UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e piplartina

Estela Hanauer Schaab

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e piplartina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Estela Hanauer Schaab
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Schaab, Estela Hanauer

Estudos oxidativos biomiméticos com a piperina e a piplartina.

Ribeirão Preto, 2008.

61 p. 41 il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. Piperina. 2. Piplartina. 3. Oxidação biomimética. 4. Espectrometria de massas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estela Hanauer Schaab

Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e pipartina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Pepporine Lopes

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente a torná-lo possível.

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais Ernani e Maria Estela, pelo suporte em todos os momentos. Ao meu irmão Felipe, por ser o melhor irmão que eu poderia ter.

Aos meus amigos, pela força e compreensão. Sem vocês, nada faria sentido...

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando...”

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho...”.

A Deus, por todos os tesouros da minha vida.

Aos meus pais Ernani e Maria Estela, pelo tempo, carinho, confiança e amor dedicados a mim ao longo desta caminhada, pelo esforço para proporcionar a realização dos meus sonhos e pela educação baseada no respeito acima de tudo, e no incentivo para correr atrás dos objetivos.

Ao meu irmão Felipe, pelo companheirismo e força.

Ao André, por estar ao meu lado, por todo carinho e dedicação.

Ao professor, orientador e acima de tudo amigo prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, primeiramente por ter me recebido na Universidade de portas abertas, pela orientação na condução deste trabalho e pela amizade construída ao longo deste caminho.

À professora Dra. Iassuko Iamamoto, pela dedicação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Tati, aluna de pós-graduação da Prof. Dra. Iassuko, pela ajuda que foi essencial na condução deste trabalho.

Ao professor Dr. João Luis Callegari Lopes, pelos sábios momentos de reflexão e amizade dedicados.

A Cris e ao Tomaz, pessoas que eu tenho uma admiração muito grande, por todo auxílio na parte analítica deste trabalho, e também pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Às minhas amigas do quarteto fantástico (Fernandinha, Denise e Ana Lígia), pela amizade incondicional. Vocês são parte essencial desta conquista.

A todos os alunos e funcionários do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial aos colegas de laboratório Andréa, Solange, Juliano, Carlos, Gobbo, Michel, Daniel, Leandro e Dayana, que fizeram parte direta ou indiretamente na conclusão de mais esta etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e auxílio financeiro na condução deste projeto.

RESUMO

SCHAAB, E.H. **Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e piplartina**. 2008, 61 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

A piperina e a piplartina são alcalóides isolados de espécies do gênero *Piper*. A escolha destas moléculas para este estudo foi baseada em suas atividades biológicas, em especial pelo seu potencial antitumoral. Tendo em vista a procura de meios alternativos para o estudo do metabolismo de novos fármacos, especialmente aqueles provenientes de produtos naturais, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil oxidativo da piperina e da piplartina através de diferentes metaloporfirinas, que biomimetizam o metabolismo do citocromo P450. Para a realização deste trabalho, a piperina e a piplartina foram expostas à oxidação em meio homogêneo, utilizando o iodosilbenzeno (PhIO) como doador de oxigênio e metaloporfirinas sintéticas de primeira e segunda geração como catalisadores da reação, que foram [Fe(TPP)]Cl, [Mn(TPP)]Cl, [Fe(TFPP)]Cl e [Mn(TFPP)]Cl. Como solvente para os meios reacionais foram utilizados 1,2-dicloroetano e acetonitrila. Os padrões e os meios reacionais contendo os produtos de oxidação foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) com ionização por elétrons (IE), e por espectrometria de massas *tandem* com ionização por *electrospray* em modo positivo. Através das análises dos espectros obtidos por CG-EM e IES-EM, foi possível observar a presença de produtos de oxidação, formados com todas as metaloporfirinas testadas, especialmente as fluoradas. Apesar de ter sido detectada pequena formação de produto oxidado na piperina, este foi praticamente insignificante. A piplartina mostrou-se um substrato mais reativo frente aos catalisadores testados. Na piperina foi verificada a presença do produto hidroxilado. Na piplartina os produtos de oxidação observados foram as substâncias desmetoxilada, monohidroxilada e dihidroxilada, sendo os dois últimos observados apenas através da técnica de *electrospray*. As estruturas foram propostas baseadas nas vias de fragmentação apresentadas nos espectros de IE-EM de baixa resolução, e também através de IES-EM/EM de alta resolução em modo positivo. Os resultados deste trabalho são promissores para a obtenção de derivados oxidados de piperina e piplartina através das metaloporfirinas.

Palavras-chave: Piperina; piplartina; oxidação biomimética; metaloporfirinas; espectrometria de massas.

ABSTRACT

SCHAAB, E.H. **Biomimetic oxidative studies with the natural products piperine and piplartine**. 2008, 61 p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

Piperine and piplartine are alkaloids isolated from species of *Piper* genus. The choice of these molecules for this study was based on the promising biological activities presented by these substances, especially for their antitumoral potential. Based on the research of alternative ways for studying the metabolism of new drugs, especially from natural products, the goal of this study was to investigate the oxidative profile of piperine and piplartine through different metalloporphyrins, which biomimic the metabolism of cytochrome P450. For doing this research, piperine and piplartine were exposed to oxidation in homogeneous media, using iodosilbenzene (PhIO) as oxygen donor and synthetic metalloporphyrins of first and second generations as catalysts for the reaction, that were [Fe(TPP)]Cl, [Mn(TPP)]Cl, [Fe(TFPP)]Cl and [Mn(TFPP)]Cl. The solvents used for the reaction media were 1, 2- dichloroetane and acetonitrile. The standards and reaction media containing the oxidation products were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) with electron ionization (EI), and by mass spectrometry and mass spectrometry *tandem* with *electrospray* ionization (ESI-EM and ESI-EM/EM), in positive mode. Through the analysis of spectra obtained by GC-MS and ESI-MS, it was possible to observe the presence of the oxidation products, formed with all the metalloporphyrins tested, especially the fluoreted ones from the second generation. Despite having been detected small formation of oxidized product on piperine, this was practically insignificant. Piplartine shown to be a more reactive substrate in front of the catalysts tested. In piperine, it was possible to verify the presence of the hydroxylated product. In piplartine, the oxidized products observed were the demetoxilated, monohydroxilated and dihydroxilated, the last two being verified only through the technique of *electrospray*. The structures were proposed based on their fragment patterns presented on spectra of EI-MS (low resolution) an ESI-MS with high resolution in positive mode. The results of this work are promising to obtain oxidized derivatives of piperine and piplartine through synthetic metalloporphyrins.

Key-words: Piperine; Piplartine; biomimetic oxidation; mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da piperina.....	2
Figura 2. Estrutura química da piplartina.....	5
Figura 3. Estrutura do anel porfirínico base livre.....	6
Figura 4. Fe ^{III} protoporfirina IX (Grupo Prostético Heme).....	8
Figura 5. Ciclo catalítico proposto para o citocromo P-450.....	9
Figura 6. Meios reacionais sob agitação magnética.....	16
Figura 7. Metaloporfirinas utilizadas no presente estudo.....	17
Figura 8. Aparelho de CG-EM QP2010 série C704643 da Shimadzu.....	18
Figura 9. Aparelho UltrOTOFG ESI-TOF, da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA).....	20
Figura 10. Cromatograma da piperina obtido por CG-EM.....	25
Figura 11. Espectro de massas da piperina, obtido por EI-EM.....	26
Figura 12. Mecanismo de fragmentação proposto para piperina por EI-EM.....	27
Figura 13. Cromatograma do meio reacional da piperina obtido com a [Mn(TFPP)]Cl.....	28
Figura 14. Análise da piperina e do produto de oxidação no modo SIM.....	29
Figura 15. Espectro de massas do pico de $t_R = 32,90$, com m/z 283, obtido por EI-EM.....	29
Figura 16. Propostas para a formação do íon de m/z 283.....	30
Figura 17. Espectro de IES-EM da piperina em alta resolução (ionização por <i>electrospray</i> , modo positivo).....	31
Figura 18. Espectro de íons de m/z 286 (IES-EM/EM, modo positivo; energia de colisão	

18eV).....	33
Figura 19. Proposta de fragmentação da piperina por IES-MS/MS.....	34
Figura 20. Proposta para a formação dos íons produtos da piperina protonada.....	36
Figura 21. Espectro de IES-EM (alta resolução) da reação de oxidação da piperina com a MnTFPPCl.....	38
Figura 22. Espectros de IES-EM/EM do íon de m/z 302.....	39
Figura 23. Proposta para a formação dos íons produtos do produto de oxidação protonado.....	40
Figura 24. Cromatograma da piplartina obtido por CG-EM.....	41
Figura 25. Espectro de massas da piplartina, obtido por ionização por elétrons (EI-EM)..	41
Figura 26. Proposta para a formação dos principais íons fragmentos da piplartina por CG-EM.....	42
Figura 27. Cromatograma do meio reacional da piplartina com a [Fe(TFPP)]Cl.....	43
Figura 28. Espectro de massas do pico produto da piplartina, obtido por ionização por elétrons (EI-EM).....	43
Figura 29. Análise da Piplartina e do Produto de oxidação no modo SIM.....	44
Figura 30. Proposta para a fragmentação do íon de m/z 303.....	45
Figura 31. Cromatograma do padrão piplartina por CLAE.....	46
Figura 32. Cromatograma do meio reacional da piplartina com a [Fe(TFPP)]Cl por CLAE.....	46
Figura 33. Cromatograma do produto de oxidação da piplartina por CG-EM.....	47
Figura 34. Espectro de IES-EM da piplartina em alta resolução.....	48
Figura 35. Espectro de IES-EM em alta resolução da reação de oxidação da piplartina com [Fe(TFPP)Cl].....	49
Figura 36. Espectros de IES-EM/EM do íon de m/z 350 com [Fe(TFPP)]Cl.....	51

