta $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (valor calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$: 315,0869 Da).

Figura 42. Estrutura da substância **5**.

Figura 43. Espectro de massas de alta resolução da substância **5** (ESI-TOF).

A substância **5** apresentou uma substituição diferente de **3** e **4** no anel A, sendo um sistema aromático pentassubstituído com o simpleto em δ 6,86 referente a H-8. No anel B observou-se a presença de apenas um substituinte, uma hidroxila na posição C-4'. Os sinais dos hidrogênios simétricos do anel B foram observados em δ 7,03 (d, 9,0 Hz, 2H, H-3' e H-5') e 7,97 (d, 9,0 Hz, 2H, H-2' e H-6') (Figura 44).

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de **5** (500 MHz, Acetona- d_6).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **5** (**Tabela 12**) foram comparados aos da literatura levando à sua identificação como sendo a flavona 5-hidroxi-2-(4'-hidroxifenil)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, conhecida também como scrofuleina (Rao; Kingston; Spittler, 1970). Este é o primeiro relato da ocorrência desta flavona em *Piper*.

As atribuições dos deslocamentos químicos das flavonas **3**, **4** e **5** foram realizadas de acordo com os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC (**Tabela 12**).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **3**, **4** e **5** (500 e 125 MHz).

<div> </div>						
Posição	^1H *	^{13}C *	^1H **	^{13}C **	^1H *	^{13}C *
2	-	165,5	-	164,1	-	165,9
3	6,61 (s, 1H)	104,5	6,57 (s, 1H)	104,5	6,69 (s, 1H)	103,6
4	-	183,3	-	182,4	-	184,0
4 a	-	106,1	-	105,5	-	106,9
5	-	163,2	-	162,2	-	154,5
6	6,32 (d, 2,3, 1H)	98,8	6,37 (d, 2,3, 1H)	98,1	-	134,0
7	-	166,7	-	165,5	-	160,6
8	6,68 (d, 2,3, 1H)	93,9	6,49 (d, 2,3, 1H)	92,7	6,86 (s, 1H)	91,7
8 a	-	158,8	-	157,7	-	154,5
1'	-	123,8	-	123,4	-	123,7
2'	7,52 (d, 2,2, 1H)	114,3	7,33 (d, 2,1, 1H)	108,3	7,97 (d, 9,0, 1H)	129,0
3'	-	146,6	-	146,9	7,03 (d, 9,0, 1H)	116,6
4'	-	150,3	-	149,3	-	162,5
5'	7,01 (d, 8,5, 1H)	116,8	7,04 (d, 8,4, 1H)	115,0	7,03 (d, 9,0, 1H)	116,5
6'	7,50 (dd, 2,2 e 8,5, 1H)	120,3	7,48 (dd, 2,1 e 8,4, 1H)	120,8	7,97 (d, 9,0, 1H)	129,0
-OCH ₃ -6	-	-	-	-	3,80 (s, 3H)	60,4
-OCH ₃ -7	3,93 (s, 3H)	56,5	3,89 (s, 3H)	55,8	3,99 (s, 3H)	56,7
-OCH ₃ -3'	-	-	4,01 (s, 3H)	56,2	-	-
-OH - 5	12,98 (s, 1H)	-	12,79 (s, 1H)	-	12,96 (s, 1H)	-
-OH - 4'	***	-	6,04 (s, 1H)	-	***	-

*- Acetona-*d*₆; **-CDCl₃; *** - não observado; *J* em Hertz; δ em ppm;

4.5 Identificação estrutural das flavanonas 6 e 7

As flavanonas **6** e **7** (Figura 45) isoladas de *P. bowiei* e *P. permucronatum*, respectivamente, foram identificadas através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

Figura 45. Estruturas das substâncias **6** e **7**.

No espectro de massas de ambas as flavanonas **6** e **7** (IE) (Figura 46) observou-se um pico em m/z 286 Da correspondente ao pico do íon molecular $[\text{M}]^{+}$, este pico associado aos dados de RMN de ^{13}C levou à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$.

Figura 46. Espectro de massas (IE) das substâncias a) **6** e b) **7**.

Apesar de ambas as substâncias apresentarem a mesma fórmula molecular, pôde-se observar as diferenças estruturais através dos espectros de RMN de ^1H .

Substância 6

Para a substância **6** (Figura 47), isolada de *P. bowiei*, no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (Figura 48), observou-se três duplos dupletos em δ 5,48 (3,0 e 12,9 Hz, 1H, H-2), 3,08 (12,9 e 17,2 Hz, 1H, H-3) e 2,86 (3,0 e 17,3Hz, 1H, H-3) correspondente ao sistema ABX do anel C de flavanonas.

Figura 47. Estrutura da substância **6**.

Observou-se um simpleto em δ 11,88 (OH-5) referente ao hidrogênio de hidroxila quelada, um simpleto em δ 3,88 (3H, OCH_3 -8) referente a uma metoxila no anel A. A presença de simpleto em 6,15 (1H, H-6) é indicativa de um sistema aromático pentassubstituído, e a presença de um multipeto na região de 7,39-7,49 (5H) sugere a presença de um anel B monossubstituído.

Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de **6** (CDCl_3 , 300 MHz).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** (Tabela 13). foram comparados aos da literatura sendo identificada como a flavanona (2S)-2,3-di-hidro-5,7-di-hidroxi-2-fenil-8-metoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, também conhecida como di-hidrowogonina (Vinciguerra et al., 2003). Este é o primeiro relato da ocorrência desta flavanona em *Piper*.

Substância 7

Para a substância **7** (Figura 49), isolada de *P. permucronatum*, o espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) (Figura 50) apresentou dois simpletos em δ 12,15 (1H) e δ 8,57 (1H) referentes às hidroxilas em C-5 e C-4', respectivamente. Observou-se um simpleto em δ 3,85 (3H) correspondente a uma metoxila e três duplos dupletos em δ 5,49 (3,1 e 12,9 Hz, 1H, H-2), 3,22 (12,9 e 17,2 Hz, 1H, H-3b) e 2,76 (3,1 e 17,2 Hz, 1H, H-3a) correspondentes ao sistema ABX do anel C.

Figura 49. Estrutura da substância **7**.

A presença de dois dupletos em δ 6,04 (2,2 Hz, 1H, H-6) e 6,06 (2,2 Hz, 1H, H-8), indicou a presença de um anel A 1,2,3,5-tetrassubstituído. Os dois dupletos em δ 6,91 (8,8 Hz, 2H, H-3' e H-5') e 7,40 (8,8 Hz, 2H, H-2' e H-6') são indicativos de um sistema aromático 1,4-dissubstituído do anel B da flavanona.

Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de **7** (Acetona- d_6 , 300 MHz).

Os valores de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **7** (**Tabela 13**) foram comparados com dados da literatura levando à sua identificação como sendo 2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(4'-hidroxifenil)-7-metoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, também denominada sakuranetina (Vasconcelos; Silva; Cavaleiro, 1998).

A ocorrência desta flavanona em *Piper* foi relatada em *P. crassinervium* (Lopes et al., 2008), *P. hostmannianum* (Portet et al., 2008), *P. lhotzkyanum* (Lago et al., 2007) e *P. marginatum* (Reigada et al., 2007).

As atribuições dos deslocamentos químicos das flavanonas **6** e **7** foram realizadas de acordo com os espectros de RMN de ^{13}C , HSQC e HMBC (**Tabela 13**).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** e **7** (300 e 75 MHz).

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>6</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>7</p> </div> </div>				
Posição	^1H *	^{13}C *	^1H **	^{13}C **
2	5,48 (dd, 3,0 e 12,9, 1H)	79,6	5,49 (dd, 3,1 e 12,9, 1H)	80,1
3	3,08 (dd, 12,9 e 17,2, 1H) 2,86 (dd, 3,0 e 17,2, 1H)	43,5	2,76 (dd, 3,1 e 17,2, 1H) 3,22 (dd, 12,9 e 17,2, 1H)	43,5
4	-	195,6	-	197,7
4 a	-	103,0	-	103,7
5	-	159,6	-	165,0
6	6,15 (s, 1H)	96,0	6,04 (d, 2,2, 1H)	95,5
7	-	157,9	-	168,9
8	-	127,6	6,06 (d, 2,2, 1H)	94,6
8 a	-	152,8	-	164,2
1'	-	138,3	-	130,7
2'	7,39-7,49 (m, 5H)	126,0	7,40 (d, 8,8, 1H)	129,6
3'	7,39-7,49 (m, 5H)	128,9	6,91 (d, 8,8, 1H)	116,2
4'	7,39-7,49 (m, 5H)	128,9	-	158,7
5'	7,39-7,49 (m, 5H)	128,9	6,91 (d, 8,8, 1H)	116,2
6'	7,39-7,49 (m, 5H)	126,0	7,40 (d, 8,8, 1H)	129,6
-OCH₃-8	3,88 (s, 3H)	61,6	-	-
-OH-5	11,88 (s, 1H)	-	12,15 (s, 1H)	-
-OH-7	6,53 (s, 1H)	-	-	-
-OCH₃-7	-	-	3,85 (s, 3H)	56,3
-OH - 4'	-	-	8,57(1H, s)	-

*-CDCl₃; *- Acetona-*d*6; *J* em Hertz; δ em ppm;

4.6 Identificação estrutural das substâncias 8, 9 e 8a

As substâncias **8** e **9** (Figura 51) foram isoladas a partir do extrato em AcOEt das folhas de *Piper carniconnectivum* (código: K-1441 FA) e tiveram suas estruturas determinadas a partir dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e EM.

Figura 51. Estruturas das substâncias **8** e **9**.

Substância 8

A fórmula molecular de **8** (Figura 52), isolada de *P. carniconnectivum*, foi estabelecida de acordo com o espectro de massas de alta resolução, no qual se observou um pico em m/z 335,1121 Da, correspondente ao íon quasimolecular $[\text{M} + \text{H}]^+$, levando à fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_7$ (valor calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$: 335,1131 Da). Foi observado também um íon correspondente ao aduto de sódio em m/z 357,0925 Da $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Figura 53). A principal fragmentação observada foi referente à perda do anel B, levando ao íon fragmentário m/z 223,0596 Da.

Figura 52. Estrutura da substância **8**.

Figura 53. Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-TOF) da substância **8**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 54) indicou a presença de grupos hidroxílicos devido à presença das bandas em 3389 e 3302 cm^{-1} provenientes da deformação axial de O-H e com a banda em 1310 cm^{-1} proveniente da deformação axial da ligação C-O de grupo fenol. Foram observadas também duas bandas de absorção em 1674 e 1637 cm^{-1} referentes à deformação axial de C=O das carbonilas. As bandas referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas da ligação C-H dos grupos metílicos e metilênicos foram observadas na região de 2950 cm^{-1} .

Figura 54. Espectro de absorção na região do infravermelho de **8** (KBr).

No espectro de RMN de ^1H de **8** (Figura 55, Figura 56 e Figura 57) observou-se sinais típicos de substância da classe das flavanonas, com um simpleto correspondente a um hidrogênio de um sistema aromático penta-substituído em δ 6,09 (1H, H-8), dois simpletos correspondente a grupos metoxilícos em δ 3,83 (3H, OCH_3 -7) e 3,89 (3H, OCH_3 -6) e um simpleto correspondente ao próton da hidroxila (OH-5) quelatado com a carbonila (C-4) em δ 11,76, com este conjunto de sinais foi possível determinar o anel A da flavanona.

Figura 55. Espectro de RMN de ^1H de **8** (500 MHz, CDCl_3).

Os sinais correspondentes ao anel C da flavanona foram caracterizados por três duplos dupletos com padrão de acoplamento ABX em δ 4,44 (2,8 e 13,8 Hz, 1H, H-2), 3,09 (13,8 e 17,2 Hz, 1H, H-3) e 2,68 (2,8 e 17,2, 1H, H-3). No entanto, os sinais de hidrogênios aromáticos esperados para o anel B não foram observados, estes foram substituídos por sinais correspondentes a quatro hidrogênios alifáticos em δ 2,08 (ddd, 4,8, 10,2 e 13,5 Hz, H-6'b), 2,16 (dddd, 1,4, 5,3, 6,3 e 13,5 Hz, H-6'a), 2,50 (dddd, 0,5, 4,8, 6,3 e 17,3 Hz, H-5'b) e 2,79 (ddd, 5,3, 10,2 e 17,3 Hz, H-

5'a) e dois prótons olefínicos típicos de uma cicloexenona em δ 6,11 (dd, 0,5 e 10,3 Hz, H-3') e 7,10 (dd, 1,4 e 10,3 Hz, H-2').

Figura 56. Espectro de RMN de ^1H de **8** (500 MHz, CDCl_3) (ampliação de 7,2 a 3,5 ppm).

Figura 57. Espectro de RMN de ^1H de **8** (500 MHz, CDCl_3) (ampliação 3,17 a 2,60 e de 2,60 a 2,00 ppm).

No espectro de RMN de ^{13}C de **8** (Figura 59 e Figura 60) foram observados sinais correspondentes a dezessete átomos de carbono. A atribuição dos deslocamentos químicos foi realizada de acordo com os espectro de RMN 2D, HSQC e HMBC (Figura 62). Foram observados dois sinais correspondentes a carbono carbonílico, sendo um deles atribuído ao carbono C-4 em δ 196,0 e o segundo em δ 198,3 foi atribuído ao carbono C-4' do anel B, sugerindo a presença de uma segunda carbonila no anel B não aromático. Esta modificação não usual no anel B foi confirmada com as correlações HMBC observadas entre H-2' com a carbonila em δ 198,3 (C-4'), um carbono carbinólico em 69,7 (C-1') além de um carbono alifático em 30,9 (C-6').

A conexão do anel B ao anel C foi confirmada com as correlações observadas entre H-2' e C-2, além de H-2 com C-2'. No experimento de HMBC observou-se também correlação entre H-3' com os carbonos em C-1' e C-5'. Ao carbono C-1' foi associado uma segunda hidroxila (Figura 58).

Figura 58. Principais correlações HMBC observadas nos anéis B e C de **8**.

Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C de **8** (125 MHz, CDCl_3).

Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C de **8** (125 MHz, CDCl_3) (ampliação de 210 a 120 ppm e de 105 a 30 ppm).

As posições dos grupos metoxilas foram estabelecidas de acordo com as correlações HMBC e NOESY observadas. No experimento de HMBC, o hidrogênio

H-8 (δ 6,09) apresentou correlações com os carbonos em δ 130,7 (C-7) e δ 160,8 (C-6) enquanto o hidrogênio da hidroxila em C-5 (δ 11,76) apresentou correlação com os carbonos em δ 160,8 (C-6), 102,9 (C-4a), 130,7 (C-7) e 154,9 (C-5).

Os hidrogênios de metoxila observados em δ 3,83 apresentaram correlação J³ com o carbono atribuído à C-6 e os hidrogênios da segunda metoxila em δ 3,90 apresentaram correlação com C-7. O experimento de NOESY (Figura 63) confirmou o posicionamento dos grupos metoxilícos devido à correlação NOE observada entre os hidrogênios metoxilícos de OCH₃-7 com o hidrogênio aromático H-8 (Figura 61).

Figura 61. Correlações NOE (----) e HMBC (—) observadas no anel A de **8**.

Figura 62. Mapa de contorno HMBC de **8** (ampliação nas regiões de δ 13,5 a 3,0 ppm em F2 e de δ 80,0 a 220,0 ppm em F1).

Figura 63. Mapa de contorno do experimento 2D NOESY de **8** (ampliação na região de 7,5 a 3,5 ppm em F1 e F2).

A substância **8** (Figura 64), de estrutura inédita, foi caracterizada como sendo a flavanona 2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxo-2'-cicloexen-1'-il)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopirano-4-ona, os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C e as correlações observadas nos experimentos de RMN 2D (Tabela 14).

Figura 64. Estrutura da substância **8**.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **8** (500 e 125 MHz, DMSO- d_6).

Posição	^1H	^{13}C	HMBC	COSY
2	4,44 (dd , 2,8, 13,8, 1H)	81,8	$\text{C}_4, \text{C}_{2'}$	$\text{H}_{3a}, \text{H}_{3b}$
3 -Ha	3,09 (dd, 13,8, 17,2, 1H)	35,8	$\text{C}_2, \text{C}_4, \text{C}_{1'}$	$\text{H}_2, \text{H}_{3b}$
3-Hb	2,68 (dd, 2,8, 17,2, 1H)		$\text{C}_{4a}, \text{C}_4,$	$\text{H}_2, \text{H}_{3a}$
4	-	196,0	-	-
4 a	-	102,8	-	-
5	-	154,8	-	-
6	-	130,7	-	-
7	-	160,8	-	-
8	6,09 (s, 1H)	91,5	$\text{C}_4, \text{C}_{4a}, \text{C}_6, \text{C}_7, \text{C}_{8a}$	-
8 a	-	157,8	-	-
1'	-	69,7	-	-
2'	7,10 (dd, 1,4 e 10,3, 1H)	147,7	$\text{C}_2, \text{C}_{1'}, \text{C}_{4'} \text{ e } \text{C}_{6'}$	$\text{H}_{3'}$
3'	6,11 (dd, 0,5 e 10,3, 1H)	130,3	$\text{C}_{1'} \text{ e } \text{C}_{5'}$	$\text{H}_{2'}$
4'	-	198,3	-	-
5'-Ha	2,79 (ddd, 5,3, 10,2, 17,3, 1H)	33,2	$\text{C}_{1'}, \text{C}_{4'}, \text{C}_{6'}$	$\text{H}_{6'b}, \text{H}_{5'b}$
5'-Hb	2,50 (dddd, 0,5, 4,8, 6,3, 17,3, 1H)		$\text{C}_{1'}, \text{C}_{4'}, \text{C}_{6'}$	$\text{H}_{6'a}, \text{H}_{5'a}$
6'-Ha	2,16 (dddd, 1,4, 5,3, 6,3,13,5, 1H)	30,9	$\text{C}_2, \text{C}_{1'}, \text{C}_{2'}, \text{C}_{4'}, \text{C}_{5'}$	$\text{H}_{6'b}, \text{H}_{5'b}$
6'-Hb	2,08 (ddd, 4,8, 10,2, 13,5, 1H)		$\text{C}_2, \text{C}_{1'}, \text{C}_{2'}, \text{C}_{4'}, \text{C}_{5'}$	$\text{H}_{6'a}, \text{H}_{5'a}$
-OCH3 -6	3,83 (s, 3H)	60,8	C_6	-
-OCH3-7	3,90 (s, 3H)	56,2	C_7	-
-OH – 5	11,76 (s, 1H)	-	$\text{C}_4, \text{C}_{4a}, \text{C}_5, \text{C}_6 \text{ e } \text{C}_7$	-
-OH – 1'	2,4 (s, 1H)	-	-	-

J em Hertz; δ em ppm;

Substância 9

A fórmula molecular da substância **9** (Figura 65), isolada de *P. carniconnectivum*, foi estabelecida como $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_8$ baseada no espectro de HRESI-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 353,1236, calcd. 353,1236) (Figura 66) e dados de RMN.

Figura 65. Estrutura da substância **9**.

Figura 66. Espectro de massas de alta resolução de **9** (ESI-TOF).

O espectro de absorção na região do infravermelho de **9** (Figura 67) apresentou bandas de absorção em frequências semelhantes às observadas para **8**, sendo possível sugerir novamente a presença de grupos hidroxílicos devido à presença das bandas em 3380 e 3309 cm^{-1} proveniente da deformação axial de O-H e com a banda em 1296 cm^{-1} proveniente da deformação axial da ligação C-O de grupo fenol. Foram observadas também bandas de absorção em 1717, 1644 e 1632 cm^{-1} referentes à deformação axial de C=O dos grupos carbonílicos. As bandas referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas da ligação C-H dos grupos metílicos e metilênicos foram observadas na região entre 2969 e 2829 cm^{-1} .

Figura 67. Espectro de absorção na região do Infravermelho de **9** (KBr).

De acordo com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , a substância **9** apresentou um padrão de substituição similar ao da substância **8**, com um simpleto em δ 6,15 (H-8) correspondente a um hidrogênio em um sistema aromático pentassubstituído, com duas metoxilas em δ 3,64 (s, 3H) e 3,84 (s, 3H) localizadas nas posições C-6 e C-7, respectivamente (Figura 68, Figura 69 e Figura 70).

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H de **9** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Três duplos dupletos com padrão de acoplamento ABX do anel C da flavanona foram observados em δ 4,62 (1H, J 13,7 e 3,0, H-2), 3,02 (1H, J 17,3 e 13,7, H-3a) e 2,57 (1H, J 17,3 e 3,0, H-3b). Os anéis A e C de **9** apresentaram a mesma substituição observada para **8**, no entanto os sinais correspondentes aos hidrogênios da dupla ligação da enona no anel B de **8** não apareceram no espectro de **9**.

Figura 69. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **9** de 6,5 a 1,5 ppm (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **9** de 3,2 a 1,5 ppm (DMSO- d_6 , 500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença de dois carbonos carbinólicos, sugerindo a hidratação da dupla ligação e mantendo a hidroxila observada em C-1' (72,2), foi observada também uma cetona em C-4' (210,2) (Figura 71).

Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C de **9** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

O experimento de HMBC (Figura 72 e Figura 74) mostrou uma correlação entre OH-1' com C-2' e de OH-2' com C-1', C-3' e C-4'. A conexão do anel B ao anel C foi também confirmada com as correlações HMBC observadas entre H-2 com C-1', C-2' e C-6'. As posições dos grupos metoxilícos foram confirmadas através do espectro de NOESY (Figura 72), no qual foi observada uma correlação entre H-8 e OCH₃-7.

Figura 72. Principais correlações NOE (----) e HMBC (—) observadas para **9**.

Figura 73. Mapa de contorno HSQC de **9** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

Figura 74. Mapa de contorno HMBC de **9** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) Figura 75. Mapa de contorno COSY de **9** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

A substância **9** (Figura 76), de estrutura inédita foi caracterizada como sendo a flavanona 2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1',2'-dihidroxi-4'-oxocicloexil)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, com base nos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C e nas correlações observadas nos experimentos de RMN 2D (Figura 73, Figura 74 e Figura 75) (Tabela 15).

Figura 76. Estrutura da substância **9**.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **9** (500 e 125 MHz, DMSO- d_6).

	^1H	^{13}C	HMBC	COSY
2	4,62 (dd, 3,0, 13,7, 1H)	79,2	C ₃ , C ₄ , C _{8a} , C _{1'} , C _{2'} , C _{6'}	H _{3a} , H _{3b}
3 -Ha	3,02 (dd, 13,7, 17,3, 1H)	35,5	C ₂ , C ₄ , C _{1'}	H _{3b}
3 -Hb	2,57 (dd, 3,0, 17,3, 1H)		C ₄ , C _{4a}	H _{3a}
4	-	198,0	-	-
4 a	-	102,3	-	-
5	-	153,9	-	-
6	-	129,4	-	-
7	-	160,5	-	-
8	6,15 (s, 1H)	91,8	C ₄ , C _{4a} , C ₅ , C ₆ , C ₇ , C _{8a}	-
8 a	-	158,5	-	-
1'	-	72,2	-	-
2'	4,42 (m, 1H)	69,8		H _{3'a} , H _{3'b}
3'Ha	2,16 (dt, 3,0, 14,5, 1H)	44,9	C _{1'} , C _{2'} , C _{4'} , C _{5'} , C _{6'}	H _{3'b} , H _{2'}
3'Hb	2,88 (dd, 3,3, 14,5, 1H)		C _{2'} , C _{4'} , C _{5'}	H _{3'a} , H _{2'}
4'	-	210,2	-	-
5'-Ha	2,04 (ddd, 2,0, 5,4, 14,1, 1H)	35,7	C _{1'} , C _{2'} , C _{3'} , C _{4'} , C _{6'}	H _{5'b} , H _{6'a} , H _{6'b}
5'-Hb	2,56 (td, 7,0, 14,1, 1H)		C _{1'} , C _{4'} , C _{6'}	H _{5'a} , H _{6'a} , H _{6'b}
6'-Ha	1,70 (ddd, 2,0, 7,0, 13,2, 1H)	27,3	C _{1'} , C _{2'} , C _{4'} , C _{5'}	H _{6'b} , H _{5'a} , H _{5'b}
6'-Hb	1,87 (td, 5,4, 13,2, 1H)		C _{2'} , C _{1'} , C _{4'} , C _{5'}	H _{6'a} , H _{5'a} , H _{5'b}
-OCH ₃ -6	3,64 (s, 3H)	60,0	C ₆	-
-OCH ₃ -7	3,84 (s, 3H)	56,2	C ₇	-
-OH – 5	11,92 (s, 1H)	-	C ₄ , C _{4a} , C ₅ , C ₆ , C ₇	-
-OH – 1'	5,32 (s, 1H)	-	C _{2'} , C _{6'}	-
-OH – 2'	5,31 (s, 1H)	-	C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}	-

J em Hertz; δ em ppm;

Configuração absoluta de **8** e **9**

As substâncias **8** e **9** foram dissolvidas em metanol na concentração 0,01 g/ml, o valor do ângulo de $[\alpha]_D$ medido foi +115,5° e +92°, respectivamente. O ângulo positivo medido significa que há um desvio da luz plano polarizada para a direita, indicando que tratam-se de substâncias dextrogiras.

As curvas de DC (dicroísmo circular) foram medidas para ambas as substâncias e os resultados foram comparados aos das curvas teóricas de DC calculadas por TDDFT (*Time-dependent density functional theory*). Para a substância **8** os cálculos foram realizados considerando todos os estereoisômeros possíveis: 2S,1'R; 2S,1'S; 2R,1'S e 2R,1'R. Após as etapas de análise conformacional apenas dois confôrmeros foram constatados na temperatura investigada: (2S,1'R)-**8** e (2S,1'S)-**8**.

A configuração pôde então ser determinada através da comparação entre os espectros de DC calculados e o experimental (Figura 78). Para (2S,1'R)-**8** foram observados EC (Efeito Cotton) positivo em ~325 nm e ~250 nm, e EC negativo em ~280 nm. Estes resultados foram consistentes com os dados experimentais. Para (2S,1'S)-**8** foram observados EC (Efeito Cotton) positivo em ~325 nm e EC negativo em ~280 nm e ~250 nm, sendo este último com sinal contrário ao observado experimentalmente. Essas observações permitiram determinar de forma inequívoca a configuração absoluta de (+)-**8** como sendo 2S, 1'R (Figura 77).

Figura 77. Estrutura da substância **8** com estereoquímica definida.

Figura 78. a) Espectro DC calculado para (2S,1'S)-**8**; b) Espectro DC experimental obtido para **8**; c) Espectro DC calculado para (2S,1'R)-**8**.

O espectro de DC obtido para a substância **9** (Figura 79) foi muito similar ao da substância (+)-**8** permitindo sugerir a configuração absoluta também como 2S,1'R, o que foi confirmado por cálculos de TDDFT. No entanto nestes cálculos não foi possível obter informações sobre a configuração absoluta do terceiro centro estereogênico em C-2'. Os espectros teóricos de ambos diastereômeros (2S,1'R,2'R)-**9** e (2S,1'R,2'S)-**9** apresentaram-se indistinguíveis, isto ocorreu principalmente devido ao fato de que nenhuma das transições do cromóforo principal benzoila nem do grupo carbonílico em C-4 terem sido suficientemente perturbadas pela introdução de um novo centro estereogênico (Figura 80).

Figura 79. Estrutura da substância **9** com estereoquímica definida.

Figura 80. a) Espectro DC calculado para (2S,1'S,2'S)-**9**; b) Espectro DC experimental obtido para **9**; c) Espectro DC calculado para (2S,1'R,2'R)-**9**.

Substância 8a

A substância **8a** (Figura 81) obtida através da reação hidrogenação da substância **8**, foi caracterizada a partir dos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HSQC, HMBC e por ESIMS.

Figura 81. Estrutura da substância **8a**.

No espectro de massas (ESI^+) de alta resolução da substância **8a** (Figura 82) observou-se um sinal em m/z 337,1286 Da correspondente ao íon quasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ e um sinal em m/z 359,1091 Da correspondente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_7$, esperada como produto da reação de hidrogenação de **2** (valor calculado: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 337,1287 Da e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 359,1107 Da).

Figura 82. Espectro de massas de alta resolução de **8a** (ESI-TOF).