Figura 37. Estrutura sugerida para o íon de m/z 350 (produto dihidroxilado).....	52
Figura 38. Espectro de IES-EM em alta resolução do produto de oxidação isolado da piplartina.....	53
Figura 39. Espectro de IES-EM/EM do íon de m/z 372 com [Fe(TFPP)]Cl.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas dos metabólitos da piperina em ratos e humanos.....	4
Tabela 2: Metaloporfirinas utilizadas no estudo e proporção do substrato que reagiu na reação.....	23
Tabela 3: Relação substrato/produto oxidado na oxidação da piperina com PhIO catalisadas por Fe e Mn porfirinas em meio orgânico (CG-EM).....	24
Tabela 4: Relação substrato/produto oxidado na oxidação da piplartina com PhIO catalisadas por Fe e Mn porfirinas em meio orgânico (CG-EM).....	25
Tabela 5: Íons observados no espectro de IES-EM da piperina.....	32
Tabela 6: Principais íons observados no espectro de IES-EM/EM da molécula de piperina protonada (m/z 286).....	33
Tabela 7: Íons observados no espectro de IES-EM do meio reacional da piperina.....	39
Tabela 8: Íons observados no espectro de IES-EM da piplartina.....	49
Tabela 9: Íons observados no espectro de IES-EM do meio reacional da piplartina.....	50
Tabela 10: Íons observados no espectro de IES-EM do produto isolado da piplartina.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CIP 450	Citocromo P450
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas seqüencial
[Fe(TPP)]Cl	Cloreto de (5,10,15,20-(tetrafenil)porfirinato ferro (III)
[Fe(TFPP)]Cl	Cloreto de (5,10,15,20-tetrakis(pentafluoro)porfirinato ferro (III)
IE-EM	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
IES-EM	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
IES	“Ionização” por <i>electrospray</i> (<i>electrospray ionization</i>)
IES-EM/EM	Espectrometria de massas seqüencial com “ionização” por <i>electrospray</i> (<i>electrospray ionisation tandem mass spectrometry</i>)
MeP	Metaloporfirinas
[M + H]⁺	Molécula protonada
[M + Na]⁺	Molécula cationizada com sódio
[M + K]⁺	Molécula cationizada com potássio
[Mn (TPP)]Cl	Cloreto de (5,10,15,20-(tetrafenil)porfirinato manganês (III)
[Mn (TFPP)]Cl	Cloreto de (5,10,15,20-tetrakis(pentafluoro)porfirinato

	manganês (III)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ODS	Octadecilsilano
PhIO	Iodosilbenzeno
Qq-ToF	Quadrupolo-tempo de voo
t_R	Tempo de retenção
u.m.a	Unidade de massa atômica
UV-VIS	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O Gênero <i>Piper</i> : uma visão geral sobre suas propriedades químicas e farmacológicas.....	1
1.2 Piperina.....	1
1.3 Piplartina.....	4
1.4 Metaloporfirinas.....	6
1.5 Metabolismo de fármacos: Citocromo P450.....	7
1.6 O emprego de metaloporfirinas em estudos de metabolismo biomimético oxidativo.....	10
1.7 Utilizações da espectrometria de massas na determinação estrutural de compostos.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Solventes Empregados.....	15
3.2 Reagentes Empregados.....	15
3.3 Reações de oxidação com as metaloporfirinas sintéticas.....	15
3.4 Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	18
3.5 Análises por espectrometria de massas (EM) e espectrometria de massas <i>tandem</i>	

(EM/EM) com ionização por <i>electrospray</i> (ESI) operando em modo positivo.....	19
3.6 Análises do meio reacional da pipartina por CLAE.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Sistemas reacionais com metaloporfirinas para produzir derivados metabólicos da piperina.....	22
4.2 Análise da piperina e dos meios reacionais por CG-EM.....	24
4.3 Determinação estrutural da piperina e de seus produtos de oxidação por IES-EM e IES-EM/EM.....	31
4.4 Análise da pipartina e dos meios reacionais por CG-EM.....	41
4.5 Determinação estrutural da pipartina e de seus produtos de oxidação por IES-EM e IES-EM/EM.....	48
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Piper*: uma visão geral sobre suas propriedades químicas e farmacológicas

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e apresenta cerca de 700 espécies. As espécies deste gênero são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo utilizadas na medicina popular para fins diversos (antiinflamatória, antibiótica, antimicrobiana, inseticida, entre outras). Além disso, apresentam uma alta importância comercial e econômica por serem pimentas utilizadas mundialmente como temperos picantes (PARMAR *et al.*, 1997).

O interesse pela química deste gênero cresceu bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies de *Piper* têm sido amplamente investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, sendo fonte de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para a indústria farmacêutica (SILVA; MACHADO, 1999).

Os estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Piper* relatados na literatura descrevem a presença de várias classes de metabólitos secundários (PARMAR *et al.*, 1997). Os compostos isolados de diferentes espécies representam doze diferentes classes de metabólitos secundários: alcalóides/amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, cavapironas, piperolidas, chalconas e diidrochalconas, flavonas, flavanonas e outros compostos (PARMAR *et al.*, 1997). Estes apresentaram atividades biológicas comprovadas tais como: antimicrobiana, moluscicida, fungicida, inseticida e antiinflamatória (BALDOQUI *et al.*, 1999). Dentre os compostos isolados de *Piper* que apresentam atividade farmacológica promissora, merecem destaque os alcalóides/amidas, que têm se mostrado como agentes biológicos potentes com relevante propriedade anticâncer (TSAI *et al.*, 2005).

1.2 Piperina

A pimenta preta (*Piper nigrum*) é um cipó nativo do leste do continente indiano (SZALLASI, 2005). A piperina (Figura 1) foi a primeira amida isolada do gênero *Piper*, sendo o principal metabólito secundário da *P. nigrum* encontrado principalmente em seus frutos. É um composto abundante no vegetal, sendo extraído de suas frutas secas com um rendimento de 3 a 7% (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Figura 1. Estrutura química da piperina.

A piperina apresenta diversas atividades farmacológicas e efeitos bioquímicos como, por exemplo, antimicrobiano, antifúngico e hepatoprotetor. Esta também aumenta a ativação de enzimas de detoxificação, tais como glutathione-S-transferase (GST) e quinina redutase (QR) (SELVENDIRAN; SINGH; SAKTHISEKARAN, 2006). Além disso, ela pode aumentar a biodisponibilidade de drogas e inibir as enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e outras drogas, e também melhorar o poder antioxidante das células (SELVENDIRAN; SINGH; SAKTHISEKARAN, 2006).

Este alcalóide tem potencial depressor no sistema nervoso central, apresentando também atividades analgésica, antipirética, antiinflamatória e antioxidante (PARMAR *et al.*, 1997; KHAJURIA *et al.*, 1998).

A piperina exibe atividade antioxidante, tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*. É conhecida pela proteção a danos oxidativos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SELVENDIRAN; BANU; SAKTHISEKARAN, 2004).

Sabe-se que cerca de 80-90% do câncer pode ser causado ou promovido por fatores ambientais (DOLL; PETRO, 1981). Estudos revelam que a presença de benzo- α -pireno em alimentos, poluentes ambientais, cigarro e gases provenientes de queima incompleta está ligada ao desenvolvimento de câncer (DOLL; PETRO, 1981). Mais tarde, foi demonstrado que a piperina previne significativamente o desenvolvimento de câncer de pulmão por eliminar os radicais livres ou reagir com os metabólitos tóxicos do benzo- α -pireno, inibindo a mutagênese destes compostos genotóxicos (SELVENDIRAN *et al.*, 2005).

A piperina é um inibidor da enzima monoaminoxidase, sendo assim leva a um aumento de monoaminas no cérebro, tais como serotonina (5-HT) e noradrenalina (KONG; CHENG; TAN, 2004; LEE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007). Estudos relatam que a 5-HT e a noradrenalina controlam a neurogênese, ou seja, síntese de novas células nervosas, (LI *et al.*, 2007), e que este fato estaria envolvido na fisiopatologia da depressão. Dessa forma, manipulações da neurogênese no sentido de aumentá-la poderiam se tornar mais uma alternativa terapêutica para depressão (SCORZA *et al.*, 2005). Recentemente, a piperina foi

estudada quanto ao seu efeito antidepressivo em ratos expostos ao estresse suave crônico por regular o nível de BDNF, fator neurotrófico encontrado no cérebro. Esse fator é responsável por atuar no crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses, e proteção das células nervosas à atrofia (LI *et al.*, 2007).

Bajad e colaboradores (2003) detectaram e caracterizaram alguns dos metabólitos da piperina presentes na urina de humanos e ratos (Tabela 1). Apesar de detectar e identificar os metabólitos, esses procedimentos impedem o isolamento destes metabólitos para ensaios posteriores. No caso do metabolismo em ratos esse problema é parcialmente controlado, considerando que normalmente ocorre a quebra da cadeia central e formação de produtos que podem ser obtidos comercialmente, com exceção do ácido pipérico. Para as substâncias detectadas em humanos esse problema torna-se ainda mais complicado com a presença de oxidação no anel não aromático.

Tabela 1. Estruturas dos metabólitos da piperina em ratos e humanos (BAJAD *et al.*, 2003).

Metabólitos em humanos	Metabólitos em ratos
<p>Ácido piperidideo -5-(3,4-diidroxifenil)-2,4-pentadienóico</p>	<p>Ácido Pipérico</p>
<p>Ácido Valérico- 5-(3,4-diidroxifenil)4-hidroxipiperidídeo</p>	<p>Ácido piperonílico</p>
	<p>Piperonal</p>
<p>Ácido valérico- 5-(3,4-diidroxifenil) piperidídeo</p>	<p>Álcool Piperonílico</p>
	<p>Ácido vanílico</p>

1.3 Piplartina

A pipartina (Figura 2) também é um alcalóide componente do gênero *Piper*, porém tem sido menos investigada que a piperina. Estudos realizados com esta amida revelaram potente atividade citotóxica *in vitro* em células de linhagem tumoral (DUH; WU; WANG, 1990; DUH; WU, 1990). Também foi estudada quanto à atividade antifúngica em

Cladosporium sphaerospermum e *Cladosporium cladosporioides* (NAVICKIENE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002), e como antiagregante plaquetária (TSAI *et al.*, 2005).

Figura 2. Estrutura química da piplartina.

Pesquisas que compararam a atividade antimitótica da piperina em relação à piplartina em diferentes sistemas celulares, tais como cultura de células tumorais, concluíram que a piplartina foi mais potente que a piperina (BEZERRA *et al.*, 2005). De acordo com Sunila e Kuttan (2004), a atividade antitumoral da piperina está relacionada a propriedades imunomodulatórias, que envolvem ativação de células e resposta imune humoral. De fato, a piperina possui uma fraca atividade citotóxica (PRADEEP; KUTTAN, 2004; SUNILA; KUTTAN, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005), indicando que sua atividade antitumoral não está relacionada a efeitos antiproliferativos diretos nas células tumorais. Porém, os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral da piperina ainda não foram claramente elucidados (BEZERRA *et al.*, 2006).

A piplartina, por outro lado, é considerada como um forte agente citotóxico, inibindo a proliferação de diversas células de linhagem tumoral em meio de cultura (DUH; WU; WANG, 1990; BEZERRA *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que a presença de duas carbonilas α,β -insaturadas é importante para a atividade citotóxica (DUH; WU; WANG, 1990; BEZERRA *et al.*, 2005).

Em estudos recentes, foi reportado que a piplartina apresenta atividade citotóxica e antiproliferativa em todos os tipos de linhagens celulares de leucemia humana estudados, que ocorreu de maneira dose e tempo dependentes (BEZERRA *et al.*, 2007). Nestas análises, a piplartina demonstrou uma menor potência quando comparada à doxorrubicina, porém a piplartina parece ser mais seletiva para células tumorais, com uma mínima toxicidade contra células normais em ensaio com linfócitos em proliferação (BEZERRA *et al.*, 2007). Este fato é importante porque quando se busca um tratamento quimioterápico a principal preocupação são os efeitos colaterais que um determinado fármaco pode causar, como a destruição dos linfócitos, que são as células de defesa.

1.4 Metaloporfirinas

Porfirinas são estruturas altamente coloridas constituídas por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno. Possuem tamanho ideal para se ligarem a vários íons metálicos e atuar como co-fatores para uma ampla variedade de processos bioquímicos (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997).

A denominação das porfirinas é baseada nas posições dos grupos substituintes no anel (Figura 4). Porfirinas com substituintes do tipo alifáticos no anel são denominadas alquilporfirinas, e arilporfirinas se os substituintes são aromáticos (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997).

Figura 3. Estrutura do anel porfirínico base livre.