No espectro de RMN de ^1H de **8a** (Figura 83 e Figura 84) os sinais de ressonância mais importantes para a confirmação da formação do produto são o

desaparecimento dos sinais olefínicos conjugados à carbonila do anel B (J 10 Hz) e o aparecimento de sinais metilênicos adicionais.

Além destes sinais foi observada no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 85) a presença de dois carbonos metilênicos adicionais. A atribuição dos sinais de RMN (**Tabela 16**) foi realizada através das correlações COSY, HSQC e HMBC, permitindo assim a determinação de **8a** como sendo 2,3-di-hidro-5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxocicloexil)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, de estrutura inédita.

Figura 83. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **8a**.

Figura 84. Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **8a** (500 MHz, CDCl₃) na região de 3,1 a 1,7 ppm.

Figura 85. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da substância **8a**.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **8a** (500 e 125 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C

2	4,28 (dd, 2,7 e 14,0 Hz, 1H)	83,0
3 -Ha	2,64 (dd, 2,7 e 17,0 Hz, 1H)	36,4
3-Hb	3,02 (dd, 14,0 e 17,0 Hz, 1H)	
4	-	196,3
4 a	-	102,9
5	-	157,9
6	-	130,7
7	-	160,9
8	6,06 (s, 1H)	91,4
8 a	-	154,9
1'	-	70,9
2'	2,80 (td, 6,1 e 14,0 Hz, 2H)	36,2
3'Ha	1,90 (td, 5,0 e 14,0 Hz, 1H)	33,7
3'Hb	2,43 (m, 1H)	
4'	-	210,7
5'-Ha	1,84 (td, 5,0 e 13,6, 1H)	32,0
5'-Hb	2,05 (td, 3,3 e 13,6, 1H)	
6'	2,38 (m, 2H)	36,1
-OCH₃-6	3,83 (s, 1H)	60,9
-OCH₃-7	3,90 (s, 1H)	56,3
-OH – 5	11,80 (s, 1H)	-

δ em ppm; J em Hz.

4.7 Identificação das substâncias 10 e 11

As substâncias **10** e **11** (Figura 86) foram isoladas e identificadas a partir da partição orgânica (CHCl₃) do extrato das folhas de *P. carniconnectivum* (código: K-1600 FC) e tiveram suas estruturas determinadas a partir dos dados de RMN de ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e EM.

Figura 86. Estruturas das substâncias **10** e **11**.

Substância 10

A fórmula molecular de **10** (Figura 87), isolada de *P. carniconnectivum*, foi estabelecida de acordo com o espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF), no qual se observou um pico em m/z 331,0820 Da correspondente ao íon quasimolecular $[M+H]^+$, levando à fórmula molecular C₁₇H₁₄O₇ (valor calculado para $[M+H]^+$: 331,0818 Da) (Figura 88).

Figura 87. Estrutura da substância **10**.

Figura 88. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de **10**.

No espectro de RMN de ^1H de **10** (Figura 89) observou-se sinais referentes a treze hidrogênios, sendo um simpleto em δ 12,30 (1H, OH-5) correspondente ao grupo hidroxila em C-5, dois simpletos em δ 3,92 (3H) e 3,88 (3H) referentes aos grupos metoxilícos em C-6 e C-7. Observou-se também um simpleto em δ 6,59 (1H) correspondente ao sinal do hidrogênio olefínico do anel C em C-3, e um simpleto em δ 6,33 referente ao hidrogênio aromático em C-8 (anel A). Os hidrogênios do anel B foram observados com dois dupletos e δ 6,92 e 6,40 com constante de acoplamento $J=9,9$ Hz e com integração para dois hidrogênios cada sinal, sugerindo a presença de um anel B não aromático, similar aos observados em **8** e **9**, mas agora com a presença de duas ligações duplas simétricas e conjugadas à uma carbonila.

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 90) (CDCl_3 , 125 MHz) observou-se 15 sinais correspondentes a 17 átomos de carbono, os quais foram atribuídos de acordo com os dados de HSQC e HMBC. Observou-se a presença de dois carbonos carbonílicos, sendo um correspondente a C-4 em δ 182,7 e o segundo em δ 184,9 referente ao C-4'. O sinal referente aos carbonos simétricos C-2' e C-6' foi observado em δ 145,8 e o dos carbonos C-3' e C-5' em δ 130,3. O carbono carbinólico em δ 69,8 corresponde à C-1'.

A substância **10**, de estrutura inédita, foi caracterizada como sendo a flavona 5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxo-2',5'-cicloexadien-1'-il)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopirano-4-ona.

Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 125 MHz).

Substância 11

A fórmula molecular de **11** (Figura 91), isolada de *P. carniconnectivum*, foi estabelecida de acordo com o espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) (Figura 92), no qual se observou um pico em m/z 333,0975 Da, correspondente ao íon quasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, levando à fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (valor calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 333,0975 Da).

Figura 91. Estrutura da substância **11**.

Figura 92. Espectro de massas de alta resolução de **11** (ESI-TOF).

A substância **11** apresentou sinais de RMN de ^1H (Figura 93) muito semelhantes aos de **10**, sendo os anéis A e C idênticos. No anel B, os duplos dupletos observados em δ 5,94 (1,8 e 10,1 Hz, 2H) e 6,23 (3,3 e 10,1 Hz, 2H) indicaram a presença de um anel B não aromático com duplas simétricas, no entanto, com presença de um hidrogênio adicional em δ 4,55 (m, 1H). Também foi observado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 94) um carbono carbinólico adicional em δ 62,5, com a ausência de uma segunda carbonila, como observado para **8**, **9** e **10**, na posição C-4' do anel B. Os sinais observados indicaram a presença de uma hidroxila adicional posicionada em C-4'. O simpleto correspondente ao hidrogênio olefínico H-3 foi observado em δ 6,51 e o correspondente ao hidrogênio aromático H-8 em 6,77. As metoxilas OCH_3 -6 e OCH_3 -7 foram observadas em δ 3,80 e 3,92, respectivamente.

A substância **11**, de estrutura inédita, foi caracterizada como sendo a flavona 5-hidroxi-2-(1',4'-dihidroxi-4'-oxo-2',5'-cicloexadien-1'-il)-6,7-dimetoxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona.

Figura 93. Espectro de RMN de ^1H de **11** (MeOD, 500 MHz).

Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (MeOD, 125 MHz)

Os valores de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **10** e **11** (Tabela 17) foram atribuídos de acordo com as correlações observadas nos experimentos de RMN 2D, HSQC e HMBC.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **10** e **11** (500 e 125 MHz).

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>10</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>11</p> </div> </div>				
Posição	^1H *	^{13}C *	^1H **	^{13}C **
2	-	166,2	-	172,9
3	6,59 (s, 1H)	107,4	6,77 (s, 1H)	106,7
4	-	182,7	-	184,7
4 a	-	106,2	-	106,7
5	-	153,0	-	155,3
6	-	132,7	-	133,7
7	-	159,4	-	160,8
8	6,33 (s, 1H)	91,1	6,51 (s, 1H)	92,5
8 a	-	153,5	-	153,6
1'	-	69,8	-	69,0
2'	6,92 (d, 9,9, 1H)	145,8	5,94 (dd, 1,8 e 10,1, 1H)	130,6
3'	6,40 (d, 9,9, 1H)	130,3	6,23 (dd, 3,3 e 10,1, 1H)	133,5
4'	-	184,9	4,55 (m, 1H)	62,5
5'	6,40 (d, 9,9, 1H)	130,3	6,23 (dd, 3,3 e 10,1, 1H)	133,5
6'	6,92 (d, 9,9, 1H)	145,8	5,94 (dd, 1,8 e 9,9, 1H)	130,6
-OCH ₃ -6	3,88 (s, 3H)	61,2	3,80 (s, 3H)	61,1
-OCH ₃ -7	3,92 (s, 3H)	56,7	3,92 (s, 3H)	57,0
-OH-5	12,30 (s, 1H)	-	***	-

*CDCl₃; * MeOD; *** não observado; δ em ppm; J em Hz.

4.8 Identificação das substâncias 12, 13 e derivados

As substâncias **12** e **13** (Figura 95) foram isoladas e identificadas a partir extrato das folhas de *P. caldense* e dos frutos de *P. carniconnectivum* (código: K-1441 FrA) e tiveram suas estruturas determinadas a partir dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e EM.

Figura 95. Estruturas das substâncias **12** e **13**.

Substância 12

A fórmula molecular de **12** (Figura 96), isolada de *P. caldense*, foi estabelecida de acordo com o espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) (Figura 97), no qual foi observado um pico em m/z 457,2596 Da, correspondente ao íon quasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, levando à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (valor calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 457,2590 Da).

Figura 96. Estrutura da substância **12**.

Figura 97. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de **12**.

O espectro de absorção na região do IV de **12** (Figura 98) indicou a presença de grupo hidroxila com a banda em 3380 cm^{-1} proveniente da deformação axial de O-H e com a banda em 1299 cm^{-1} proveniente da deformação axial da ligação C-O de grupo fenol. A banda de deformação axial de C=O de grupo carbonílico foi observada em 1682 cm^{-1} e a banda proveniente da deformação axial de C=C do anel aromático foi observada em 1602 cm^{-1} .

Figura 98. Espectro de absorção na região do infravermelho de **12**.

No espectro de RMN de ^1H de **12** (Figura 99 e Figura 100) (MeOD, 500 MHz) observou-se dois dupletos correspondentes a H-2 em δ 7,35 (J 2,0 Hz, 1H) e H-6 em δ 7,31 (J 2,0 Hz, 1H), sinais indicativos de um sistema aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído.

Foram observados na região de δ 1,75 a 1,60 ppm quatro dupletos correspondentes às metilas H-16' em δ 1,65 (1,4 Hz, 3H), H-17' em 1,72 (1,2 Hz, 3H), H-18' em 1,61 (1,2 Hz, 3H) e H-20' em 1,57 (1,4 Hz, 3H), cujas constantes de acoplamento correspondem ao acoplamento alílico a quatro ligações (J^4) com os hidrogênios H-2' (tq, 1,2 e 7,4 Hz, 1H), H-6' (tq, 1,2 e 7,4 Hz, 1H) e H-14' (tqt, 1,4 e 7,4 Hz, 1H). O hidrogênio alílico H-9' foi observado como um tripleto (J 7,5 Hz, 1H) devido ao acoplamento deste com o duplete H-8' (J 7,5 Hz, 2H), o deslocamento

químico e multiplicidade observados sugerem a oxidação da metila da unidade prenila correspondente a um grupo carboxílico.

O conjunto de sinais observados confirma a presença de um grupo geranil-geranila na cadeia lateral de um derivado de ácido benzoico.

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H de **12** (500 MHz, MeOD).

Figura 100. Espectro de RMN de ^1H de **12** (500 MHz, MeOD), ampliação de 5,38 a 5,05 ppm e de 1,76 a 1,53 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C de **12** (Figura 101 e Figura 102) apresentou sinais referentes a vinte e sete átomos de carbono. O anel aromático foi determinado como ácido 3-alkil-4,5-di-hidroxibenzoico, sendo os sinais em δ 122,4, 124,3, 129,2, 149,5, 146,6 e 115,2 atribuídos aos carbonos C-1 a C-6, respectivamente, e um carbono carboxílico em δ 170,9 ligado ao carbono C-1.

Os vinte carbonos restantes foram associados à unidade geranil-geranila com a presença de quatro metilas em δ 26,1 (C-16'), 16,3 (C-17'), 16,4 (C-18'), 17,9 (C-20'), um grupo carboxílico em δ 171,8 (C-19), oito carbonos olefínicos em δ 123,9 (C-2'), 137,1 (C-3'), 126,4 (C-6'), 135,3 (C-7'), 144,3 (C-10'), 133,3 (C-11'), 125,1 (C-14'), 131,1 (C-15') e sete carbonos metilênicos em δ 29,1 (C-1'), 40,9 (C-4'), 27,7 (C-5'), 39,8 (C-8'), 28,0 (C-9'), 28,6 (C-12') e 28,9 (C-13').

Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (125 MHz, MeOD).

Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (125 MHz, MeOD), ampliação de 42 a 15 ppm e de 175 a 113 ppm.

Figura 103. Mapa de contorno de HSQC de **12** (125 MHz, MeOD), ampliação 8,0 a 1,2 ppm em F1 e de 160,0 a 0,0 ppm em F2.

As posições dos substituintes no ácido benzoico e do grupo carboxílico na cadeia lateral foram definidas através da análise dos dados de HSQC (Figura 103), HMBC (Figura 103, Figura 104, Figura 105 e Figura 106) e COSY (Figura 107).

As correlações observadas no experimento de HMBC entre H-2 com C-4, C-6, C-1' e COOH e entre H-6 com C-4, C-5 e COOH permitiram confirmar o posicionamento das hidroxilas nos carbonos C-4 e do grupo carboxílico no C-1 do anel aromático.

As correlações HMBC permitiram também definir a posição do segundo grupo carboxílico no C-19' devido às correlações observadas entre H-10' com C-8', C-9', C-11', C-12' e C-19', H-12' com C-11', C-14' e C-19', H-16' com C-14' e C-20' e de H-20' com C-14', C-15' e C-16' (Figura 104).

Figura 104. Correlações HMBC selecionadas para a substância **12**.

Figura 105. Ampliação do mapa de contorno HMBC de **12** (de δ 4,85 a 7,70 ppm em F1 e de δ 10,0 a 190,0 ppm em F2)

Figura 106. Ampliação do mapa de contorno HMBC de **12** (de δ 3,50 a 1,40 ppm em F1 e de δ 10,0 a 180,0 ppm em F2).

Para determinar as configurações das duplas foram realizados os experimentos de COSY (Figura 107) e NOESY (Figura 109). Através das correlações observadas no COSY foi possível confirmar as posições das duplas ligações.

As configurações das duplas ligações foram determinadas como *E* através do experimento NOESY. As correlações observadas entre os hidrogênios H-1' e H-5' com os hidrogênios da metila H-17', e do hidrogênio olefínico H-2' com H-4', são possíveis apenas com a configuração *E* da dupla. Do mesmo modo que as correlações entre H-5' e H-9' com os hidrogênios da metila H-18' e dos hidrogênios olefínicos H-6' e H-10' com H-8', determinam as duplas ligações com as configurações 6'*E* e 10'*E*.

Figura 107. Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY de **12** (500 MHz, MeOD).