A metaloporfirina é formada através da substituição de dois átomos de hidrogênio centrais no anel porfirínico (base livre) por um cátion metálico. Durante este processo de metalação, ocorre uma mudança significativa na simetria do anel, sendo que o tamanho do cátion influencia na conformação do anel e na estabilidade da metaloporfirina (KAIN; SCHWEDERSKI, 1994).

A suposta espécie catalítica nas oxidações por metaloporfirinas é um complexo metálico de alta valência, geralmente gerado pela reação de um complexo metal (III) porfirina com um doador de oxigênio (como iodosilbenzeno, peroxiácidos, etc.). Nesta reação, um átomo de oxigênio é transferido a partir de um oxidante à metaloporfirina para formar a espécie metalo-oxo de alta valência (SUSLICK, 1999).

Na tentativa de mimetizar a reatividade das hemoproteínas, vários pesquisadores têm utilizado as metaloporfirinas para catalisar uma série de oxidações de hidrocarbonetos a partir

de vários doadores de oxigênio. As metaloporfirinas catalisam oxidações que incluem hidroxilação, epoxidação de alcenos e hidroxilações aromáticas (SMOLINKA; GÖBER, 1999).

O primeiro relato de metaloporfirinas como catalisadores foi apresentado por Groves e colaboradores, mostrando que a ferroporfirina Fe(TPP) catalisava a transferência de átomos de oxigênio do iodosilbenzeno para ciclo-hexano, produzindo ciclo-hexanol em meio de diclorometano. Com este sistema, Groves efetuou reações de hidroxilação (GROVES; NEMO, 1983a), e de epoxidação do ciclo-hexeno (GROVES; NEMO, 1983b).

Na tentativa de aperfeiçoar o uso das metaloporfirinas como modelo para sistemas biológicos, novos modelos produzidos a partir de modificações na Fe(TPP) foram testados (GONSALVES, 2002). Estes modelos evitam os processos de dimerização, que impedem a ligação do substrato ao metal da porfirina e melhoram a atividade catalítica do complexo intermediário (SUSLICK, 1999).

1.5 Metabolismo de fármacos: Citocromo P450

O citocromo P450 constitui uma família de cisteinato-heme enzimas que desempenham um papel essencial na transformação oxidativa de moléculas endógenas e exógenas, como é o caso de fármacos. (MEUNIER; BERNARDOU, 2002). Estas monoxigenases ativam o oxigênio molecular (O_2) e incorporam um dos átomos de oxigênio em uma ampla variedade de substratos biológicos, com concomitante redução de dois elétrons do outro átomo de oxigênio à H_2O (McLAIN; LEE; GROVES, 1999).

As enzimas do CIP 450 têm sido isoladas de vários tecidos de mamíferos (fígado, rins, intestino, pulmão e córtex adrenal), assim como de insetos, plantas, fungos e bactérias, e são conhecidas por catalisar reações de hidroxilação, epoxidação, N-, S- e O- desalquilação, N-oxidação, sulfoxidação e dehalogenação. Estas reações de oxigenação são essenciais no metabolismo de drogas e xenobióticos (McLAIN; LEE; GROVES, 1999).

A primeira etapa do metabolismo de fármacos, denominada fase I, caracteriza-se por envolver reações de oxidação e redução ou de hidrólise, responsáveis pela conversão do fármaco lipofílico em um primeiro metabólito mais polar. Esta etapa compreende, basicamente, a inserção de um átomo de oxigênio originário de uma molécula de O_2 , para o substrato orgânico. Sob condições fisiológicas (*in vivo*), estas reações de oxidação em presença de O_2 requerem elétrons do NADPH ou NADH via proteínas de transferência de elétrons (flavoproteína citocromo P450 redutase) (BARREIRO; FRAGA, 2001).

A fase II compreende a etapa de conjugação, envolvendo reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e formação de adutos com glutatona, sendo caracterizada pela eliminação do fármaco do organismo através da urina ou da bile (BARREIRO; FRAGA, 2001).

O sítio ativo do P450 é relativamente simples, com uma ferroprotoporfirina IX (Figura 4) dentro de um ambiente protéico hidrofóbico. O quinto sítio ativo de ligação do íon Fe^{III} central possui um enxofre de um resíduo de cisteína, e o sexto sítio de coordenação é aberto para a ligação e posterior ativação do oxigênio molecular (MONTELLANO, 1995).

Figura 4. Fe^{III} protoporfirina IX (Grupo Prostético Heme).

O ciclo catalítico do citocromo P450 é desencadeado pela entrada do substrato no interior do sítio ativo deslocando a molécula de água ligada de forma axial (BERNARDOU & MEUNIER, 2002). As características do mecanismo do CIP 450 estão mostradas e descritas de acordo com a figura 5 (GROVES, 2005; VINHADO, 2005).

Figura 5. Ciclo catalítico proposto para o citocromo P-450 (GROVES, 2005; VINHADO, 2005).

(A) Ligação do substrato à enzima no seu estado inicial, geralmente acompanhado de uma mudança de estado de spin do ferro do estado inicial Fe^{III} porfirina de baixo spin, (Figura 5 A) para Fe^{III} porfirina de alto spin (Figura 5 B), de modo a suportar a formação do aduto enzima-substrato.

(B) Redução da espécie citocromo P450 férrica (Fe^{III} porfirina) (Figura 5 B) a Fe^{II} porfirina (Figura 5 C) através de uma associação de uma enzima redutase com um elétron derivado do NADPH.

(C) Ligação do oxigênio molecular à Fe^{II} porfirina (Figura 5 C) levando a formação do intermediário $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{O}^{\bullet})\text{Por}$ (Figura 5 D);

(D) Transferência de um segundo elétron do NADPH que resulta na formação do intermediário superóxido $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{O}^-)\text{Por}$ (Figura 5 E);

(E) Intermediário superóxido (Figura 5 E) é protonado levando a Fe^{III} -porfirina-hidroperóxido $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{OH})\text{Por}$ (Figura 5 F);

(F) A entrada de um novo H^+ protona o oxigênio distal, liberando água, num processo de clivagem heterolítica da espécie F formando o intermediário ativo $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})\text{Por}^+$ (Figura 5 G), que corresponde à espécie ativa clássica oxo-ferril porfirina π cátion, $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})\text{Por}^{\bullet+}$.

(G) O intermediário complexo-oxo $[\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})(\text{Por})]^+$ (Figura 5 G) transfere o oxigênio para o substrato liberando os produtos oxigenados da enzima.

1.6 O emprego de metaloporfirinas em estudos de metabolismo biomimético oxidativo

Considerando o papel fundamental do citocromo P450 no metabolismo de fármacos e a grande importância do conhecimento deste metabolismo na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, uma aplicação bastante útil dos sistemas de catálise biomimética oxidativa é a obtenção de metabólitos de fármacos. O conhecimento destes metabólitos pela oxidação de um fármaco é importante para determinar sua estrutura e posteriormente testar seu potencial farmacológico e/ou seus efeitos tóxicos (MANSUY, 2007).

Normalmente, a oxidação de um fármaco pelo CIP 450 humano, que está presente principalmente no fígado e no sistema gastrointestinal, resulta em vários metabólitos provenientes da oxidação de diferentes regiões da molécula. Cada CIP 450 humano leva a uma maior ou menor regioseletividade na oxidação do fármaco, que varia em função do seu modo de reconhecimento e posicionamento da molécula em relação ao grupo heme por algum resíduo protéico do sítio ativo. Na grande maioria dos sistemas similares a metaloporfirinas, a oxidação específica de um sítio do substrato normalmente não ocorre. Portanto, a regioseletividade da oxidação é determinada pela reatividade química intrínseca das diferentes funções da molécula. Geralmente, os sistemas de oxidação por metaloporfirinas levam a uma mistura de metabólitos oxidados, que podem ser úteis para obter diferentes produtos oxidados em apenas uma etapa (MANSUY, 2007).

Alguns fármacos podem possuir estruturas altamente complexas, sendo que a maioria deles apresenta grupamentos susceptíveis à oxidação. O metabolismo oxidativo é de maior importância pois pode afetar significativamente a segurança e eficácia de um fármaco, visto que pode ocorrer a formação de metabólitos terapeuticamente ativos e seguros, ou metabólitos tóxicos (BERNADOU; MEUNIER, 2004). Devido a estes fatores, o estudo do metabolismo de fármacos entra como parte essencial das etapas pré-clínica e clínica da avaliação de um novo medicamento (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Na tentativa de prever o comportamento metabólico de um fármaco, vários sistemas biológicos foram testados. Estas metodologias envolvem experimentos com animais, o uso de órgão perfundidos ou de células isoladas. Porém, vários problemas estão associados com o uso deste tipo de sistema:

- (a) O estudo com animais envolve seu sacrifício e são caros;
- b) preparações provenientes do fígado (microsossomos e hepatócitos) são de potência variada;
- c) O isolamento de intermediários reativos pode não ser viável, uma vez que podem ocorrer ligações com polímeros biológicos em oxidações catalisadas por enzimas. Além disso, seus metabólitos primários são frequentemente hidrofílicos e difíceis de isolar, especialmente para compostos desconhecidos (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

O isolamento de sistemas enzimáticos para ser utilizado fora de seu ambiente natural é uma alternativa possível de aplicação, porém possui a limitação de tirar a enzima do seu local de ação. Com isso, as enzimas tornam-se vulneráveis à degradação, além de não poderem ser substituídas (HINO; DOLPHIN, 1999; GONSALVES, 2002).

Dentro deste contexto, a química de porfirinas e metaloporfirinas (MeP) fornece uma base sintética extremamente versátil para prever determinadas propriedades físicas e químicas. A similaridade estrutural e comportamental das metaloporfirinas com os sítios ativos de heme proteínas possibilitou a utilização das MeP como catalisadores, mimetizando a atividade do CIP 450 e contribuindo para o desenvolvimento de novos sistemas para estudos de metabolismo biomimético de fármacos (SMOLINKA; GÖBER, 1999).

Assim como no CIP 450, o intermediário de alta valência $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ pode ser formado pela reação das ferro(III)porfirinas com diferentes doadores de oxigênio, como é o caso do iodosilbenzeno, possibilitando a aplicação das MeP como catalisadores nas reações de oxidação de compostos simples (SANTOS *et al.*, 2005). Como exemplos é possível citar os trabalhos realizados com alcanos e alcenos (DOLPHIN, TRAYLOR; XIE, 1997; IAMAMOTO *et al.*, 1995), assim como alguns estudos sobre a oxidação de drogas e fármacos (MELO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005), visando biomimetizar as atividades das enzimas do CIP 450. O sistema de metabolização oxidativa com as metaloporfirinas promove a hidroxilação de hidrocarbonetos, epoxidação de olefinas, oxidação de heteroátomos e clivagem de ligações C-C em substratos orgânicos (BALOGH & KESERU, 2004). As metaloporfirinas não envolvem um sítio de ligação específico para ligação ao substrato, sendo assim oxidam em qualquer posição que seja quimicamente reativa e não muito blindada. Logo, é possível alterar o perfil de oxidação do fármaco variando-se a estrutura da MeP, a natureza do meio (solvente orgânico, água, catálise homogênea ou heterogênea ou catálise inserida e polímeros orgânicos ou inorgânicos) e o oxidante. Assim, um conhecimento do processo metabólico *in vivo* pode auxiliar na escolha do oxidante mais conveniente (BERNARDOU; MEUNIER, 2004; SUSLICK, 1999).

1.7 Utilização da espectrometria de massas na determinação estrutural de compostos

A espectrometria de massas (EM) está fortemente presente na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de novos medicamentos e formulações até o controle da qualidade, podendo ser utilizada em vários estágios no estudo de fármacos, incluindo a identificação, caracterização, elucidação estrutural e recentemente, em estudos de metabolismo e farmacocinética (PEREIRA *et al.*, 2005; DENG; SANIAL, 2006).

A aplicação desta técnica em estudos de metabolismo possibilita a análise de várias moléculas, servindo de instrumento na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. A espectrometria de massas, quando acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM) torna-se uma ferramenta altamente sensível e específica (BARNES *et al.*, 2006; LIM; LORD, 2002). Através da EM é possível obter informações tanto sobre a massa e a fórmula molecular, bem como das vias de fragmentação, as quais permitem auxiliar na elucidação estrutural de compostos orgânicos.

Amostras sólidas, líquidas ou gasosas, contendo espécies voláteis ou não, requerem diferentes processos de ionização. Os processos de separação e detecção podem ser escolhidos de acordo com características mais ou menos comuns como sensibilidade, resolução e precisão de massa carga (m/z) e custo (MORAES; LAGO, 2003).

A cromatografia gasosa é uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para separação e quantificação de produtos naturais, podendo também ser usada como técnica de identificação, principalmente quando acoplada a um espectrômetro de massas. Esta técnica é amplamente utilizada em diversas áreas, como análise ambiental, indústrias químicas e farmacêuticas, na medicina, pesquisa, entre outras. A técnica de CG-EM apresenta alguns inconvenientes, podendo ser empregada apenas na análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis. Algumas substâncias que não preenchem esses pré requisitos podem ser derivatizadas e formar um composto com essas características, o que nem sempre é vantajoso (BONATTO, 2006; McMASTER; McMASTER, 1998).

A ionização por *electrospray* é uma técnica de ionização que ocorre através da transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa, possibilitando assim a análise de espécies pouco voláteis (MORAES; LAGO, 2003). Os íons gerados no IES estão relacionados às propriedades químicas de cada substância: reações ácido-base, formando moléculas protonadas ou desprotonadas, complexação com cátions ou ânions, resultando em

moléculas cationizadas ou anionizadas, e em alguns casos induzem reações de oxidação ou redução e levam a formação de íons moleculares (CROTTI *et al.*, 2006).

No *electrospray*, a maioria dos compostos orgânicos podem ser ionizados através de protonação/desprotonação (Reações ácido-base de Brønsted-Lowry) e/ou coordenação com íons presentes na solução da amostra. Os sítios básicos das moléculas podem acomodar um próton ou outros cátions metálicos, enquanto os ânions são geralmente produzidos pela perda de hidrogênios ácidos (VESSECHI *et al.*, 2007). Essa técnica permite, portanto, analisarmos metabólitos secundários mais polares com maior funcionalidade, o que não era possível na ionização por IE.

2. OBJETIVOS

2.1 Desenvolver sistemas reacionais com metaloporfirinas para produzir derivados da piperina e piplartina, visando biomimetizar as reações enzimáticas do sistema citocromo P450.

2.2 Determinação estrutural dos produtos de reação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Solventes Empregados

3.1.1 Meios reacionais: Os meios reacionais foram preparados com 1,2-dicloroetano e acetonitrila grau analítico P.A. (MALLINKRODT, AKROS ORGANICS).

3.1.2 CG-EM: Para o preparo das amostras foram utilizados diclorometano e metanol comerciais grau CLAE.

3.1.3 Espectrometria de Massas com Ionização por *electrospray*: Para o preparo das amostras foram utilizados acetonitrila grau CLAE e água deionizada (Milli-Q, Millipore).

3.1.4 CLAE: Para o preparo das amostras e como fase móvel foi utilizada acetonitrila (ACN) grau CLAE da marca J. T. (Baker) e água deionizada (Milli-Q, Millipore), filtrados e posteriormente desgaseificados através de vácuo e banho de ultra-som.

3.2 Reagentes Empregados

3.2.1 Doador de Oxigênio: Iodosilbenzeno (PhIO) sintetizado no laboratório da professora Dra. Yassuko Iamamoto, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCLRP-USP).

3.2.2 Substratos da Reação:

Piperina (5 gramas): (pureza 98%) foi adquirida comercialmente da Acros Organics.

Piplartina (2 gramas): Cedida pelo aluno de doutorado Daniel Bezerra, orientado pela professora Dra. Letícia Lotufo, da Universidade Federal do Ceará (UFCE).

3.2.3 Metaloporfirinas

[Fe(TPP)Cl] cloreto de (5,10,15,20- (tetrafenil)porfirinato ferro(III), [Mn(TPP)Cl] adquiridas comercialmente da Midcentury-Posen IL (USA), e Fe(TFPP)Cl e Mn(TFPP)Cl sintetizadas no laboratório da professora Dra. Yassuko Iamamoto, da FFCLRP.

3.3 Reações de oxidação com as metaloporfirinas sintéticas

Como meio reacional foram utilizados os solventes dicloroetano e acetonitrila grau analítico P.A., adquiridos comercialmente.

Foram utilizados como substrato da reação a piperina e a piplartina, e PhIO (com purezas de 80% e 83%) como doador de oxigênio, o qual foi sintetizado de acordo com

metodologia proposta por Saltzmann e Sharefkin (1973). Como catalisadores foram utilizadas as metaloporfirinas de primeira e segunda geração [Fe(TPP)Cl], [Mn(TPP)Cl], [Fe(TFPP)Cl] e [Mn(TFPP)Cl].

As reações com MeP foram conduzidas em frascos com tampa rosqueada de 5 mL com barras de agitação magnética de 4 X 12mm (Figura 6). Foram adicionados aos frascos 0,3 mM de MeP, 9 mM de PhIO e 6mM de substrato, pesados em balança analítica modelo AG 200 marca Gehaka. Foram adicionados 2 mL de dicloroetano ou acetonitrila aos frascos de vidro.

Os meios reacionais foram colocados sob agitação magnética durante um período de 4 h. Após este período, a agitação das misturas foi interrompida e os meios concentrados através de nitrogênio.

A síntese de PhIO e a inserção de metais às porfirinas base-livres e o suporte em matrizes sólidas foram desenvolvidos no laboratório de pesquisa da Profa. Dra. Yassuko Iamamoto, por alunos de pós graduação.

Figura 6. Meios reacionais sob agitação magnética.

Figura 7. Metaloporfirinas utilizadas no presente estudo.

3.4 Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Para as análises da piperina e da pipartina por CG-EM foi preparada primeiramente uma solução de 1 mg/ mL dos padrões para determinar o perfil cromatográfico e propor o mecanismo de fragmentação dos substratos envolvidos. Para análise dos produtos de oxidação dos substratos os meios reacionais secos foram ressuspensos em 2 mL de diclorometano ou metanol, filtrados com filtros Millipore JBR610222 Millex e encaminhados à análise.

As análises foram realizadas em aparelho de CG-EM QP2010 série C704643 da Shimadzu, equipado com fonte de ionização por elétrons (EI-EM) (Figura 8). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS, com 30 m de extensão, possuindo 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária.

A temperatura de injeção foi de 220°C e a região de massas analisada foi de m/z 50-400. O *split* foi de 1:50, sendo empregado hélio como gás de arraste, a uma velocidade linear de 41 cm/s. A temperatura da fonte de íons e da interface foi de 250°C.

A temperatura inicial de análise foi de 50°C sendo mantida durante 5 min. Após o aquecimento, a temperatura foi aumentada em 10°C/min até atingir 270°C.

Para as análises em modo SIM foram utilizadas as mesmas condições de temperatura, porém em modo splitless. No meio reacional da piperina foram monitorados os íons de m/z 285, 283, 201 e 115. Para o meio reacional da pipartina foram monitorados os íons de m/z 317, 303, 333, 274, 275, 236, 221, 207 e 175.

Figura 8. Aparelho de CG-EM QP2010 série C704643 da Shimadzu.

3.5 Análises por espectrometria de massas (EM) e espectrometria de massas *tandem* (EM/EM) com ionização por *electrospray* (ESI) operando em modo positivo:

As análises em espectrômetro de massas foram realizadas em aparelho UltrOTOFG ESI-TOF, da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA) (Figura 9). Foram preparadas soluções-estoque dos meios reacionais obtidos com a piperina e a piplartina com acetonitrila. Os meios reacionais foram ressuspensos em 2 mL de acetonitrila, sendo as soluções obtidas pré-purificadas em filtros Millipore JBR610222 Millex. Para a análise por IES-EM e IES-EM/EM, 20 µL da solução estoque foi diluída em 2 mL de soluções de ACN: H₂O 50:50 (v/v).

O aparelho utilizado é de alta resolução, necessitando de calibração interna e externa antes de realizar as análises. Para calibração interna é utilizada uma solução de NA-TFA a 10mg/mL (TOF), e para calibração externa uma solução de Formiato de Sódio com concentração de 10mM. Os espectros de IES-EM e IES-EM-EM foram adquiridos operando em modo positivo, sendo utilizadas as seguintes condições de análise: voltagem do Capilar 4500 V, voltagem do cone (1) 55 volts e do cone (2) 25 volts, temperatura gás de secagem 150°C, a um fluxo de 4 L/h. Foi utilizado gás nitrogênio, tanto para nebulização como para secagem.

Nas análises por EM/EM os íons precursores foram extraídos do quadrupolo para o interior da cela de colisão e fragmentados por colisão com nitrogênio. A energia do gás de colisão variou de 0 a 25 eV.

Figura 9. Aparelho UltrOTOFG ESI-TOF, da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA).

3.6 Análises do meio reacional da piplartina por CLAE

O desenvolvimento do método e as análises foram realizados em um sistema CLAE acoplado a um detector de região UV com arranjos diodos (sistema CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20AD, equipado com um detector UV-DAD modelo SDP-M10Avp e injetor manual com loop de 20 μ L, controlados pelo software CLASS-VP, com o objetivo de estabelecer o perfil cromatográfico e verificar o melhor comprimento de onda para análise.

Após a determinação do perfil cromatográfico da amostra, foi realizada a separação dos compostos em um sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC-6A constituído de detector com lâmpada UV-VIS a 300 nm modelo SPD-6AV controlados por software CLASS-VP, empregando-se um mostrador de 20 μ L. As separações foram realizadas em uma coluna ShimPack ODS-C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, Shimadzu). O modo de eluição estabelecido foi o isocrático, composto por H₂O (bomba A) e Acetonitrila (bomba B) a uma proporção de 60:40, e vazão de 1 mL/min.

Para a separação por coluna preparativa empregou-se um mostrador de 1 mL, sendo utilizada uma coluna ShimPack ODS preparativa C₁₈ (250 mm x 2cm, 5 µm, Shimadzu). A vazão foi estabelecida a 9,0 mL/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistemas reacionais com metaloporfirinas para produzir derivados metabólicos da piperina

Os meios reacionais foram compostos pelo substrato (piperina ou piplartina), o oxidante (iodosilbenzeno) e as diferentes metaloporfirinas em estudo. Para as análises, foram realizadas várias reações com as diferentes metaloporfirinas, com o objetivo de verificar se estas eram capazes de produzir produtos de oxidação a partir dos padrões, e quais produtos eram formados.