O experimento de NOESY de **12** (Figura 108) permitiu também determinar as posições das metilas H-16' e H-20', através da correlação NOE observada entre o hidrogênio olefínico H-14' com o hidrogênio da metila H-16'.

Figura 108. Correlações NOE observadas para **12**.

Figura 109. Mapa de contorno ^1H - ^1H NOESY de **12** (500 MHz, MeOD).

Os dados de RMN de **12** (Tabela 18), de estrutura inédita, foram comparados aos da literatura para substâncias similares, confirmando a identificação de **12** como o ácido-3-[(2'*E*,6'*E*,10'*E*)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1'-il]-4,5-di-hidroxibenzoico, de estrutura inédita, denominado ácido caldensínico (Freitas, 2009).

Substância 13

A fórmula molecular de **13** (Figura 110), isolada de *P. carniconnectivum*, foi estabelecida de acordo com o espectro de massas obtido por HR-ESI-TOF (Figura 111), no qual foi observado um pico em m/z 453,2647 Da, correspondente ao íon quasimolecular $[M+H]^+$, levando à fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_5$ (valor calculado para $[M+H]^+$: 453,2641 Da).

Figura 110. Estrutura da substância **13**.

Figura 111. Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-TOF) de **13**.

A substância **13**, também um derivado de ácido benzoico prenilado, apresentou sinais de RMN de 1H referentes a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído, sendo um duplo duplete em δ 7,95 (2,1 e 8,5 Hz, 1H) e dois dupletos, um em 6,86 (8,5, 1H) e outro em 7,88 (2,1, 1H) (Figura 112).

Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 113 e Figura 114) indicaram novamente a presença de um substituinte geranil-geranila em C-3, com a presença de quatro metilas em δ 15,8 (C-18'), 16,1 (C-17'), 17,7 (C-20') e 25,6 (C-16') e dois ácidos carboxílicos em 172,4 (COOH) e 173,8 (C-19).

Diferentemente de **12**, foi observada a presença de uma metoxila em δ 55,5 como substituinte na posição C-4. As posições dos ácidos carboxílicos e da metoxila foram determinadas através dos espectros de HSQC, HMBC e COSY.

Figura 112. Espectro de RMN de ^1H de **13** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (125 MHz, CDCl_3).

Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (125 MHz, CDCl_3) (Ampliação).

As configurações das duplas ligações foram determinadas através dos experimentos COSY (Figura 116) e NOESY (Figura 117). As correlações NOE

observadas entre os hidrogênios H-1' e H-5' com os hidrogênios da metila H-17', e do hidrogênio olefínico H-2' com H-4', são possíveis apenas com a configuração *E* da dupla. Assim como as correlações observadas entre H-5' e H-9' com os hidrogênios da metila H-18' e dos hidrogênios olefínicos H-6' e H-10' com H-8', determinam dupla ligação com configuração 6'*E*, e diferentemente do observado para a substância **12**, em **13** observou-se a correlação entre os hidrogênios H-10' e H-12', possível apenas com configuração da dupla sendo 10'*Z* (Figura 115).

O experimento de NOESY de **13** permitiu também determinar as posições das metilas H-16' e H-20', através da correlação NOE observada entre o hidrogênio olefínico H-14' com os hidrogênios da metila H-16' e dos hidrogênios H-13' com os da metila H-20'.

Figura 115. Correlações NOE observadas para **13**.

Os dados de RMN de **13** (**Tabela 18**), de estrutura inédita, foram comparados aos da literatura para substâncias similares, confirmando sua identificação como o ácido-3-[(2'*E*,6'*E*,10'*Z*)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1'-il]-4-metoxibenzoico.

Figura 116. Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY de **13** (500 MHz, MeOD).

Figura 117. Mapa de contorno ^1H - ^1H NOESY de **13** (500 MHz, MeOD).

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **12** e **13** (500 e 125 MHz).

Posição	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	122,4	-	121,1
2	7,35 (d, 2,0, 1H)	124,3	7,88 (d, 2,1, 1H)	131,3
3	-	129,2	-	130,5
4	-	149,5	-	161,8
5	-	145,6	6,86 (d, 8,5, 1H)	109,5
6	7,31 (d, 2,0, 1H)	115,2	7,95 (dd, 8,5 e 2,1, 1H)	130,2
1'	3,31 (d, 7,4, 2H)	29,1	3,33 (d, 7,3, 2H)	28,2
2'	5,34 (tq, 7,4 e 1,2, 1H)	123,9	5,31 (t, 7,5, 1H)	121,5
3'	-	137,1	-	136,7
4'	2,04-2,08 (m, 6H)	40,9	2,10 (m, 2H)	39,7
5'	2,14 (q, 7,1, 2H)	27,7	2,10 (m, 2H)	26,5
6'	5,18 (tq, 6,9 e 1,2, 1H)	126,4	5,16 (t, 6,0, 1H)	124,9
7'	-	135,3	-	134,2
8'	2,04-2,08 (m, 6H)	39,8	2,10 (m, 2H)	39,1
9'	2,24 (q, 7,5, 2H)	28,0	2,60 (q, 7,4, 2H)	28,1
10'	6,74 (t, 7,5, 1H)	144,3	6,01 (t, 7,4, 1H)	145,9
11'	-	133,3	-	130,5
12'	2,27 (t, 7,6, 2H)	28,6	2,25 (m, 2H)	34,5
13'	2,04-2,08 (m, 6H)	28,9	2,10 (m, 2H)	27,9
14'	5,11 (tsep, 7,4 e 1,4, 1H)	125,1	5,08 (tqt, 7,1 e 1,4, 1H)	123,5
15'	-	131,1	-	132,2
16'	1,65 (d, 1,4, 3H)	26,1	1,66 (sl, 3H)	25,6
17'	1,72 (d, 1,2, 3H)	16,3	1,71 (sl, 3H)	16,1
18'	1,61 (d, 1,2, 3H)	16,4	1,60 (sl, 3H)	15,8
19'	-	171,8	-	173,8
20'	1,57 (d, 1,4, 3H)	17,9	1,58 (sl, 3H)	17,7
COOH	-	170,9	-	172,4
OCH ₃ -4	-	-	3,88 (s, 3H)	55,5

δ em ppm; J em Hz.

Substâncias 12a, 12b e 12c e 13a

As substâncias **12a**, **12b** e **12c** obtidas através das reações de metilação, hidrogenação e acetilação da substância **12**, respectivamente, e **13a** obtida através da reação de metilação de **13** (Figura 118), foram caracterizadas a partir dos dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135°, HSQC, HMBC e por ESIMS.

Figura 118. Estruturas das substâncias **12a**, **12b**, **12c** e **13a**.

As fórmulas moleculares esperadas como produtos das reações realizadas foram confirmadas através do espectro de massas de alta resolução, sendo **12a** $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_6$ (m/z 513,3216 Da, calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 513,3216 Da), **12b** $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_8$ (m/z 563,2621 Da, calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 563,2621 Da), **12c** $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_6$ (m/z 487,3035 Da, calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 487,3036 Da) (Figura 119).

Figura 119. Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) de a) **12a**; b) **12b**; c) **12c**.

Para a substância **12a** (Figura 120), o espectro de RMN de ¹H (Figura 121 e Figura 122) (CDCl₃, 500 MHz) foram observados os simplesos referentes às metoxilas provenientes da reação de metilação em δ 3,72 (-OCH₃-20'), 3,86 (-OCH₃-4), 3,89 (-OCH₃-17') e 3,90 (-OCH₃-5).

Figura 120. Estrutura do derivado **12a**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 123) apresentou 31 sinais, sendo os sinais correspondentes aos carbonos carboxílicos de éster foram observados em δ 166,9 (C-17') e 168,4 (C-20'). Observou-se também os carbonos dos grupos metoxílicos em δ 51,5 (OCH_3 -20'), 52,0 (OCH_3 -5), 55,8 (OCH_3 -17') e 60,5 (OCH_3 -4).

Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C de **12a** (125 MHz, CDCl_3) ampliação de 171 a 108 ppm e de 62 a 9 ppm.

Os dados obtidos (**Tabela 19**) confirmam a obtenção da substância **12a** como 4,5-dimetoxi-3-[11'-metoxycarbonil-3',7',15' trimetilexadeca 2'E, 6'E, 10'E tetraen-1'-il] benzoato de metila.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) obtidos para a substância **12a**.

Posição	^1H (J em Hz)	^{13}C	HMBC
1	-	125,3	-
2	7,51 (d, 2,0, 1H)	123,7	C_4 , C_6 , $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{17'}$
3	-	135,5	-
4	-	151,0	-
5	-	152,4	-
6	7,45 (d, 2,0, 1H)	111,2	C_2 , C_4 , $\text{C}_{17'}$
1'	3,37 (d, 7,2, 2H)	28,5	C_2 , C_3 , C_4 , $\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{4'}$, $\text{C}_{18'}$
2'	5,27 (t, 7,2, 1H)	122,3	$\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{4'}$, $\text{C}_{18'}$
3'	-	136,2	-
4'	2,02-2,13 (m, 8H)	39,6	$\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$, $\text{C}_{18'}$
5'	2,02-2,13 (m, 8H)	26,6	$\text{C}_{4'}$, $\text{C}_{6'}$, $\text{C}_{7'}$
6'	5,11-5,16 (m, 2H)	124,9	$\text{C}_{5'}$, $\text{C}_{8'}$, $\text{C}_{19'}$
7'	-	133,9	-
8'	2,02-2,13 (m, 8H)	38,5	$\text{C}_{10'}$
9'	2,24 (q, 7,5, 2H)	27,3	$\text{C}_{7'}$, $\text{C}_{8'}$, $\text{C}_{10'}$, $\text{C}_{11'}$
10'	6,71 (t, 7,5, 1H)	142,6	$\text{C}_{8'}$, $\text{C}_{9'}$, $\text{C}_{11'}$, $\text{C}_{20'}$
11'	-	131,7	-
12'	2,30 (t, 7,5, 2H)	27,0	$\text{C}_{10'}$, $\text{C}_{11'}$, $\text{C}_{13'}$, $\text{C}_{14'}$
13'	2,02-2,13 (m, 8H)	27,7	$\text{C}_{12'}$, $\text{C}_{14'}$
14'	5,11-5,16 (m, 2H)	123,6	$\text{C}_{13'}$, $\text{C}_{16'}$, $\text{C}_{21'}$
15'	-	132,1	-
16'	1,58 (d, 1,1, 3H)	17,6	$\text{C}_{14'}$, $\text{C}_{15'}$, $\text{C}_{21'}$
17'	-	166,9	-
18'	1,74 (d, 1,3, 3H)	16,2	C_2 , C_3 , C_4
19'	1,60 (d, 1,2, 3H)	15,9	C_6 , C_7 , C_8
20'	-	168,4	-
21'	1,67 (d, 1,3, 3H)	25,7	$\text{C}_{13'}$, $\text{C}_{14'}$, $\text{C}_{15'}$, $\text{C}_{16'}$
-OCH ₃ -4	3,86 (s, 3H)	60,5	C_4
-OCH ₃ -5	3,90 (s, 3H)	52,0	C_5 , C_6
-OCH ₃ -17'	3,89 (s, 3H)	55,8	$\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{17'}$
-OCH ₃ -20'	3,72 (s, 3H)	51,5	$\text{C}_{11'}$, $\text{C}_{20'}$

δ em ppm; J em Hz.

Para a substância **12b** (Figura 124), no espectro de RMN de ^1H (Figura 125) (CDCl_3 , 300 MHz) foram observados quatro simpletos em δ 1,71, 1,66, 1,61 e 1,58 referentes às metilas ligadas em C sp^2 da cadeia lateral e dois simpletos em δ 2,31 e 2,28 provenientes do grupo acetílico, confirmando assim a obtenção do derivado acetilado da substância **12**.

Figura 124. Estrutura do derivado **12b**.

Figura 125. Espectro de RMN de ^1H de **12b** (MeOD , 300 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 126) apresentou 31 sinais (CDCl_3 , 75 MHz), sendo dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos dos ácidos

carboxílicos em δ 167,2 (COOH) e 170,2 (C-23') e dois correspondentes aos carbonos carbonílicos dos grupos ésteres em δ 168,5 (C-17') e 168,2 (C-19'). As atribuições foram realizadas pela análise dos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HSQC e HMBC (Tabela 20).

Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C de **12b** (MeOD, 75 MHz).

A substância **12b** foi caracterizada como ácido ácido-3,4-bis-(acetiloxi)-5-[(2'E,6'E,10'E)-11'-carboxi-3',7',15'-trimetil-2',6',10',14'-hexadecatetraen-1-il]-benzoico.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 300 e 75 MHz) obtidos para a substância **12b**.

Carbono	^1H	^{13}C	HMBC
1	-	129,1	-
2	7,69 (d, 1H, J 2,0)	122,6	C ₃ , C ₄ , C ₆ , -COOH
3	-	142,8	-
4	-	144,6	-
5	-	136,1	-
6	7,81(d, 1H, J 2,0)	128,3	C ₂ , C ₃ , C ₄ , C _{1'} , -COOH
1'	3,35 (sl, 2H)	28,4	C ₄ , C ₅ , C ₆ , C _{2'} , C _{3'}
2'	5,09-5,26 (m, 3H)	120,9	C _{1'} , C _{4'} , C _{21'}
3'	-	137,5	-
4'	2,05-2,25 (m, 12H)	39,4	*
5'	2,05-2,25 (m, 12H)	26,2	*
6'	5,09-5,26 (m, 3H)	124,8	C _{5'} , C _{8'} , C _{22'}
7'	-	134,2	-
8'	2,05-2,25 (m, 12H)	38,4	*
9'	2,05-2,25 (m, 12H)	27,2 ^a	*
10'	6,74 (t, 1H, J 7,5)	143,0	C _{16'} , C _{24'}
11'	-	131,8 ^b	-
12'	2,05-2,25 (m, 12H)	27,6 ^a	*
13'	2,05-2,25 (m, 12H)	26,7	*
14'	5,09-5,26 (m, 3H)	123,7	C _{16'} , C _{24'}
15'	-	131,9 ^b	-
16'	1,58 (s, 3H)	16,6	C _{14'} , C _{15'} , C _{24'}
17'	-	168,5	-
18'	2,28* (s, 3H)	19,1	C _{17'}
19'	-	168,2	-
20'	2,31* (s, 3H)	19,3	C _{19'}
21'	1,71 (s, 3H)	15,2	C _{2'} , C _{3'} , C _{4'}
22'	1,61 (s, 3H)	15,0	C _{6'} , C _{7'} , C _{8'}
23'	-	170,2	-
24'	1,66 (s, 3H)	24,8	C _{14'} , C _{15'} , C _{16'}
COOH	-	167,2	-

^a, ^b Os sinais podem estar invertidos, * as correlações estavam sobrepostas; δ em ppm; J em Hz.