Para a realização deste trabalho foram testadas as metaloporfirinas de primeira geração [Fe(TPP)]Cl e [Mn(TPP)]Cl e de segunda geração [Fe(TFPP)]Cl e [Mn(TFPP)]Cl, com o objetivo de determinar o melhor sistema de oxidação para cada substrato. Como resultado foi possível verificar que não ocorreu diferença na oxidação da piperina quando utilizadas MeP de primeira e segunda gerações. Observou-se que a reatividade deste substrato na presença dos catalisadores é pequena, e a formação do produto de oxidação é muito baixa, podendo ser detectado e caracterizado apenas devido à sensibilidade das técnicas utilizadas neste estudo.

Já na oxidação da piplartina é possível observar que quando são utilizadas MeP de segunda geração, especialmente ferroporfirinas, a formação do produto de oxidação é muito maior, o que possibilitou a tentativa de isolamento deste produto.

Como solvente para os meios reacionais foram testados o dicloroetano e acetonitrila, pois estudos prévios com estes solventes demonstraram que eles possuem viscosidade ideal para o meio reacional (VINHADO, 2005). Os meios reacionais foram colocados sob agitação à temperatura ambiente, por um período estabelecido de 4 horas de acordo com metodologias propostas (SANTOS *et al.*, 2005; SOUZA, 2006), visando garantir um tempo de reação suficiente para formação dos produtos de oxidação.

Através das análises de CG-EM com os meios reacionais da piperina e da piplartina, reagidos com as metaloporfirinas de ferro e manganês de primeira e segunda geração em acetonitrila e dicloroetano foi possível verificar a presença de sinais referentes a produtos de oxidação. Muitas vezes a quantidade de substrato reagida foi muito pequena, o que inviabilizava a tentativa de isolamento dos compostos oxidados. Os dados de área de substrato que reagiu na reação com as diferentes metaloporfirinas em dicloroetano são mostrados na tabela 2:

Tabela 2. Metaloporfirinas utilizadas no estudo e proporção do substrato que reagiu na reação (Dados CG-EM).

Metaloporfirina	Piperina (%)		Piplartina (%)	
	DCE	ACN	DCE	ACN
FeTPPCI	10,8	20,0	7,9	15,1
MnTPPCI	11,7	21,9	51,8	69,0
FeTFPPCI	7,8	14,6	78,0	56,3
MnTFPPCI	12,3	21,5	69,0	51,8

Conforme os dados apresentados na tabela 2, é possível verificar que a reatividade da piperina é bem inferior àquela apresentada pela piplartina em ambos os solventes testados, sem apresentar diferença significativa na formação de produtos de oxidação quando utilizadas metaloporfirinas de primeira e segunda gerações; já com a piplartina a reatividade é superior, sendo a formação do produto de oxidação maior quando utilizadas metaloporfirinas de segunda geração. Também foi possível observar que a reação de oxidação mostrou-se bem mais específica para os produtos apresentados neste trabalho, formando menos subprodutos de reação quando utilizado o dicloroetano em relação à acetonitrila. Devido a este fator este solvente foi escolhido para síntese dos meios reacionais. Os dados obtidos estão apresentados nas tabelas abaixo (Tabelas 3 e 4), em relação aos principais produtos de oxidação identificados dos substratos de piperina e piplartina nos meios reacionais.

Os dados foram interpretados segundo o procedimento de que quanto menor a relação substrato/ produto no cromatograma, maior a formação de produto de oxidação. Como não era objetivo calcular o rendimento da reação, neste caso, esta relação permitiu verificar qual sistema catalítico foi mais eficaz na oxidação do substrato.

O principal produto de oxidação da piperina identificado por CG-EM foi o produto de relação massa carga m/z 283. Contudo, conforme os dados apresentados na tabela 3 é possível verificar que a formação é muitas vezes insignificante e não justifica seu emprego para obtenção de derivados.

Tabela 3. Relação substrato/produto oxidado na oxidação da piperina com PhIO catalisadas por Fe e Mn porfirinas em meio orgânico (CG-EM).

Sistema Catalítico	Meio Reacional	Área do Substrato	Área do produto m/z 283	Relação Substrato/ Produto
Fe(TPP)Cl	DCE	86,21	1,60	53,88
	ACN	79,99	1,31	61,06
Mn(TPP)Cl	DCE	88,29	4,31	20,48
	ACN	78,09	8,00	9,76
Fe(TFPP)Cl	DCE	92,21	1,02	90,40
	ACN	85,37	1,37	62,31
Mn(TFPP)Cl	DCE	87,69	8,72	10,05
	ACN	78,54	7,05	11,14

Na tabela 4 está demonstrada a formação do produto de m/z 303, principal sinal observado no cromatograma do meio reacional da piplartina. Pela análise dos dados é possível verificar a satisfatória formação do produto com a [Fe(TFPP)]Cl em DCE.

Foi verificado que no caso da piplartina, quando utilizadas as ferroporfirinas em comparação as manganês porfirinas, a formação de produtos era mais específica, gerando menos picos de subprodutos da reação. Considerando a boa formação do sinal de m/z 303 quando utilizada a [Fe(TFPP)]Cl em DCE, este meio foi escolhido para proceder à reações em maior escala e isolamento por CLAE.

Tabela 4. Relação substrato/produto oxidado na oxidação da pipartina com PhIO catalisadas por Fe e Mn porfirinas em meio orgânico (CG-EM).

Sistema Catalítico	Meio Reacional	Área do Substrato	Área do produto m/z 303	Relação Substrato/Produto
Fe(TPP)Cl	DCE	92,1	0,22	418
	ACN	84,9	-	-
Mn(TPP)Cl	DCE	31,0	2,7	11,4
	ACN	66,9	0,4	167,25
Fe(TFPP)Cl	DCE	22,1	46,8	0,47
	ACN	43,7	17,6	2,5
Mn(TFPP)Cl	DCE	48,2	13,7	3,5
	ACN	60,3	6,5	9,3

4.2 Análise da piperina e dos meios reacionais por CG-EM

4.2.1 Análise da piperina por CG-EM

Na análise do cromatograma do padrão piperina (figura 10) é possível verificar a presença de um pico em $t_R = 33,08$ min.

Figura 10. Cromatograma da piperina.

A figura 11 apresenta o espectro de massas da piperina obtido por ionização de elétrons (EI-EM). O espectro de massas da piperina apresenta o íon molecular de m/z 285 e os principais íons fragmentos de m/z 201, 173, 143 sendo o pico base em m/z 115.

Figura 11. Espectro de massas da piperina, obtido por EI-EM.

Na figura 12 está apresentada uma proposta para a formação de íons do referido espectro. Através desta figura é possível observar a cisão homolítica da ligação nitrogênio carbono da carbonila, com a perda do fragmento $-C_5H_{10}N$ de m/z 84, resultando na formação do íon acílio de m/z 201. Este íon é considerado essencial no estudo da via de oxidação da piperina pois através da sua presença ou ausência no espectro de massas é possível determinar a porção da molécula onde ocorre a oxidação.

O íon de m/z 201 poderia ser obtido seguindo duas vias de fragmentação. A primeira seria a eliminação de CO na cadeia lateral, com 28 u.m.a, através de uma cisão heterolítica, sendo que o par de elétrons permanece com a carbonila, resultando na formação de m/z 173. Esta quebra de ligação forma um carbocátion, sendo a carga positiva do íon rearranjada do carbocátion secundário para o terciário, mais estável.

A segunda via de fragmentação a partir do íon acílio de m/z 201 seria uma rearranjo do grupo metilenodioxifenil e perda de $CH_2=O$ com 30 u.m.a, que resultaria na formação do íon epóxido de m/z 171 (pouco visível no espectro de impacto eletrônico). A partir deste íon poderia então ser formado m/z 143 através da perda de CO, com 28 u.m.a.

Figura 12. Mecanismo de fragmentação proposto para piperina por EI-EM.

A figura 13 mostra o cromatograma do meio reacional da piperina com a $[Mn(TFPP)]Cl$, podendo ser observada a formação muito baixa do produto de oxidação.

Figura 13. Cromatograma do meio reacional da piperina obtido com a $[Mn(TFPP)]Cl$.

Na análise do cromatograma do meio reacional da piperina (figura 13), é possível verificar a presença de picos em $t_R = 10,25$, referente ao iodobenzeno, que é produto da reação de oxidação do iodosilbenzeno (doador de oxigênio da reação), em $t_R = 32,66$ referente ao padrão piperina que não reagiu e em $t_R = 32,90$ referente a pequena quantidade de produto de oxidação formado durante a reação de oxidação.

Em algumas situações, quando a intensidade de um pico desejado é muito baixa, o espectrometro de massas é focado em uma ou mais massas de interesse. Este processo é conhecido como monitoramento de íon selecionado (SIM), onde ocorre um aumento significativo de sensibilidade em relação ao modo “full scan”, porque são monitorados somente os íons selecionados no aparelho (ROBARDS; HADDAD; JACKSON, 1994).

Na figura 14 é mostrada a análise em modo SIM dos íons referentes à piperina e ao produto de oxidação, sendo possível verificar a presença dos íons de m/z 201 e 115 nos picos referentes ao padrão e ao produto. Pode ser observada também a diferença de duas u.m.a em relação ao íon molecular da piperina e do produto de oxidação.

Figura 14. Análise Piperina e Produto de oxidação no modo SIM.

Através da análise do espectro de massas do íon de m/z 283 (Figura 15) foi possível propor o mecanismo de fragmentação para o produto de oxidação formado.

Figura 15. Espectro de massas do pico de $t_R = 32,90$, com m/z 283, obtido por EI-EM.

Na análise do espectro de massas do produto de oxidação (Figura 15) em comparação ao padrão (Figura 11), o íon de m/z 283 difere da piperina (de m/z 285) por duas unidades de massa, o que sugere a presença de uma ligação dupla na porção piperidínica da molécula. Esta olefina pode ter sido formada pela desidratação do produto contendo uma hidroxila na porção piperidínica, conforme representado na figura 16. O fato de que a oxidação da piperina

ocorreu no anel piperidínico pode ser confirmada pelo íon acílio de m/z 201, que aparece nos espectro da piperina e de seu produto de oxidação, bem como por outros íons de menor abundância relativa. O íon de m/z 201 foi observado no espectro de todos os produtos de oxidação obtidos, independente da MeP utilizada, tanto em reações em dicloroetano como em acetonitrila.

A desidratação é uma reação comum em álcoois secundários e poderia explicar o não aparecimento do íon de m/z 301, que seria o produto hidroxilado, e sim de seu produto de desidratação com m/z 283.

A intensidade do pico de íon molecular no espectro de massas de um álcool primário ou secundário é normalmente pequena, ou muitas vezes inexistente, devido a uma reação bastante comum nesta classe de compostos: a desidratação. O pico M-18 é frequentemente gerado pela decomposição térmica dos álcoois superiores nas paredes quentes da câmara de injeção(SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

No caso da piperina, a desidratação é uma α,β -eliminação de água, gerando a partir do produto de m/z 301 o íon de m/z 283. Essa reação consiste na perda de OH e hidrogênio α conforme apresentado na figura 16. A posição da ligação dupla apresentada na figura é ilustrativa, podendo ocorrer em outras posições do anel piperidínico.

Figura 16. Propostas para a formação do íon de m/z 283.

4.3 Determinação estrutural da piperina e de seus produtos de oxidação por IES-EM/EM

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* em alta resolução foi utilizada com o objetivo de comparar os dados obtidos pela técnica de CG-EM e confirmar a estrutura dos compostos obtidos através de sua massa exata.

4.3.1 Espectro de IES-EM do padrão piperina

A figura 17 representa o espectro de massas com ionização por *electrospray* em alta resolução da molécula de piperina.

Figura 17. Espectro de IES-EM da piperina em alta resolução (ionização por *electrospray*, modo positivo).

A tabela 5 mostra os principais íons observados no espectro de IES-EM da piperina juntamente com o cálculo de erro, em ppm.

Tabela 5: Íons observados no espectro de IES-EM da piperina.

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{12}H_9O_3^+$	201,0559	201,0546	-6,46
$C_{17}H_{20}NO_3^+$	286,1440	286,1438	-0,69
$C_{17}H_{19}NO_3Na^+$	308,1261	308,1257	-1,29
$C_{17}H_{19}NO_3K^+$	324,1011	324,0996	-4,63

Na análise do espectro de IES-EM da piperina é possível observar a presença dos íons de m/z 286, referente à piperina protonada $[M+H]^+$, m/z 308, referente à molécula cationizada com sódio ($[M + Na]^+$), m/z 324, referente à molécula cationizada com potássio ($[M + K]^+$), e m/z 201, resultado de dissociação da molécula na fonte. A coordenação com íons metálicos depende do número e da disposição espacial de átomos contendo pares de elétrons não ligantes (CROTTI *et al.*, 2006), como é o caso do átomo de oxigênio presente na molécula de piperina. Pode-se verificar também que esta sofre dissociação na fonte, através da presença do íon de m/z 201, referente ao fragmento formado pela quebra da ligação carbono nitrogênio da função amídica, resultando na perda neutra da porção piperidínica da piperina.

Na figura 18 está mostrado o espectro de íons produtos da molécula protonada. A piperina protonada (m/z 286) é precursora dos íons filhos de m/z 201, m/z 171, m/z 143, m/z 135 e m/z 115.

Figura 18. Espectro de íons de m/z 286 (IES-EM/EM, modo positivo; energia de colisão 5-20eV).

A tabela 6 mostra os principais íons observados no espectro de IES-EM/EM da piperina protonada (m/z 286) juntamente com o cálculo de erro, em ppm.

Tabela 6: Principais íons observados no espectro de IES-EM/EM da molécula de piperina protonada (m/z 286).

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{12}H_9O_3^+$	201,0560	201,0546	-6,90
$C_{11}H_7O_2^+$	171,0454	171,0440	-8,10
$C_{10}H_7O^+$	143,0489	143,0491	-1,30
$C_8H_7O_2^+$	135,0440	135,0440	0
$C_9H_7^+$	115,0532	115,0542	-8,60

Na figura 19 está descrita a via de fragmentação da piperina por IES-EM-EM proposta por BAJAD e colaboradores (2003).

Figura 19. Proposta de fragmentação da piperina por IES-MS/MS (BAJAD *et al.*, 2003).

De acordo com os autores, a molécula de piperina protonada forma o íon filho de m/z 201, com a perda do anel piperidínico de m/z 84. Após a formação do íon acílio, ocorreria um rearranjo do grupo metilenodioxifenil e perda de $CH_2=O$, o que resultaria na formação do íon de m/z 171. A formação do íon de m/z 115 seria resultado de uma contração de anel com eliminação de CO, com 28 u.m.a.

Os autores não explicam a formação do íon radical de m/z 143. A formação de íons radical na espectrometria de massas com ionização por electrospray é possível de ocorrer em casos específicos, sendo observada em alguns compostos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (VESECHI *et al.*, 2007).

A capacidade de uma molécula orgânica neutra de perder um elétron (oxidar-se) depende da energia do orbital ocupado de maior energia (HOMO). Esta energia pode ser estimada por cálculos teóricos, a partir de medidas experimentais do potencial de oxidação do analito (E_{ox}) ou da sua energia de oxidação em fase gasosa. Para compostos que exibem alta afinidade por prótons e funções básicas que servem como possíveis sítios de protonação, a protonação é a reação mais comum de ocorrer (VESECHI *et al.*, 2007). A formação de radicais no processo de fragmentação pode acontecer em casos raros, mas para isso são

necessárias condições especiais (CARDOZO *et al.*, 2008). Com base nessas informações, as propostas foram realizadas seguindo os conceitos de fragmentação em fase gasosa, e para IES foi proposto um novo mecanismo de fragmentação. Na figura 20 é proposta a via de fragmentação para a molécula de piperina protonada, seguindo da explicação para formação destes íons.

Figura 20. Proposta para a formação dos íons produtos da piperina protonada.

Neste caso o íon de m/z 171 seria formado a partir do íon de m/z 201, através de uma contração de anel com perda de $\text{CH}_2=\text{O}$ da porção metilenodióxido, com 30 u.m.a e formação de epóxido. O íon de m/z 171 sofreria então uma isomerização seguido de reações pericíclicas, ocorrendo a formação de um ligação δ a partir de uma ligação π com fechamento de anel. A perda de CO, com 28 u.m.a, levaria à formação do íon de m/z 143, sendo que a carga positiva permanece no carbono terciário, mais estável. Este íon então sofre uma contração de anel e perda de CO, gerando m/z 115.

O íon de m/z 201 pode sofrer ressonância das ligações duplas na molécula, perdendo um fragmento neutro com 66 u.m.a, formando o cátion benzila. Tem sido proposto que, na maior parte dos casos, o íon formado é o cátion tropílio e não o cátion benzila (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Sendo assim, o íon de m/z 135 foi proposto como sendo o íon tropílio resultado do rearranjo do cátion benzila.

A partir do íon m/z 201 também seria formado, em menor proporção, o íon de m/z 173, que pode ocorrer mantendo-se a porção metilenodióxido da molécula. Através de reações pericíclicas a partir do íon precursor, ocorre fechamento de anel com perda de CO com 28 u.m.a e formação de carga positiva, que é transferida para o carbono terciário mais estável.

4.3.2 Espectros de IES-EM e IES-EM/EM obtidos com os meios reacionais da piperina

A figura 21 traz o espectro de massas do meio reacional da piperina com a $[\text{Mn}(\text{TFPP})]\text{Cl}$, em modo positivo.

Figura 21. Espectro de IES-EM (alta resolução) da reação de oxidação da piperina com a MnTFPPCl (ionização *por electrospray*, modo positivo).

Através da comparação do espectro de IES-EM do padrão piperina em modo positivo (Figura 17) com o da reação de oxidação, é possível observar presença do íon de m/z 302, que é 16 unidades de massa maior que a piperina. Esta diferença de massa pode ser associada com a presença de um oxigênio, ou seja, ocorrer na formação de função álcool.

Com o objetivo de confirmação da fórmula estrutural do íon m/z 302, foram realizadas medidas das massas exatas (*accurate mass measurements*) com o produtos da reação de oxidação da piperina com diferentes MeP. As massas teórica e observada foram organizadas na tabela 7, juntamente com o erro em ppm.

De acordo com os dados obtidos foi possível confirmar que o íon de m/z 302 é referente ao produto monoidroxilado, pois todos os erros calculados foram inferiores que 10 ppm.

Tabela 7: Íons observados no espectro de IES-EM do meio reacional da piperina.

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{17}H_{19}NO_3^+$	286,1450	286,1438	-4,19
$C_{17}H_{19}NO_4^+$	302,1400	302,1386	-4,63
$C_{17}H_{18}NO_3Na^+$	308,1282	308,1257	-8,11

Na figura 22 está mostrado o espectro de massas acoplado do íon de m/z 302, referente ao produto monohidroxilado da piperina.

Figura 22. Espectros de IES-EM/EM do íon de m/z 302 com [Mn(TFPP)Cl], (modo positivo; energia de colisão 0-15eV), mostrando a fragmentação do produto monohidroxilado (m/z 302).

Com base na presença do íon m/z 201 nos espectros de IES-EM-EM de m/z 302, referente à quebra da ligação amídica, é possível sugerir que a oxidação da piperina ocorre no anel piperidínico. Tal padrão de oxidação foi encontrado também em estudo realizado por Melo *et al.* (2005), onde foi avaliada a oxidação biomimética do praziquantel por metaloporfirinas.

De acordo com as análises dos espectros de IES-EM/EM, e através da avaliação do perfil de oxidação da molécula de piperina, foi proposta a formação para o íon de m/z 284, conforme apresentado na figura 23.

Figura 23. Proposta para a formação dos íons produtos do produto de oxidação protonado (m/z 302), de m/z 284 e m/z 201.

A formação do íon de m/z 284 equivale a uma hidroxilação no anel piperidínico seguido de perda neutra de água, com formação de ligação dupla, conforme mecanismo anteriormente descrito.

4.4 Análise da piplartina e dos meios reacionais por CG-EM

4.4.1 Análise da piplartina por CG-EM

Na análise do cromatograma do padrão piplartina (figura 24) é possível verificar a presença de um pico em $t_R = 31,70$ min. A figura 25 apresenta o espectro de massas da piplartina, obtido por ionização por elétrons (EI-EM).

Figura 24. Cromatograma da piplartina.

Figura 25. Espectro de massas da piplartina, obtido por ionização por elétrons (EI-EM).

O espectro de massas da piplartina apresenta o íon molecular de m/z 317, os principais íons fragmentos de m/z 302, m/z 289 e m/z 274 sendo o pico base em m/z 221. Estes íons podem ter sido formados conforme proposto na figura 26.

Figura 26. Proposta para a formação dos principais íons fragmentos da piplartina por CG-EM.

A cisão homolítica entre a metila e o oxigênio da metoxila levaria à perda do radical $\cdot\text{CH}_3$, formando o íon de m/z 302. Sugere-se que a metoxila que sofre esta cisão seja a de posição para em relação à cadeia lateral, devido à estabilização do radical formado no anel, que assim tem a possibilidade de migrar para a cadeia lateral. O íon de m/z 302 poderia então sofrer uma contração de anel na lactama com perda de CO, formando o íon de m/z 274.

Outra via de fragmentação a partir do íon de m/z 317 é a formação do íon de m/z 289 a partir de uma contração do anel lactama, e a consequente formação a partir destes dois íons para o íon de m/z 221, que é o íon acílio, mais estável e pico base do espectro de massas. Este íon é formado através da cisão homolítica entre o nitrogênio e carbono da função amida que, no caso do íon de m/z 317 equivale à perda de 96 u.m.a e no íon de m/z 289 à perda de 68 u.m.a. O íon acílio serviu

de base para comparação com o espectro do íon produto para padrões de comparação e determinação do mecanismo de fragmentação do produto de oxidação formado a partir da piplartina com as metaloporfirinas.

A figura 27 mostra o cromatograma do meio reacional da piplartina, obtido com a $[\text{Fe}(\text{TFPP})]\text{Cl}$.

Figura 27. Cromatograma do meio reacional da piplartina com a $[\text{Fe}(\text{TFPP})]\text{Cl}$.

O cromatograma do meio reacional da piplartina com a $[\text{Fe}(\text{TFPP})]\text{Cl}$ mostra a formação de um pico com $t_R = 33.09$, relacionado à formação de um produto de oxidação. Pela análise do espectro de massas relacionado a este pico (Figura 28), o produto aparece com um pico de íon molecular de m/z 303.