Para a substância **12c** (Figura 127), no espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) (Figura 128) foram observados dois dupletos em δ 7,34 (J 2,0 Hz, 1H) e 7,31 (J 2,0 Hz, 1H) referentes aos hidrogênios do anel aromático, quatro sinais em δ 0,85, 0,86, 0,87 e 0,94 referentes as metilas ligadas em carbono sp^3 . Observou-se

também três multipletos em δ 2,56-2,68 (2H), 2,25-2,32 (1H) e 1,06-1,63 (27H) referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos da cadeia lateral. Não foram observados sinais referentes a hidrogênios ligados em carbono sp^2 , confirmando assim a obtenção do derivado peridrogenado da substância **12**.

Figura 127. Estrutura do derivado **12c**.

Figura 128. Espectro de RMN de 1H de **12c** (MeOD, 400 MHz)

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ ($CDCl_3$, 125 MHz) (Figura 129 e Figura 130) apresentou 27 sinais, sendo dois correspondentes aos carbonos carbonílicos do ácido carboxílico. As atribuições para os carbonos do anel aromático foram realizadas pela análise dos espectros de HSQC e HMBC (**Tabela 21**). A

substância **12c** foi caracterizada como sendo o ácido 3-(11-carboxi-3',7',15'-trimetilexadecil)-4,5-di-hidroxibenzoico.

Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C de **12c** (125 MHz, MeOD).

Figura 130. Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT 135° de **12c** (125 MHz, MeOD).

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 500 e 125 MHz) de **12c**.

Posição	^1H	^{13}C	HMBC
1	-	122,7	-
2	7,34 (sl)	124,5	$\text{C}_4, \text{C}_6, \text{C}_{1'}, \text{COOH}$
3	-	130,3	-
4	-	149,4	-
5	-	145,4	-
6	7,31 (sl)	115,0	$\text{C}_1, \text{C}_4, \text{C}_5, \text{COOH}$
1'	2,60 (m)	28,5	-
2'-15'	2,56-2,68 (2H), 2,25-2,32 (1H) e 1,06-1,63 (27H)	*	-
16'-18' e 20'	0,85-0,94 (12H)	*	-
19'	-	181,2	-
COOH	-	171,2	-

* sinais sobrepostos, δ em ppm; J em Hz.

Para a substância **13a** (

Figura 131), no espectro de RMN de ^1H (Figura 132) (CDCl_3 , 500 MHz) foram observados dois simpletos adicionais referentes às metoxilas provenientes da reação de metilação em δ 3,87 ($-\text{OCH}_3\text{-}17'$) e 3,72 ($-\text{OCH}_3\text{-}20'$).

Figura 131. Estrutura do derivado **13a**.

Figura 132. Espectro de RMN de ^1H de **13a** (CDCl_3 , 500 MHz)

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 133) apresentou 30 sinais, sendo os sinais correspondentes aos carbonos carboxílicos de éster foram observados em δ 167,1

(C-17') e 168,5 (C-20'). Observou-se também os carbonos dos grupos metoxílicos em δ 51,7 (OCH₃-20'), 51,1 (OCH₃-17') e 55,5 (OCH₃-4).

Figura 133. Espectro de RMN de ¹³C de **13a** (CDCl₃, 125 MHz)

Os dados obtidos (**Tabela 22**) confirmam a obtenção da substância **13a** como 4-metoxi-3-[11'-metoxycarbonil-3',7',15' trimetilexadeca-2'E, 6'E, 10'Z, 14'-tetraen-1'-il]-benzoato de metila, de estrutura inédita.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) obtidos para a substância **13a**.

Posição	^1H (J em Hz)	^{13}C
1	-	131,3
2	7,82 (d, 2,2, 1H)	130,7
3	-	130,1
4	-	161,1
5	6,85 (d, 8,5, 1H)	109,5
6	7,89 (d, 2,2 e 8,5, 1H)	129,3
1'	3,33 (d, 7,3, 2H)	28,2
2'	5,30 (tt, 1,3 e 7,3, 1H)	121,7
3'	-	136,6
4'	2,08 (m, 2H)	26,6
5'	2,08 (m, 2H)	39,7
6'	5,14 (m, 2H)	124,8
7'	-	134,2
8'	2,08 (m, 2H)	39,2
9'	2,24 (q, 7,5, 2H)	34,7
10'	5,84 (t, 7,5, 1H)	142,1
11'	-	122,1
12'	2,49 (t, 7,5, 2H)	28,0
13'	2,08 (m, 2H)	27,8
14'	5,08 (m, 2H)	123,5
15'	-	132,1
16'	1,59 (d, 1,1, 3H)	17,0
17'	-	167,1
18'	1,71 (d, 1,3, 3H)	16,1
19'	1,57 (d, 1,2, 3H)	15,8
20'	-	168,5
21'	1,67 (d, 1,3, 3H)	25,6
-OCH ₃ -4	3,88 (s, 3H)	55,5
-OCH ₃ -17'	3,87 (s, 3H)	51,7
-OCH ₃ -20'	3,72 (s, 3H)	51,1

δ em ppm; J em Hz.

4.9 Ensaios de atividade biológica

4.9.1 Avaliação da atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

Os extratos brutos das plantas foram avaliados qualitativamente quanto ao potencial antifúngico contra as espécies de fungo *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, através do ensaio de bioautografia. Este ensaio consiste na observação da ação inibitória de extratos ou substâncias potencialmente antifúngicas sobre esporos de fungos (Homans; Fuchs, 1970).

O ensaio foi realizado utilizando como reveladores os esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Estes fungos foram selecionados por produzirem uma grande quantidade de esporos e apresentarem crescimento uniforme em condições de cultura *in vitro*.

Algumas substâncias purificadas e descritas neste trabalho foram submetidas aos ensaios de atividade antifúngica quantitativa frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, de acordo com a disponibilidade de material obtido no isolamento.

A **Tabela 23** apresenta os resultados dos ensaios de limite de detecção das amostras testadas e do padrão nistatina utilizado como controle positivo. O ensaio de limite de detecção indica a quantidade mínima necessária de amostra que inibe o crescimento dos fungos em placas cromatográficas de gel de sílica.

Os resultados observados para o ácido caldensínico (**12**) e seus derivados (**12a-12c**) indicaram uma atividade moderada (Figura 134). As substâncias **12** e **12c** foram pouco ativas contra *C. cladosporioides* e apresentaram atividade moderada contra *C. sphaerospermum*, sendo necessárias 10 e 25 µg de amostra

respectivamente. As substâncias **12a** e **12c** também apresentaram atividade moderada com 5 e 25 µg de amostra respectivamente, contra o fungo *C. cladosporioides* e 10 e 25 µg contra *C. sphaerospermum*.

Os valores obtidos nesse ensaio de bioautografia indicam que os metabólitos **6** e **7** apresentaram maior potencial fungitóxico e a substância **8** apresentou atividade moderada frente aos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

De acordo com os valores observados a presença do anel B não aromático causa uma diminuição do potencial apresentado por **6** e **7**, que foram ativas com apenas 1 µg de amostra tanto contra *C. cladosporioides* quanto *C. sphaerospermum* enquanto que para **8** foram necessários 5 e 25 µg respectivamente.

Tabela 23. Atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Substâncias	Atividade antigúngica (µg)*	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
6	1	1
7	1	1
8	5	25
12	100	10
12a	5	10
12b	1	25
12c	25	5
Nistatina	1	1

*Quantidade mínima requerida para a inibição do crescimento do fungo na placa de CCDA.

Figura 134. Placas de CCDA reveladas com UV ($\lambda=254$ nm), esporos de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

4.9.2 Atividade antitumoral

Flavonoides são bastante conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e antifúngica e apresentam baixa toxicidade nos ensaios antitumorais. No entanto, a presença de anel B modificado (oxidado e reduzido) tem potencializado a atividade antitumoral de flavonoides, um exemplo é a substância protoapigenona (Figura 135) que apresentou uma potencial atividade antitumoral frente a diversas linhagens de células tumorais: câncer de fígado (Hep G2 e Hep 3B), câncer de pulmão (A459), câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), câncer de próstata e câncer de ovário (MDAH-2774 e SKOV3) (Chang; Su; et al., 2008; Chang; Wu; et al., 2008; Lin, A. S. et al., 2005).

Figura 135. Estrutura da substância protoapigenona.

As flavanonas **6**, **7** e **8** foram inicialmente submetidas ao ensaio de atividade antitumoral contra as linhagens células leucêmicas K562 e Nalm-6. Os princípios ativos Gleevec® e vincristina foram utilizados como controle positivo (Figura 136).

Figura 136. Substâncias submetidas ao ensaio de atividade antitumoral (**5**, **6** e **8**) e controles positivos (Gleevec e vincristina)

A tabela 24 apresenta os valores de IC_{50} obtidos no ensaio inicial contra as células leucêmicas K-562 e Nalm-6.

Tabela 24. Citotoxicidade de **5**, **6** e **8** para as linhagens de células leucêmicas K-562 e NALM-6.

Cell line	6 IC_{50} (μ M)	7 IC_{50} (μ M)	8 IC_{50} (μ M)	Gleevec IC_{50} (μ M)	Vincristina IC_{50} (μ M)
K-562	91	281	14	10	-
NALM-6	80	288	11	-	0,17

*linhagens: K-562 Leucemia mielóide, NALM-6 Leucemia linfoblástica aguda B.

De acordo com os valores observados a substância **8** apresentou um alto potencial antitumoral frente às linhagens de células avaliadas com valor de $IC_{50} = 14$ μ M muito semelhante ao Gleevec® utilizado no ensaio contra K562. Para Nalm16 o valor de IC_{50} apresentado pela substância **8** foi de 11 μ g/ml sendo 0,17 para o controle vincristina. Apesar de a vincristina apresentar um potencial muito maior que as amostras ensaiadas o valor observado para a substância **8** foi considerado

promissor, enquanto que as substâncias **6** e **7** apresentaram resultados insatisfatórios.

Esses resultados revelam que a presença do anel B não aromático da flavanona **8** tem um papel importante para a atividade antitumoral, resultando em uma atividade citotóxica significativa quando comparada com as de flavanonas com anel B aromático (**5** e **6**).

Após a obtenção desses resultados iniciais, e com o posterior isolamento e identificação da substância **9**, foi realizado um novo ensaio onde as substâncias **8**, **9** e o derivado **8a** (Figura 137) foram testados contra doze linhagens de células tumorais (Tabela 25).

Figura 137. Substâncias submetidas ao ensaio de atividade antitumoral (**8**, **8a** e **9**)

Tabela 25. Citotoxicidade de **8**, **8a** e **9** para as doze linhagens de células leucêmicas avaliadas.

Cell line	8 IC_{50} (μ M)	9 IC_{50} (μ M)	8a IC_{50} (μ M)	Vincristina IC_{50} (μ M)
K-562	12,8	234,0	> 300	0,164
HL-60	8,7	168,4	> 300	0,011
NB4	3,4	75,5	222,7	0,003
P39	10,9	205,0	> 300	0,01
Daudi	14,6	> 300	> 300	0,01
U-937	13,1	> 300	> 300	0,005
RAMOS	8,2	187,5	> 300	0,029
Jurkat	5,9	131,0	> 300	0,164
MOLT-4	11,4	214,8	> 300	0,009
B15	8,5	172,5	> 300	0,504
NAMALWA	9,6	214,6	> 300	0,077
NALM-6	8,9	197,0	> 300	1,707

K562, HL60, NB4: Leucemia mielóide; P39: Síndrome mielodisplásica (SMD); NAMALWA, DAUDI, RAMOS: Linfoma de Burkitt; JURKAT, MOUT4: Leucemia linfoblástica aguda T; U937: Linfoma histiocítico; NALM6, B15: Leucemia linfoblástica aguda B.

A substância **8** apresentou uma potencial atividade antileucêmica para as doze linhagens de células avaliadas, com valores de IC_{50} na faixa entre 3 a 15 μM . A substância **9** apresentou uma diminuição drástica na atividade com valores de IC_{50} na faixa de 200 μM com exceção de NB4 e Jurkat que foram de 75,5 e 131,0 μM , respectivamente. Já a substância **8a** mostrou-se totalmente inativa nas concentrações testadas, com valores de $IC_{50} > 300 \mu M$, exceto para NB4 que foi de 222,7 μM .

Os resultados observados revelam que em flavanonas a presença de anel B totalmente reduzido torna a substância inativa para a atividade antitumoral, sendo ativa apenas na presença de dupla ligação conjugada à carbonila.

Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura para substâncias similares, dentre os quais a protoapigenona vem apresentando resultados promissores contra inúmeras linhagens de células tumorais e a combinação dessas substâncias com as drogas atualmente utilizadas no tratamento do câncer tem apresentado um aumento no potencial citotóxico (Lin, A.-S. et al., 2005; Liu et al., 2011; Wei et al., 2011). Ensaios como este devem também serem realizados além de uma avaliação da atividade das protoflavanonas **10** e **11**.

Apesar da existência de drogas muito potentes no tratamento da leucemia, como Gleevec (Novartis) e Sprycel (Bristol-Myers Squibb), a busca por novas drogas continua sendo importante. Estes fármacos atuam na inibição da enzima tirosina quinase, que se apresenta hiperativa nas células brancas do sangue de pessoas com leucemia. No entanto essa enzima tem sido susceptível à mutação pelo uso desses medicamentos, tornando-os inativos para o tratamento. Recentemente o novo fármaco Ponatinib foi aprovado pela FDA (EUA, dezembro/2012) como uma

droga candidata para o tratamento de leucemia mielóide crônica e leucemia linfoblástica aguda (Dolgin, 2013).

4.10 Análises quimiométricas

O estudo fitoquímico das quatro espécies de *Piper* permitiu a identificação de seus metabólitos majoritários, sendo agora possível relacioná-los com o gráfico de scores do PCA obtido inicialmente para os espécimes analisados (**Tabela 26**) (Seção 4.1).

Tabela 26. Espécies de *Piper* analisadas por PCA.

Espécie	Parte da planta	Código	Local de coleta
<i>Piper bowiei</i>	Folhas	K-364 F	São Paulo – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-484 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-842 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-842 G	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Frutos	K-842 Fr	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-842 S	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Folhas	K-951 F	Ubatuba – SP
<i>P. caldense</i>	Galhos	K-951 G	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Frutos	K-951 Fr	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Sementes	K-951 S	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Caule	K-951C	Santa Tereza – ES
<i>P. caldense</i>	Raiz	K-951 R	Santa Tereza – ES
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-310 F	São Paulo – SP
<i>P. permucronatum</i>	Folhas	K-1022 F	Cubatão – SP
<i>P. permucronatum</i>	Galhos	K-1022 G	Cubatão – SP
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-963 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-976 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-978 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-991 F	Carajás – PA
<i>P. carniconnectivum</i>	Folhas	K-989 F	Carajás – PA

4.10.1 Espectrometria de massas com injeção direta

Para a realização desse estudo os extratos preparados foram analisados por injeção direta no espectrômetro de massas, e os espectros obtidos submetidos ao PCA.

No gráfico de *scores* (Figura 138) foi possível observar o agrupamento das amostras de acordo com a espécie, baseado principalmente na similaridade da composição química. A análise dos gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 139) juntamente com os resultados obtidos no estudo fitoquímico das plantas demonstrou que nas amostras de *P. carniconnectivum* (grupo II) a variável de m/z 335 Da foi a qual apresentou maior influência no agrupamento das amostras desta espécie, esta variável corresponde ao metabólito majoritário identificado nos extratos das folhas, a substância **8**, uma protoflavanona.

Nos extratos das folhas de *P. bowiei* e *P. permucronatum* (grupo III) a maior contribuição foi da variável m/z 287 Da, correspondente as flavanonas dihidrowogonina (**6**) e sakuranetina (**7**), identificadas como constituintes majoritários nos respectivos extratos. Em função da presença de flavanonas isoméricas a análise de PCA não permitiu a discriminação entre essas duas espécies.

No grupo I, constituído pelas amostras de *P. caldense*, observou-se a presença de inúmeras variáveis na faixa de m/z 450 Da, sendo o metabólito majoritário desses extratos o ácido caldensínico (**12**) de massa molecular 456 Da, há indícios da presença de outros derivados de ácidos benzoicos prenilados no extrato na faixa de m/z 400-470 Da (Espectros de EM-ESI nos apêndices A, B e C).

Figura 138. Gráfico de scores (PC1 v PC2) (61% de variância) com base nos dados de ESIMS, por injeção direta, dos extratos de espécies de *Piper*.

Figura 139. Gráfico de loadings (PC1 v PC2) (61% de variância) com base nos dados de ESIMS, por injeção direta, dos extratos de espécies de *Piper*.

Este estudo preliminar permitiu obter uma visão geral das similaridades entre as espécies e serviu como base para os experimentos realizados a seguir com o emprego das técnicas analíticas de CLAE-EM e RMN de ^1H , seguidos das análises dos dados por PCA e HCA.

4.10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Visando complementar os estudos quimiométricos os extratos de *P. caldense*, *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* foram preparados em triplicada e analisados por CLAE-EM (**Tabela 27**).

Tabela 27. Espécies de *Piper* analisadas por CLAE-EM e RMN de ^1H .

Espécie	Código	Local coleta
<i>P. caldense</i>	K1209A	Ubatuba-SP
	K1209B	Ubatuba-SP
	K1209C	Ubatuba-SP
	K1569A	Cunha-SP
	K1569B	Cunha-SP
	K1581A	Cunha-SP
<i>P. permucronatum</i>	K1210A	Ubatuba-SP
	K1210B	Ubatuba-SP
	K1210C	Ubatuba-SP
	K1220A	Ubatuba-SP
	K1220B	Ubatuba-SP
<i>P. carniconnectivum</i>	K1441A	Belterra-PA
	K1441B	Belterra-PA
	K1441C	Belterra-PA
	K1600A	Manaus-AM
	K1600B	Manaus-AM

A seguir são mostrados alguns cromatogramas de CLAE obtidos com o detector UV em 254 nm (Figura 140). Neles são possíveis observar que os perfis cromatográficos são diferentes em cada uma das plantas.

Figura 140. Cromatogramas CLAE-UV de alguns extratos.

Os cromatogramas de íons obtidos nas análises de CLAE foram convertidos em ASCII e os dados submetidos às análises pelos métodos quimiométricos de PCA e HCA.

Na análise de PCA foi possível observar três agrupamentos no gráfico de scores (Figura 141). No grupo I estão reunidas todas as amostras de *P. permucronatum* (K1210A, B e C e K1220A e B), que segundo o gráfico de *loadings* (Figura 142) esta separação foi influenciada pela presença dos íons com m/z 287 e 167 Da, ambos observados no tempo de retenção de 13,1 min. O íon m/z 287 Da corresponde à massa molecular da sakuranetina (**6**), identificada como metabólito majoritário nos extratos de *P. permucronatum*, enquanto que o íon m/z 167 Da corresponde ao íon proveniente de uma fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder no anel C da sakuranetina (**6**).

No grupo II estão as amostras de *P. carniconnectivum* (K-1441A e C), espécie na qual foram identificadas as protoflavanonas **8** e **9**. De acordo com o gráfico de

loadings, a discriminação foi influenciada pela presença do íon com m/z 223 Da no tempo de retenção 7,9 min, que corresponde provavelmente ao íon fragmentário proveniente da fragmentação das protoflavanonas **8** e **9** com a saída do anel B não aromático, conforme constatado durante a elucidação estrutural realizada anteriormente para as substâncias puras.

No grupo III foram agrupadas as amostras de *P. caldense* (K-1209A, B e C), *P. carniconectivum* (K-1600A e B, K-1441B) além de K-1569A e B e K-1581A. Neste caso o PCA não possibilitou a discriminação entre as espécies, e não foi possível encontrar uma correlação entre o agrupamento observado e os valores observados no gráfico de *loadings* com os metabólitos secundários identificados.

Figura 141. Gráfico de scores (PC1 v PC2) (82% de variância) com base nos dados de CLAE-EM, dos extratos de espécies de *Piper*.

Foram observados cinco agrupamentos, sendo o grupo I composto por todas as amostras de *P. permucronatum* e o grupo II pelas amostras de *P. carniconnectivum* coletadas em Belterra-PA (K-1441A e C). No entanto o espécime K-1441B (grupo IV) coletado na mesma região foi agrupado próximo às amostras de *P. caldense* coletadas em Cunha-SP (K-1569 e K-1581). As amostras de *P. carniconnectivum* coletadas em Manaus-AM (K-1600) foram também agrupadas separadamente no grupo III, apesar de apresentarem em sua composição química metabólitos secundários de mesmo esqueleto raro identificados nas espécies de *P.*

carniconnectivum coletadas em Belterra-PA do grupo II (K-1441A e C). As espécies de *P. caldense* foram agrupadas no grupo III.

Figura 143. Gráfico de HCA para análise de CLAE-EM.

4.10.3 Ressonância magnética nuclear da fase orgânica

Os espectros de RMN de ^1H da fase orgânica CHCl_3 dos extratos obtidos foram integrados e os dados submetidos aos métodos quimiométricos de PCA e HCA. Alguns espectros são apresentados no APÊNDICE B, nos quais é possível observar a presença de muitos sinais na região dos aromáticos, os quais podem ser correlacionados com os metabólitos secundários identificados no estudo fitoquímico.

A análise do PCA foi realizada em diferentes faixas dos espectros e os resultados não permitiram observar uma boa distinção entre as espécies, sendo

apresentados a seguir os resultados obtidos para a região de 8,0 ppm a 5,0 ppm, correspondente aos hidrogênios olefínicos e aromáticos.

No gráfico de scores (Figura 144), os grupos I e II agruparam diferentes espécies, sendo identificadas no grupo I as amostras de *P. permucronatum* e *P. carniconnectivum* (K-1600A e B), que segundo o gráfico de loadings (Figura 145) essa separação foi influenciada pelas variáveis 7,33, 6,89, 6,87, 6,07 e 6,05, correspondentes aos sinais dos hidrogênios aromáticos das flavonas e flavanonas presentes nestas amostras. No grupo II, estão agrupadas as amostras de *P. caldense*, *P. carniconnectivum* (K-1441B) e *P. permucronatum* (K-1569 e K-1581). De acordo com o gráfico de loadings, esse agrupamento foi influenciado pelas variáveis na região de 5,1 ppm, região correspondente as duplas ligações presentes nas unidades de prenila dos metabólitos secundários identificados em *P. caldense*. O grupo III, que ficou bem diferenciado das demais amostras apresentou as amostras K-1441A e C de *P. carniconnectivum*, planta na qual foram identificadas duas novas protoflavanonas, e a variável que teve maior influência neste agrupamento foi 6,09 ppm.

Figura 144. Gráfico de scores (PC1 v PC2) (66% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de *Piper*.

Figura 145. Gráfico de *loadings* (82% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos de espécies de *Piper*.

Devido ao resultado apresentado não ser satisfatório para a distinção entre as espécies, foi realizado um novo cálculo removendo da matriz inicial as amostras de *P. carniconnectivum* K1441A e C. No gráfico de scores (Figura 146) obtido foi possível verificar uma melhor discriminação entre as espécies analisadas, onde foram observados quatro agrupamentos. No grupo I observou-se o agrupamento das

amostras de *P. caldense*. No grupo II, encontram-se apenas as amostras de *P. carniconnectivum* K-1441B, no grupo II, *P. carniconnectivum* K1600A e B e no grupo IV, *P. permucronatum*.

No gráfico de *loadings* (Figura 147) pode-se verificar que as variáveis responsáveis pela separação observada são as mesmas observadas na análise anterior, sendo possível observar apenas as influências dos sinais na região de 5,1 ppm para o agrupamento I formado pelas amostras de *P. caldense*, e os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos das flavonas de *P. permucronatum* que contribuem para a formação do agrupamento IV.

Figura 146. Gráfico de scores (PC1 v PC2) (71% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de *Piper*.

Figura 147. Gráfico de *loadings* (PC1 v PC2) (71% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (CDCl_3), dos extratos de espécies de *Piper*.

Dando sequência a análise dos dados empregou-se o HCA, utilizando o método Ward com distância euclidiana. Os resultados observados no dendrograma (Figura 148) permitiram uma melhor visualização das semelhanças entre as espécies quando comparado ao PCA total. No dendrograma observa-se a formação de sete agrupamentos definidos de acordo com a espécie. Os agrupamentos observados foram semelhantes aos observados no PCA, no entanto foi possível visualizar que algumas replicatas de *P. permucronatum* foram agrupadas no grupo VI próximas à *P. caldense*, o mesmo vem acontecendo com as triplicatas de K-1441B, grupo V.

Figura 148. Gráfico de HCA para análise de RMN de ^1H da fase orgânica.

4.10.4 Ressonância magnética nuclear da fase hidroalcoólica

Para a fase hidroalcoólica foi utilizado o espectro de RMN de ^1H na região de δ 10,0 a 5,0 ppm e de 4,6 a 0,9 ppm, alguns espectros estão apresentados no APÊNDICE C. O gráfico de scores (Figura 149) apresentou 3 grupos, sendo que o grupo I agrupou as amostras de *P. caldense*, *P. permucronatum*, *P. carniconnectivum* (K1441A) e *P. caldense* (K1569 e K1581). No grupo II observou-se apenas as replicatas de *P. carniconnectivum* K-1441B, e no grupo III *P. carniconnectivum* (K1441C, K1600A e B). De acordo com o gráfico de *loadings* (Figura 150) não foi possível estabelecer uma correlação significativa para a distribuição observada, sendo assim, nesta análise de PCA pode-se verificar que a

metodologia empregada não foi satisfatória, pois não permitiu a distinção entre as espécies.

Figura 149. Gráfico de scores (PC1 v PC2) (55% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (D_2O) dos extratos de espécies de *Piper*.

Figura 150. Gráfico de loadings (PC1 v PC2) (55% de variância) com base nos dados de RMN de ^1H (D_2O) dos extratos de espécies de *Piper*.

Os resultados obtidos para o HCA (Figura 151) foram semelhantes aos do PCA no grupo I estão agrupadas as amostras de *P. carniconnectivum* (K-1441A/C e K-1600A/B). As amostras de *P. caldense* e *P. permucronatum* aparecem em 3

grupos dentro de um grupo principal, delimitado pela linha tracejada. No grupo III, estão agrupadas as amostras de *P. caldense* coletadas em Cunha-SP, no entanto as amostras de *P. caldense* e *P. permucronatum* coletadas em Ubatuba-SP não puderam ser discriminadas através desta metodologia e aparecem em ambos os grupos IV e V.

Figura 151. Gráfico de HCA para análise de RMN de ^1H da fase hidroalcoólica.

Neste estudo baseado em análises quimiométricas foi possível obter algumas conclusões sobre as espécies analisadas. Os espécimes de *P. carniconnectivum* coletados em Manaus-AM e Belterra-PA, apresentaram-se em todos os momentos em grupos distintos apesar de se tratarem da mesma espécie. Além disso, o espécime K-1441B apesar de ser identificado como *P. carniconnectivum* se assemelhou à *P. caldense* em todas as análises. Diversos fatores podem estar relacionados a essa observação como, por exemplo, pode se tratar de outra espécie ou variedade da mesma.

As espécies de *P. permucronatum* apresentaram-se no mesmo grupo ou muito próximas ao longo de todo o estudo. As amostras de *P. caldense* foram agrupadas na maioria das vezes, sendo que as amostras K-1569 e K-1581 apresentaram uma maior similaridade entre si do que com a K-1209, esse fato pode estar associado ao local de coleta, que para K-1209 foi Ubatuba-SP e as demais Cunha-SP.

Dentre as técnicas utilizadas o RMN de ^1H da fase hidroalcoólica dos extratos foi a qual apresentou resultados menos satisfatórios com a discriminação entre dois grandes grupos, de um lado *P. carniconnectivum* e de outro *P. caldense* e *P. permucronatum*, não sendo possível uma diferenciação entre essas últimas.