Figura 28. Espectro de massas do pico produto da piplartina, obtido por ionização por elétrons (EI-EM).

A análise em modo SIM (Figura 29) mostra a diferença dos íons presentes na piplartina e no produto de oxidação. É possível verificar que o produto de oxidação de m/z 303 fragmenta nos íons principais de m/z 207, 175, 147 e 119. A ausência do íon acílio de m/z 221 no produto sugeriu que a oxidação ocorresse na porção trimetoxifenil da molécula.

Figura 29. Análise da Piplartina e do Produto de oxidação no modo SIM.

Tendo como base a formação do íon acílio como o mais estável na molécula de piplartina e as diferenças apresentadas nos espectros de massas do padrão e do produto de oxidação, foi proposta a formação do produto e fragmentação conforme mostrado na figura 30.

Figura 30. Proposta para a fragmentação do íon de m/z 303.

Através da proposta apresentada na figura 30 é possível sugerir que ocorra uma desmetilação em uma das metoxilas da porção trimetoxifenil da molécula de piplartina, formando o íon de m/z 303. Este íon sofre uma contração do anel lactâmico, perdendo CO e formando o íon de m/z 275.

É interessante observar a formação do íon acílio, de m/z 207, como de fundamental importância para determinação do perfil de oxidação da molécula. Se o produto oxidado mantivesse o íon de m/z 221, conforme observado no padrão piplartina, indicaria que a oxidação teria ocorrido no anel lactâmico. Porém, como ocorreu alteração na formação dos fragmentos é possível indicar uma oxidação ocorrendo na porção trimetoxifenil da molécula.

Na tentativa de determinar a estrutura exata do produto de oxidação procedeu-se à tentativa de isolamento do produto através da técnica de CLAE. Primeiramente foi injetado o padrão para determinar o tempo de retenção da molécula, e então o meio reacional da piplartina obtido com a $[Fe(TFPP)]Cl$, sendo observado o seguinte perfil demonstrado nas figuras 31 e 32.

Figura 31. Cromatograma do padrão piplartina por CLAE.

De acordo com o cromatograma apresentado na figura 32, é possível observar que a piplartina tem um $t_R=15,31$ minutos, absorvendo bem na região de UV de 300 nm. A partir de então foi injetado o meio reacional (figura 33), sendo possível distinguir bem os picos da piplartina (1) e do produto desejado para isolamento (2).

Figura 32. Cromatograma do meio reacional da piplartina com a $[Fe(TFPP)Cl]$ por CLAE.

O produto desejado apresentou um $t_R = 24,02$ minutos, estando bem separado do pico da piplartina que não reagiu na reação. Após a determinação do perfil cromatográfico da amostra, foi realizada a cromatografia em coluna preparativa, e recolhido o pico produto. Para verificar se este pico era realmente o do produto de oxidação, este foi enviado à análise por CG, onde foi confirmado ser o pico esperado.

O cromatograma por CG-EM (Figura 33) confirmou que o composto isolado se tratava do produto de oxidação da piplartina, mostrando um $t_R = 33,13$ minutos e um m/z de 303.

Figura 33. Cromatograma do produto de oxidação da piplartina por CG-EM.

4.5 Determinação estrutural da piplartina e de seus produtos de oxidação por IES-EM e IES-EM/EM

A figura 34 mostra o espectro de massas em alta resolução da piplartina em modo positivo, mostrando a presença dos íons principais de m/z 318, referente à molécula de piplartina protonada $[M + H]^+$, m/z 340 referente à piplartina cationizada com sódio $[M + Na]^+$, e m/z 356 com potássio $[M + K]^+$. O íon de m/z 221 é o íon acílio resultante da quebra da ligação amida da molécula.

Figura 34. Espectro de IES-EM da piplartina em alta resolução (ionização por *electrospray*, modo positivo).

A tabela 8 mostra os principais íons observados no espectro da piplartina juntamente com seus dados de massa teórica e cálculo de erro, em ppm, para confirmação das fórmulas moleculares.

Tabela 8: Principais íons observados no espectro de IES-EM da piplartina.

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{12}H_{13}O_4^+$	221,0807	221,0808	-0,40
$C_{17}H_{20}NO_5^+$	318,1336	318,1336	0
$C_{17}H_{18}NO_5Na^+$	340,1159	340,1155	-1,17
$C_{17}H_{18}NO_5K^+$	356,0891	356,0894	-0,84

A figura 35 mostra o espectro de massas do meio reacional da piplartina obtido com a $[Fe(TFPP)]Cl$ em modo positivo, com a presença dos íons principais de m/z 221, referente ao íon acílio, m/z 318 referente a piplartina protonada que não reagiu, m/z 340 referente a piplartina cationizada com sódio, m/z 350 referente à molécula monohidroxilada protonada e m/z 372 referente à molécula monohidroxilada cationizada com sódio.

Figura 35. Espectro de IES-EM em alta resolução da reação de oxidação com $[Fe(TFPP)]Cl$ (ionização por *electrospray*, modo positivo).

Com o objetivo de confirmação das fórmulas moleculares dos íons observados no espectro de massas, foram analisadas as massas do padrão piplartina e massas maiores em alta resolução com o objetivo de identificar a fórmula molecular dos compostos e seus respectivos erros em ppm, conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9: Principais íons observados no espectro de IES-EM do meio reacional da piplartina.

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{17}H_{20}NO_5^+$	318,1354	318,1336	-5,65
$C_{17}H_{18}NO_5Na^+$	340,1168	340,1155	-3,82
$C_{17}H_{20}NO_7^+$	350,1257	350,1234	-6,56
$C_{17}H_{19}NO_7Na^+$	372,1085	372,1054	-8,33

De acordo com o espectro de massas de alta resolução e pelo erro apresentando (menor que 10 ppm em todas as massas) é possível determinar a presença no espectro da piplartina protonada e sodiada, assim como do produto dihidroxilado protonado e sodiado.

Para verificar o perfil de fragmentação do produto dihidroxilado visando verificar a porção da molécula susceptível à oxidação foi realizada a técnica de IES-EM/EM com o íon de m/z 350. O espectro é apresentado na figura 36.

Figura 36. Espectros de IES-EM/EM do íon de m/z 350 com $[\text{Fe}(\text{TFPP})]\text{Cl}$, (modo positivo; energia de colisão 0-5eV), mostrando a fragmentação do produto dihidroxilado.

É amplamente aceito que o intermediário ferro-oxo de alta valência $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})\text{P}^+$ representa a espécie ativa na hidroxilação de alcanos por MeP, quando emprega-se doadores de átomos de oxigênios como o PhIO. O passo inicial do mecanismo envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do substrato pelo $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})\text{P}^+$, formando assim um substrato radical engaiolado e o complexo Fe^{IV} -hidróxido. A seguir, ocorre a recombinação do OH com o substrato radical, gerando um produto hidroxilado. Este mecanismo é conhecido como o modelo de recombinação de oxigênio, ou *oxygen rebound* (GROVES, 2000). A literatura mostra que nas oxidações biomiméticas por MeP realizadas em solventes menos polares (como DCM ou dicloroetano), a oxidação do cicloexano leva à formação predominante do álcool em relação à cetona (SANTOS, 2006; ASSIS *et al.*, 1995; GROVES; NEMO; MYERS, 1979). Considerando as informações contidas na literatura e os dados apresentados

no espectro de massas de alta resolução, a estrutura proposta para o produto de m/z 350 seria o produto dihidroxilado no anel lactâmico, ao invés de uma possível epoxidação na olefina.

No espectro de IES-EM/EM do íon de m/z 350, que foi caracterizado como o produto dihidroxilado, é possível observar a presença do íon acílio, de m/z 221, que comprova que a oxidação da molécula ocorre no anel lactâmico. A estrutura proposta para o produto dihidroxilado é mostrada na figura 37.

Figura 37. Estrutura sugerida para o íon de m/z 350 (produto dihidroxilado).

4.5.1 Espectro de IES-EM obtido com o produto de oxidação da piplartina isolado por CLAE

De acordo com o espectro de IES-EM obtido com a amostra do pico do produto isolado por CLAE (figura 38), foi possível verificar que esta amostra era composta por mais de um produto de oxidação.

Figura 38. Espectro de IES-EM em alta resolução do produto de oxidação isolado da piplartina.

Apesar de a análise por CG-EM ter indicado a presença de um único produto de oxidação de m/z 303, quando utilizada a técnica de ionização por *electrospray* foi possível identificar a presença de outro composto. O produto desmetoxilado aparece na forma cationizada com sódio, com m/z 326, sendo também observado o produto monohidroxilado da piplartina com sódio (m/z 356) e com potássio (m/z 372), sendo a fórmula molecular destes compostos comprovada através do cálculo do erro em ppm.

Existem pelo menos duas possibilidades para explicar o porquê dos produtos hidroxilados não aparecerem no cromatograma. A primeira seria relacionada à seletividade da técnica de cromatografia gasosa. De acordo com Bonato (2006), a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra. A segunda possibilidade poderia estar ligada à volatilidade dos compostos hidroxilados. A cromatografia gasosa é limitada a compostos que são voláteis ou podem tornar-se voláteis, e também são suficientemente estáveis para fluir através da coluna de CG (KITSON, LARSEN; McEWEN, 1996).

Considerando a volatilidade um fator essencial na técnica de CG-EM, pode ter ocorrido que a presença de hidroxila na porção lactama da molécula dos produtos hidroxilados aumentou a sua polaridade e diminuiu sua volatilidade, fato este que pode ter causado o não aparecimento destes compostos pela técnica de CG-EM nas condições experimentais que estavam sendo utilizadas (tipo de coluna, temperatura, tempo de análise).

Por outro lado, o *electrospray* é uma técnica branda de ionização que possibilita a análise de compostos mais polares e termicamente lábeis, incluindo moléculas de alto peso molecular como é o caso de proteínas. Estes fatores tornam a metodologia do *electrospray* muito mais abrangente em relação a limitações de uso (GATES *et al.*, 2007). Portanto, mesmo presente na amostra, os produtos hidroxilados podem não ter volatilizado nas condições de análise do CG-EM, fato este que explicaria a ausência destes no espectro. Já no espectro de *electrospray* o composto hidroxilado pôde ser observado, e o erro em ppm calculado com o objetivo de comprovar a fórmula molecular dos compostos e sua presença na amostra.

De acordo com os dados do massas de alta resolução (Tabela 10) e da massa teórica dos compostos analisados, que apresentam valores de erro em ppm menores que -10, é possível determinar que a estrutura é referente aos produtos demetoxilado mais sódio, confirmando os dados do CG-EM que indicou a presença deste composto como sendo de m/z 303, e monohidroxilado mais sódio e mais potássio.

Tabela 10: Principais íons observados no espectro de IES-EM do produto isolado da piplartina.

Fórmula Molecular	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
$C_{16}H_{17}NO_5Na^+$	326,1014	326,0999	-4,60
$C_{17}H_{19}NO_6Na^+$	356,1106	356,1104	-0,56
$C_{17}H_{19}NO_6K^+$	372,0844	372,0843	-0,27

De modo a determinar a porção da molécula onde ocorre a oxidação, no caso específico do produto monohidroxilado da piplartina, foi realizado o IES-EM/EM do íon de m/z 372.

No espectro apresentado na figura 39 é possível observar que o produto de m/z 372 fragmenta no íon acílio, de m/z 221, sugerindo que a oxidação ocorra no anel lactama da molécula da piplartina.

Figura 39. Espectro de IES-EM/EM do íon de m/z 372 com $[\text{Fe}(\text{TFPP})]\text{Cl}$, (modo positivo; energia de colisão 25eV).

5. CONCLUSÕES

Os estudos de oxidação biomimética com a piperina e a piplartina possibilitaram discutir e concluir que:

- a) As técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização por elétrons, e em especial a espectrometria de massas com *ionização* por *electrospray*, foram de extrema importância nos estudos da identificação estrutural e das vias de fragmentação destas moléculas, assim como no entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na sua oxidação .
- b) As metaloporfirinas utilizadas neste trabalho levaram a formação de produtos de oxidação. A piperina mostrou-se um substrato pouco reativo frente a todos os catalisadores utilizados, apresentando pequena formação de produtos de oxidação.
- c) A metaloporfirina fluorada [Fe(TFPP)]Cl demonstrou melhores resultados na formação do produto de oxidação no caso da piplartina, em relação às demais metaloporfirinas utilizadas no estudo.
- d) Através das técnicas de CG-EM, IES-EM e IES-EM/EM, foi possível determinar os produtos de oxidação formados a partir dos substratos, e através de sua via de fragmentação estabelecer a(s) porção (ões) da molécula onde ocorreu a oxidação.
- e) Nos estudos de oxidação com a piperina foi possível determinar a presença do produto hidroxilado, e na piplartina verificou-se a presença dos produtos desmetoxilado, hidroxilado e dihidroxilado.
- f) Por fim, este trabalho tem contribuição para a compreensão dos mecanismos de fragmentação destas moléculas, assim como na utilização de meios alternativos para mimetizar o metabolismo do citocromo P450, e produção de derivados biossintéticos da piplartina que podem auxiliar na compreensão das suas atividades biológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, M. D.; MELO, A. J. B.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Study of catalytic of nitro substituted ironporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 97, p. 41-47, 1995.
- BAJAD, S.; KHAJURIA, R.K.; SURI, O.P.; BEDI, K.L. Characterization of a new minor urinary metabolite of piperine, an omnipresent food component, by LC-MS/MS. **Journal of separation science**, v. 26, n. 9-10, p. 943-946, 2003.
- BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.; FURLAN, M. Chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899- 902, 1999.
- BALOGH, G.T.; KESERU, G.M. Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations. A useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalyzed oxidative metabolism. **ARKIVOC**, v. 7, p.124-139, 2004.
- BARNES, S.; PRASAIN, J.K.; WANG, C.C.; MOORE, D.R. Applications of LC-MS in the study of the uptake,distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2054-2059, 2006.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BERNARDOU, J.; MEUNIER, B. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topics in Catalysis**, v.21, n.1-3, p.47-54, 2002.
- BERNARDOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 346, n. 2-3, p. 171-184, 2004.
- BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; LOTUFO, L.V.C. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60(c), p. 539-543, 2005.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; LOTUFO, L.V.C. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alcaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and biological research**, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.
- BEZERRA, D.P.; MILITAO, G.C.G.; CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; LOTUFO, L.V.C. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, 1-8, 2007.
- BONATO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Ed. da Unicamp, Campinas-SP, p.203-270, 2006.
- CARDOZO, K.H.M.; VESSECCHI, R.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E.; GATES, P. COLEPICOLO, P.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. **International Journal of mass spectrometry**, *in press*.
- CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DENG, G.; SANIAL, G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 528-538, 2006.

DOLL, R.; PETRO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1191-1308, 1981.

DOLPHIN D., TRAYLOR, T. G., XIE, L. Y. Polyhaloporphyrins Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. **Accounts of Chemical Research**, v. 30, n. 6, p. 251-259, 1997.

DUH, C. Y.; WU, Y.C.; WANG, S.K. Cytotoxic pyridone alkaloids from Piper aborescens. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 2689-2691, 1990.

DUH, C. Y.; WU, Y. C. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of Piper aborescens. **Journal of Natural Products**, v.53, n. 6, p.1575-1577, 1990.

GATES, P.J.; SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C.A.; CROTTI, A.E.M.; VESSECHI, R.; LOPES, N.P. Mass spectrometry ionization techniques and applications for the analysis of organic compounds. In: TAFT, C.C.; SILVA, C.H.T.P. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**. Kerala: Research Signpost, p. 187-206, 2007.

GONSALVES, A.M.R. What do we know about metalloporphyrin catalytic oxidations? **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 39, n.3, p.499-509, 2002.

GROVES, J.T. Models and Mechanisms of Cythochrome P450 Action. In: MONTELLANO, P.R.O. **Cytochrome P-450: structure, mechanism and biochemistry**. 3.ed, Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 1-34, 2005.

GROVES, J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrin-catalyzed oxidations. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, West Sussex, v. 4, p. 350-352, 2000.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E. Aliphatic Hydroxylation Catalyzed by Iron Porphyrin Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 20, p. 6243-6248, 1983a.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E. Epoxidation Reactions Catalyzed by Iron Porphyrins. Oxygen Transfer from Iodosylbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 18, p. 5786-5791, 1983b.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E.; MYERS, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by ironporphyrine complexes, oxygen transfer from iodosilbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 101, p. 1032-1033, 1979.

HINO, F.; DOLPHIN, D. The biomimetic oxidation of dieldrin using polyhalogenated metalloporphyrins. **Chemical Communications**, v. 7, p.629-630, 1999.

IAMAMOTO, Y.; CIUFFI, K.J.; IWAMOTO, L. S.; SACCO, H. C.; MAURIN, A. J. M.; PRADO, C. M. C.; ASSIS, M. D. Factors affecting the catalytic activity of aryl substituted ironporphyrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.6, n.3, p.251-256, 1995.

KAIN, W., SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1994.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. **Molecular and cellular biochemistry**, v.189, n.1-2, p.113 – 118, 1998.

KITSON, F.G.; LARSEN, B.S.; McEWEN, C.N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry**. Ed. Academic Press, San Diego, 1996.

KONG, L.D.; CHENG, C.H.; TAN, R.X. Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n.2-3, p.351–355, 2004.

LEE, S.A.; HONG, S.S.; HAN, X.H.; HWANG, J.S.; OH, G.J.; LEE, K.S.; HWANG, B.Y.; RO, J.S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamineoxidase and antidepressant-like activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.7, p.832–835, 2005.

LI, S.; WANG, C.; WANG, M.; LI, W.; MATSUMOTO, K.; TANG, Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life sciences**, v.80, n.15, p.1373-81, 2007.

LIM, C.K.; LORD, G. Current developments in LC-MS in pharmaceutical analysis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.25, n.5, p.547-557, 2002.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, v.10, n.4-5, p.392-413, 2007.

McLAIN, J.L.; LEE, J.; GROVES, J.T. Biomimetic oxygenations related to cytochrome P450: Metal-Oxo and Metal-Peroxo intermediates. In: MEUNIER, B. **Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes**, Ed. Imperial College Press, New Jersey, 1999, p.91-155.

McMASTER, M.; McMASTER, C. **GC/MS: A practical user's guide**. Ed. Wiley-VCH, 1998, 167 p.

MELO, A.J.B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A.P.J.; SMITH, J.R.L.; SANTOS, M.D.; LOPES, N.P.; BONATO, P.S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.226, n.1, p. 23-31, 2005.

MEUNIER, B.; BERNARDOU, J. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topic in Catalysis**, v.21, n.1-3, p.47-54, 2002.

MONTELLANO, O.P.R. Oxygen Activation and Transfer. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. **Cytochrome P450: Structure, Function and Mechanism**, 2.ed., Ed. Plenum Press, New York, 1995, p. 245-303.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v.26, n.4, p.556-563, 2003.

NAVICKIENE, H.M.D.; ALECIO, A.C.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.D.; YOUNG, M.C.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.621 – 626, 2000.

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.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3.ed., Ed. Thomson Learning, 2001, p.306-357.

PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.28 (suplemento), s107-s111, 2005.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB(NF-kappa B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16-F melanoma cells. **International Immunopharmacology**, v.4, n.14, p.1795-1803, 2004.

RIBEIRO, T.S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; de LIMA, M.E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.14, n.13, p.3555-3558, 2004.

ROBARDS, K.; HADDAD, P.R.; JACKSON, P.E. **Principles and practice of modern chromatographic methods**. London, Boston : Academic Press, 1994. 495 p.

SALTZMANN, H.; SHAREFKIN, J.G. Iodobenzene. **Organic synthesis**, v.5, p.658, 1973.

SANTOS, M.D. *Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. 160 p. Tese de doutorado apresentada a FCFRP-USP. Ribeirão Preto, SP, 2006.

SANTOS, M.D.; MARTINS, P.R.; SANTOS, P.A.; BORTOCAN, R.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N.P. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26, n.1, p.62-70, 2005.

SCORZA, F.A.; GUERRA, A.B.G.; CAVALHEIRO, E.A.; CALIL, H.M. Neurogênese e depressão: etiologia ou nova ilusão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.27, n.3, p.249-253, 2005.

SELVENDIRAN, K.; PADMAVATHI, R.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice. **Fitoterapia**, v.76, n.3-4, p.296-300, 2005.

SELVENDIRAN, K.; SINGH, J.P.V.; SAKTHISEKARAN, D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.19, n.2, p.107-111, 2006.

SELVENDIRAN, K.; BANU, M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in swiss albino mice. **Clinica chimica acta**, v.350, n.1-2, p.73-78, 2004.

SILVA, E.M.J.; MACHADO, S.R. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p.117 – 124, 1999.

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, J.M.; BOLZANI, V.S.; MEDA, C.I.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.59, n.5, p.521 – 527, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed., Ed. Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 2000, 460 p.

SMOLINKA, K.; GÖBER, B. Biomimetic oxidation of denaverine hydrochloride. **European Journal of Organic Chemistry**, v.3, p.679-683, 1999.

SOUZA, J.N. **Metabolização biomimética oxidativa do antibiótico natural monensina A**. 76p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas-FCFRP-USP. Ribeirão Preto, SP, 2006.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.2, p. 339-346, 2004.

SUSLICK, K.S. Shape-selective oxidation by metalloporphyrins. In: KADISH, K.; SMITH, K.; GUILLARD, R. **The porphyrin handbook**, Ed. Academic Press: New York, p. 41-60, 1999.

SZALLASI, A. Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. **Trends in Pharmacological Science**, v.26, n.9, p.437-439, 2005.

TSAI, I.L.; LEE, F.P.; WU, C.C.; DUH, C.Y.; ISHIKAWA, T.; CHEN, J.J.; CHEN, Y.C.; SEKI, H.; CHEN, I.S. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from Piper arborescens. **Planta Medica**, v.71, n.6, p.535-542, 2005.

VESSECHI, R.; CROTTI, A.E.M.; GUARATINI, T.; COLEPICCOLO, P.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P. Radical ion generation processes of organic compounds in electrospray ionization mass spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.4, p.281-290, 2007.

VINHADO, F.S. **Modelos químicos do citocromo P-450: oxigenação de ligações C-H de alcanos catalisadas por metaloporfirinas sintéticas**. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP, 2005.