4.11 Vias biossintéticas envolvidas na formação dos metabólitos secundários identificados

A ocorrência de derivados de ácidos benzoicos prenilados e flavonoides é frequente em espécies de *Piper* (Flores et al., 2009; Freitas et al., 2009; Lago et al., 2004; Yamaguchi et al., 2011). As rotas biossintéticas que levam a formação desses metabólitos podem ser inferidas com base nas descritas na literatura e envolve as vias do chiquimato e do MVA/MEP (Harborne, 1994; Kellogg; Poulter, 1997).

Os meroterpenos identificados neste estudo possuem rotas biossintéticas bem conhecidas, sendo a parte aromática proveniente da via do chiquimato gerando os substratos ácido p-hidroxibenzoico e ácido protocatecuico. As preniltransferases aromáticas catalisam a transferência de unidades de IPP, GPP, FPP e GGPP para moléculas aceptoras aromáticas, como os derivados de ácidos benzoicos, e são responsáveis pela origem de uma enorme diversidade de metabólitos secundários em plantas, fungos e bactérias (Heide, 2009; Lopez et al., 2010).

Nos flavonoides, o anel B e parte do anel heterocíclico (anel C) são provenientes do ácido cinâmico e seus análogos, oriundos da via do chiquimato. A formação do esqueleto carbônico de flavonoides é catalisada pelas chalcona sintases através de reações de condensação e ciclização de três unidades de malonil-CoA. Outras enzimas como chalcona isomerases e hidroxilases estão envolvidas para obtenção do produto final (Harborne, 1994). No entanto, apesar da biossíntese de flavonoides ser bem conhecida, a oxidação e redução do anel B dos protoflavonoides é uma etapa de grande relevância sob o ponto de vista de reações enzimáticas inusitadas. Fato bastante intrigante é a ocorrência dos protoflavonoides em espécies primitivas de plantas e a sua detecção em espécies de *Piper* (Figura 152).

Figura 152. Biossíntese de meroterpenos e flavonóides em espécies de *Piper*.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies de *Piper* descritas abaixo resultou no isolamento e identificação de treze substâncias. De *P. bowiei* foram identificados dois cromenos (**1** e **2**) e uma flavanona (**6**), de *P. permucronatum* uma flavona (**3**) e uma flavanona (**7**), de *P. caldense* uma flavona (**4**) e um derivado de ácido benzoico prenilado (**12**) e de *P. carniconnectivum* uma flavona (**5**), um derivado de ácido benzoico prenilado (**13**), duas protoflavanonas (**8** e **9**) e duas protoflavonas (**10** e **11**). As substâncias **8**, **9**, **10**, **11**, **12** e **13** são descritas pela primeira vez neste trabalho.

Das substâncias isoladas, quatro delas apresentaram estruturas raras, sendo que as protoflavanonas **8** e **9** foram avaliadas quanto à sua atividade antileucêmica apresentando resultados promissores na buscas de substâncias antitumorais. As protoflavonas **10** e **11** serão submetidas aos mesmos ensaios posteriormente.

Os resultados obtidos nas análises de PCA e HCA permitem concluir que as técnicas analíticas EM, CLAE-EM e RMN de ^1H em conjunto com a quimiometria apresentam-se como uma potencial ferramenta na avaliação de dados provenientes de matrizes complexas, como os extratos de plantas.

O teste de hipóteses no qual a química de espécies de *Piper* com frutos pendentes e globosos foi avaliada quanto à composição química comparada aos outros tipos de frutos indicou que não há relação aparente. As espécies de *Piper* para os quais foram descritos ácidos benzoicos prenilados incluem *Piper crassinervium* e *P. gaudichaudianum* (Lago et al., 2004). Uma avaliação das relações entre essas espécies poderá ser realizada com a obtenção de sequências de DNA.

A ocorrência de protoflavanonas é bastante limitada às Pteridofitas com cerca de 20 ocorrências. O único relato em Angiospermas refere-se à ocorrência em *Ongokea* e os dados aqui obtidos para *Piper* constituem-se em fatos inéditos. De qualquer maneira, a perda de aromaticidade através de processos químicos ou enzimáticos constitui-se num processo energeticamente desfavorável e a descrição desse processo biossintético seria de grande relevância.

6. REFERÊNCIAS

- ADAM, K. P. Phenolic constituents of the fern *Phegopteris connectilis*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 929-934, 1999.
- AHMAD, V. U.; ALI, Z.; ZAHID, M.; ALAM, N.; SABA, N.; KHAN, T.; OASAR, M.; NISAR, M. Phytochemical study of *Salvia moorcroftiana*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 84-85, 2000.
- AKAHORI, Y.; KATAYAMA, S.; NORO, T.; FUKUSHIM.S; SAIKI, Y.; UENO, A. Studies on constituents of *Leptorumohra migueliana* H. Ito.4. NMR studies of protofarrerol and triacetylfarrerol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 3, p. 596-&, 1970.
- ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33-47, 2010.
- BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavones, lignans and terpene from *Piper umbellata* (Piperaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.
- BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBROSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromens and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.
- BRERETON, R. G. **Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant**. John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 489 p.
- CABANILLAS, B. J.; LE, L. A.-C.; CASTILLO, D.; AREVALO, J.; ESTEVEZ, Y.; ROJAS, R.; VALADEAU, C.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M.; FABRE, N. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. **Planta Medica**, v. 78, n. 9, p. 914-8, 2012.
- CABRAL, M. M. O.; ALENCAR, J. A.; GUIMARAES, A. E.; KATO, M. J. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 103-105, 2009.
- CARDOZO-JUNIOR, E. L.; CHAVES, A. C. O. Caldensin, A New Natural N-Methylaristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n., p. 216-218, 2003.
- CHANG, H. L.; SU, J. H.; YEH, Y. T.; LEE, Y. C.; CHEN, H. M.; WU, Y. C.; YUAN, S. S. F. Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Letters**, v. 267, n. 1, p. 85-95, 2008.

- CHANG, H. L.; WU, Y. C.; SU, J. H.; YEH, Y. T.; YUAN, S. S. F. Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase 1/2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 3, p. 841-849, 2008.
- DE MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; DOS ANJOS, J. F.; FERREIRA, S. A.; DE BRITO, E. S.; DE SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.
- DIAZ, P. P.; ARIAS, T.; JOSEPH-NATHAN, P. A Chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and a C-methyl flavanone from the bark of *Piper hostmannianum*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 809-811, 1987.
- DOLGIN, E. As leukemia options grow, drugs jockey to be first-line therapies. **Nat Med**, v. 19, n. 1, p. 7-7, 2013.
- DYER, L. A.; DODSON, C. D.; RICHARDS, J. Isolation, synthesis and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: DYER, L. A. PALMER, A. N. (Ed.). ***Piper. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions.*** Kluwer Academic Publishers, 2004. cap. 7, p.117-138.
- FACUNDO, V. A.; BRAZ, R. C-methylated flavonoids from the roots of *Piper carniconnectivum* C.DC (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1215-1217, 2004.
- FACUNDO, V. A.; SA, A. L.; SILVA, S. A. F.; MORAIS, S. M.; MATOS, C. R. R.; BRAZ, R. Three new natural cyclopentenone derivatives from *Piper carniconnectivum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 1, p. 140-145, 2004.
- FLORES, N.; JIMENEZ, I. A.; GIMENES, A.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-1543, 2008.
- FLORES, N.; JIMENEZ, I. A.; GIMENEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621-7, 2009.
- FREITAS, G. C.; KITAMURA, R. O. S.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 119-122, 2009.
- FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques**. New York, 1987.
- FUKUSHIMA, S.; NORO, T.; AKAHORI, Y.; SAIKI, Y.; UENO, A. Studies on constituents of *Leptorumohra miqueliana*.3. Conformation of protofarrerol. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 89, n. 9, p. 1272-&, 1969.
- GERIS, R.; SIMPSON, T. J. Meroterpenoids produced by fungi. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 1063-1094, 2009.

- GREEN, T. P.; TREADWELL, E. M.; WIEMER, D. F. Arieianal, a Prenylated Benzoic Acid from *Piper arieianum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 367-368, 1999.
- GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E. Lista de Espécies da Flora do Brasil.: Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2012.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994. 675 p.
- HAUTEVILLE, M.; CHOPIN, J.; GEIGER, H.; SCHULER, L. Protogenkwanin, a new flavonoid from *Equisetum arvense* L. **Tetrahedron**, v. 37, n. 2, p. 377-381, 1981.
- HEIDE, L. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 2, p. 171-179, 2009.
- HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct Bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, n. 2, p. 327-&, 1970.
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.
- JENSEN, S.; OLSEN, C. E.; DUTT TYAGI, O.; BOLL, P. M.; HUSSAINI, F. A.; GUPTA, S.; BISHT, K. S.; PARMAR, V. S. Neolignans and an isoprenylated phenol from *Piper clarkii*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 789-792, 1994.
- JERZ, G.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Cyclohexanoid protoflavanones from the stem-bark and roots of *Ongokea gore*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1698-1706, 2005.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.
- KELLOGG, B. A.; POULTER, C. D. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 570-578, 1997.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 536-549, 2010.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267-275, 2011.
- LAGO, J. H. G.; CHEN, A.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARAES, E. F.; DE OLIVEIRA, A.; KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96-98, 2009.
- LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; GUIMARAES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from

Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.

LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; REIGADA, J. B.; SOARES, M. G.; ROESLER, B. P.; KATO, M. J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, 2007.

LEITE, A. C. C. F.; KATO, M. J.; SOARES, R. O. A.; GUIMARAES, A. E.; SANTOS-MALLET, J. R.; CABRAL, M. M. O. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 517-521, 2012.

LIN, A.-S.; CHANG, F.-R.; WU, C.-C.; LIAW, C.-C.; WU, Y.-C. New cytotoxic flavonoids from *Thelypteris torresiana*. **Planta Medica**, v. 71, p. 867-870, 2005.

LIN, A. S.; CHANG, F. R.; YEN, H. F.; BJORKEBORN, H.; NORLEN, P.; WU, Y. C. Novel flavonoids of *Thelypteris torresiana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 635-637, 2007.

LIN, A. S.; NAKAGAWA-GOTO, K.; CHANG, F. R.; YU, D. L.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; WU, C. C.; CHEN, S. L.; WU, Y. C.; LEE, K. H. First total synthesis of protoapigenone and its analogues as potent cytotoxic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 3921-3927, 2007.

LIU, H.; XIAO, Y.; XIONG, C.; WEI, A.; RUAN, J. Apoptosis induced by a new flavonoid in human hepatoma HepG2 cells involves reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, n. 3, p. 209-216, 2011.

LIVINGSTONE, D. **Data analysis for Chemists**. Oxford Science Publications, 1995.

LOPES, A. A.; LOPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JUNIOR, J. M.; AMBROSIO, D. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; BARRETTO CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Research**, v. 22, n. 12, p. 1040-1046, 2008.

LOPEZ, A.; MING, D. S.; TOWERS, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 62-4, 2002.

LOPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M., JR.; FLAUSINO, O., JR.; BOLZANI, V. D. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, 2010.

MANLY, B. J. F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

- MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. Prenylated 4-Hydroxybenzoic Acid Derivatives from *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 370-373, 1988.
- MORAES, J. D.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-64, 2011.
- MURAKAMI, T.; KIDO, T.; HORI, K.; SATAKE, T.; SAIKI, Y.; CHEN, C. M. Chemical and chemotaxonomical studies of filices. 67. The distribution of a flavanone with a modified B-ring, protofarrerol and its derivatives. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 107, n. 6, p. 416-419, 1987.
- NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 399-403, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NORO, T.; FUKUSHIM.S; SAIKI, Y.; UENO, A.; AKAHORI, Y. Studies on constituents of *Leptorimohra miqueliana*. 2. Structure of protofarrerol. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 89, n. 6, p. 851-&, 1969.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Medica**, v. 59, n. 6, p. 546-51, 1993.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PORTET, B.; FABRE, N.; ROZENBERG, R.; HABIB-JIWAN, J.-L.; MOULIS, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 1, p. 45-54, 2008.
- POUNY, I.; ETIEVANT, C.; MARCOURT, L.; HUC-DUMAS, I.; BATUT, M.; GIRARD, F.; WRIGHT, M.; MASSIOT, G. Protoflavonoids from ferns impair centrosomal integrity of tumor cells. **Planta Medica**, v. 77, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 461-466, 2011.
- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 7, p. 1266-1278, 2006.

- RAJUDIN, E.; AHMAD, F.; SIRAT, H. M.; ARBAIN, D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Chemical constituents from tiger's betel, *Piper porphyrophyllum* N.E.Br. (Fam. Piperaceae). **Natural Product Research**, v. 24, n. 4, p. 387-390, 2010.
- RAO, M. M.; KINGSTON, D. G. I.; SPITTLER, T. D. Flavonoids from *Flourensia cernua*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 227-8, 1970.
- RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, F. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, v. 85, n. 1, p. 66-72, 2011.
- REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M. J.; PORTO, A. L. M.; LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, 2007.
- ROUSSIS, V.; AMPOFO, S. A.; WIEMER, D. F. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1787-8, 1990.
- RÜEGG, T.; CALDERÓN, A. I.; QUEIROZ, E. F.; SOLÍS, P. N.; MARSTON, A.; RIVAS, F.; ORTEGA-BARRÍA, E.; HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M. P. 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-Helicobacter pylori compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 461-467, 2006.
- SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 14-21, 2010.
- SCOTT, I.; JENSEN, H.; PHILOGÈNE, B.; ARNASON, J. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65-75, 2008.
- SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, n. 3, p. 147-165, 1987.
- SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- TANG, Y.; XIONG, C.; ZHOU, D.; WEI, A.; FU, W.; CAI, Y.; RUAN, J. A new flavonoid from *Macrothelypteris torresiana*. **Chemistry of Natural Compounds (Translation of Khimiya Prirodnykh Soedinenii)**, v. 46, n. 2, p. 209-211, 2010.
- TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; RINEHART, D.; SIUZDAK, G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 11, p. 5035-5039, 2012.
- TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, M. P. G.; KURT. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper Dilatatum* in honour of Professor G. H. Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 461-464, 1998.

- VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1421-1424, 1998.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Metabolomics: Will it Stay? **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 2-3, 2010.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.
- VINCIGUERRA, V.; LUNA, M.; BISTONI, A.; ZOLLO, F. Variation in the composition of the heartwood flavonoids of *Prunus avium* by on-column capillary gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, n. 6, p. 371-377, 2003.
- VIRSU, P.; LILJEBLAD, A.; KANERVA, A.; KANERVA, L. T. Preparation of the enantiomers of 1-phenylethan-1,2-diol. Regio- and enantioselectivity of acylase I and *Candida antarctica* lipases A and B. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 12, n. 17, p. 2447-2455, 2001.
- WADA, H.; FUJITA, H.; MURAKAMI, T.; SAIKI, Y.; CHEN, C. M. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. 73. New flavonoids with modified B-ring from the genus *Pseudophegopteris* (Thelypteridaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 12, p. 4757-4762, 1987.
- WEI, A.; WU, G.; XIONG, C.; ZHOU, D.; CAI, Y.; RUAN, J. Flavonoids with special B-ring from *Macrothelypteris viridifrons* and their anti-proliferative effects on tumor cell. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 36, p. 582-584, 2011.
- WEI, A.; ZHOU, D.; RUAN, J.; CAI, Y.; XIONG, C.; WU, G. Anti-tumor and anti-angiogenic effects of *Macrothelypteris viridifrons* and its constituents by HPLC-DAD/MS analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 373-380, 2012.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987.
- YAMAGUCHI, L. F.; FREITAS, G. C.; YOSHIDA, N. C.; SILVA, R. A.; GAIA, A. M.; SILVA, A. M.; SCOTTI, M. T.; EMERENCIANO, V. D. P.; GUIMARAES, E. F.; FLOH, E. I. S.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA, W. J.; KATO, M. J. Chemometric Analysis of ESIMS and NMR Data from *Piper* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2371-U170, 2011.
- YAMAGUCHI, L. F.; LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; DI MASCIO, P.; KATO, M. J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1838-1843, 2006.

APÊNDICE A – Espectros de massas por injeção direta dos extratos analisados por PCA

Figura A1. Espectros de massas obtidos por EM-ESI (Infusão direta) de K-844F, K-842F, K-842Fr, K-842S e K-842G.

Figura A2. Espectros de massas obtidos por EM-ESI (Infusão direta) de K-951F, K-951Fr, K-951S, K-951G, K-951R e K-951C.

Figura A3. Espectros de massas obtidos por EM-ESI (Infusão direta) de K-310F, K-364F, K-976F, K-978F e K-991F.

APÊNDICE B - Espectros de RMN de ^1H dos extratos analisados por PCA (fase orgânica)

Figura B1. Espectros de RMN de ^1H , das espécies analisadas por PCA e HCA (500 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE C - Espectros de RMN de ^1H dos extratos analisados por PCA (fase hidro alcoólica)

Figura C1. Espectros de RMN de ^1H , das espécies analisadas por PCA e HCA (500 MHz, D_2O).

SUMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Giovana Cássia de Freitas Lemeszenski

Local de nascimento: Valinhos-SP

Data de nascimento: 21 de março de 1983

EDUCAÇÃO:

Ensino Médio: Fundação Bradesco – Campinas-SP
1998-2000

Ensino Técnico: Fundação Bradesco – Campinas-SP
Técnico em informática
2001-2002

Graduação: Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Bacharelado em Química
2003-2006

Doutorado direto: Universidade de São Paulo-USP
Instituto de Química
Doutorado em Química
2007-2013

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

2011	Validação de Métodos em Espectrometria de Massas. Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas
2009	Oficina de Filogenia. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2007	Proteção Radiológica 2007. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2006	Química de Materiais de Revestimento. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2006	Descoberta de Novos Fármacos: Estratégias Clássicas. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
2006	Macromoléculas como Alvos para Produção de Fármaco. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
2005	RMN Aplicada a Alimentos. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
2005	Análise Orgânica de Ambientes e Amostras Forenses. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
2005	The Biology, Chemistry and Genetics of Endophytes. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
2005	Planejamento Síntese e Avaliação Farmacológica. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

OCUPAÇÃO PROFISSIONAL:**Universidade de São Paulo-USP**

Instituto de Química – Central Analítica

Especialista de laboratório, 2010 – atual

BOLSAS:

Bolsista de mestrado: CNPQ – mar/2007 – ago/2007

Bolsista de mestrado: FAPESP – set/2007 – fev/2009

Bolsista de doutorado direto: FAPESP – mar/2009 – fev/2010

MONITORIAS:

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da USP:

1º sem/2008 – Química Orgânica III – Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

2º sem/2008 – Química Geral – Profa. Dra. Denise Freitas S. Petri

2º sem/2009 – Química Geral – Prof. Dra. Dalva Lúcia de Farias

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Yamaguchi, Lydia F.; **Freitas, Giovana C.**; Yoshida, Nidia C.; Silva, Renata A. ; Gaia, Anderson M.; Silva, Adalberto M.; Scotti, Marcus T.; Emerenciano, Vicente de P.; Guimarães, Elsie F. ; Floh, Eny I. S.; Colombo, Carlos A.; Siqueira, Walter J.; Kato, Massuo J. **Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from Piper species**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2371-2382, 2011.
2. **Freitas, Giovana C.**; Kitamura, Rodrigo O. Saga; Lago, João Henrique G.; Young, Maria Claudia M.; Guimarães, Elsie F.; Kato, Massuo J. **Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from Piper caldense**. *Phytochemistry Letters* v. 2, p. 119-122, 2009.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. FREITAS, G. C.; KATO, M. J. **Occurence of protoflavanones in Piper carniconnectivum**. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; FREITAS, G. C.; YOSHIDA, N. C.; SILVA, R. A.; GAIA, A. M. **Análisis Metabolomico de Espécies de Piperaceae Empleando ESI-EM, RMN de 1H y Análisis Multivariado**. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. FREITAS, G. C.; KATO, M. J. ; YAMAGUCHI, L. F.; SCOTTI, M.T. **Multivariate data analysis on ESIMS data of Piper species**. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. FREITAS, G. C.; KATO, M. J. **Carniconnectivone, a novel protoflavanone from Piper carniconnectivum**. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. FREITAS, G. C.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F. **Análise multivariada por ESIMS em espécies de Piper**. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. FREITAS, G. C.; KATO, M. J. **Flavona em folhas de Piper caldense (Piperaceae)**. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ANEXO A - Cálculos de DFT das substâncias 8 e 9

Os cálculos de DFT dos espectros de dicroísmo circular das substâncias **8** e **9** foram realizados com a finalidade de determinar a configuração absoluta de ambas substâncias. Esse trabalho foi realizado em colaboração com o Dr. João Marcos Batista Junior, UNESP e faz parte do artigo em fase de submissão “**Antileukemic non-aromatic B-ring flavanones from *Piper carniconektivum* C. DC**”.

Methodology

All DFT and TDDFT calculations were carried out at 298 K in MeOH or EtOH solution using the PCM solvent model incorporated in Gaussian 09 software. Regarding compound **8**, the calculations were performed for the arbitrarily chosen (2*S*,1'*R*)- and (2*S*,1'*S*)-**8**. The theoretical spectra of their enantiomers were generated by multiplying the obtained spectra by (-1). Conformational searches were carried out at the molecular mechanics level of theory with the Monte Carlos algorithm using the MMFF force field implemented in Spartan 08 software package. For (2*S*,1'*R*)-**8**, eleven conformers with relative energy (rel E.) within 10 kcal/mol of the lowest-energy conformer were selected and further geometry optimized at the B3LYP/PCM/6-31G(d) level in EtOH. From these, the two conformers identified within an energy window of 2.0 kcal/mol, which corresponded to 96% of the total Boltzmann distribution, were selected for EA and ECD spectral calculations. As for (2*S*,1'*S*)-**8**, the nine conformers with rel E. within 10 kcal/mol identified at the molecular mechanics level were selected and further geometry optimized at the B3LYP/PCM/6-31G(d) level in EtOH. From these, two conformers were found within an energy window of 2.0 kcal/mol (> 97% of the total Boltzmann distribution), which

were selected for EA and ECD spectral calculations. The Boltzmann factor for each conformer was calculated based on Gibbs free energy. Vibrational analysis at the B3LYP/PCM/6-31G(d) in EtOH level resulted in no imaginary frequencies, confirming the considered conformers as real minima. TDDFT was employed to calculate excitation energy (in nm), oscillator strength (dimensionless), and rotatory strength R in dipole velocity (R_{vel} in cgs units: 10^{-40} esu² cm²) form, at the B3PW91/PCM/TZVP level in EtOH. The calculated oscillator and rotatory strengths from the first 15 singlet electronic transitions were simulated into an EA and ECD curve, respectively, using Gaussian band shapes and 10 nm half-width at 1/e of peak height. Regarding compound **9**, the calculations were performed for the arbitrarily chosen (2*S*,1'*R*,2'*R*)- and (2*S*,1'*R*,2'*S*)-**9**. Conformational searches were also run at the molecular mechanics level using the same algorithm, force field, and software as described above. For (2*S*,1'*R*,2'*R*)-**9**, 28 conformers with rel E. within 10 kcal/mol of the lowest-energy conformer were selected and further geometry optimized at the B3LYP/PCM/6-31G(d) level in MeOH. From these, the seven conformers identified within an energy window of 1.5 kcal/mol, which corresponded to 94% of the total Boltzmann distribution, were selected for EA and ECD spectral calculations at the B3PW91/PCM(MeOH)/TZVP level. As for (2*S*,1'*R*,2'*S*)-**9**, the 34 conformers with rel E. within 10 kcal/mol identified at the molecular mechanics level were selected and further geometry optimized at the B3LYP/PCM/6-31G(d) level in MeOH. From these, eight conformers were found within an energy window of 1.5 kcal/mol (> 92% of the total Boltzmann distribution), which were selected for EA and ECD spectral calculations at the B3PW91/PCM(MeOH)/TZVP level. The Boltzmann factor for each conformer was also calculated based on Gibbs free energy. Vibrational analysis at the B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d) level also resulted in no imaginary frequencies.

The TDDFT theoretical EA and ECD spectra were simulated from the first 20 singlet → singlet electronic transitions using Gaussian band shapes and 10 nm half-width at 1/e of peak height. All the predicted wavelength transitions were used as such without any scaling.

Results

The planar structures of compounds **8** and **9** were firmly established elucidated but the free rotation of the non-aromatic B ring precluded the determination of its relative configurations. Thus, the assignment of their absolute configurations was attempted using TDDFT calculations of ECD spectra. The calculations were performed considering all possible stereoisomers, namely, 2*S*,1'*R*; 2*S*,1'*S*; 2*R*,1'*S* and 2*R*,1'*R*. Nevertheless, the calculations were carried out only for the diastereomers (2*S*,1'*R*)- and (2*S*,1'*S*)-**8** while the spectra of their corresponding enantiomers were generated by multiplying the obtained spectra by (-1). After conformational analysis and geometry optimization steps only two conformers of each configuration (2*S*,1'*R*)- and (2*S*,1'*S*)-**8** were found to predominate (Figure D1). These conformers, which differed mainly with respect to the relative positioning of the rotatable aromatic OCH₃ groups, were used to simulate the ECD curves at the B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) level in EtOH using PCM method.

Figure D1. Optimized structures and relative energies [B3LYP/PCM(EtOH)/6-31G(d)] of the two lowest-energy conformers of (2*S*,1'*R*)-**8** (upper frame) and (2*S*,1'*S*)-**8** (lower frame) used for ECD calculations at the B3PW91/PCM/TZVP level in EtOH.

The overall pattern of the calculated weighted ECD spectrum for (2*S*,1'*R*)-**8** was consistent with those of the experimental one, i.e., a positive Cotton effect (CE) near 325 nm, a negative CE around 280, and a positive CE at around 250 nm (Figure y). The predicted transition wavelengths were not scaled since a uniform scaling factor may not be satisfactory for all electronic transition energies (Polavarapu et al., 2011). Regarding the configuration (2*S*,1'*S*)-**8**, the calculated spectrum presented basically the same sign and intensity for the first two CEs (~325 and 280 nm) as those of (2*S*,1'*R*)-**8**. However, the CE for the highest-energy transition at around 250 nm was of opposite sign (Figure D2). The electronic transitions in question involved mainly alkene and aromatic π - π^* transitions (250 and 280 nm, respectively) with some charge transfer (alkene to carbonyl) contribution as well as ketone n - π^* transitions (325-350 nm). These findings allowed us to determined unambiguously the absolute configuration of (+)-**8** as 2*S*,1'*R*.

Figure D2. Center: experimental ECD spectrum of (+)-**8** in EtOH assigned as 2*S*,1'*R*. Lower frame: calculated ECD spectrum [B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) in EtOH using PCM] of the Boltzmann average of the two lowest-energy conformers of the corresponding (2*S*,1'*R*)-**8**. Upper frame: calculated ECD spectrum [B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) in EtOH using PCM] of the Boltzmann average of the two lowest-energy conformers of the corresponding (2*S*,1'*S*)-**8**. The bars represent the rotational strengths for the weighted ECD spectrum.

The experimental ECD spectrum of **9** was very similar to that of compound (+)-**8** suggesting its absolute configuration also as 2*S*,1'*R*, which was confirmed by TDDFT calculations at the B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) level in MeOH using PCM (Figure D2). Nevertheless, these calculations did not allow the determination of absolute configuration of the stereogenic center at C-2'. The theoretical spectra for both diastereomers (2*S*,1'*R*,2'*S*)- and (2*S*,1'*R*,2'*R*)-**9** were indistinguishable (Figure D3) possibly because the introduction of a new stereogenic center do not perturb

significantly the transitions of the dominant benzoyl chromophore or those of the carbonyl group at position C-4'.

Figure D3. Center: experimental ECD spectrum of (+)-**9** in MeOH. Lower frame: calculated ECD spectrum [B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) in MeOH using PCM] of the Boltzmann average of the seven lowest-energy conformers of the corresponding (2*S*,1'*R*,2'*S*)-**9**. Upper frame: calculated ECD spectrum [B3PW91/TZVP//B3LYP/6-31G(d) in MeOH using PCM] of the Boltzmann average of the eight lowest-energy conformers of the corresponding (2*S*,1'*R*,2'*R*)-**9**. The bars represent the rotational strengths for the weighted ECD spectrum.