UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

EDGARD ANTONIO FERREIRA

2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq.)

São Paulo

Data de depósito na SPG:

05/08/2009

EDGARD ANTONIO FERREIRA

2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq.)

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

2009

Edgard Antonio Ferreira

2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq.)

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

Aprovado em:_____

Banca examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

À Deus.

Aos meus pais, Osvaldo e Margarida.

Às minhas irmãs, Gabriela e Marcela.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP, pelos recursos financeiros.

Ao Prof. Massuo Jorge Kato pela oportunidade, orientação, conselhos e a amizade criada ao longo deste trabalho.

À Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Rio de Janeiro pela classificação da planta.

À Dra. Maria Cláudia M. Young, Maura Casari e Vanessa Fuentes do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo pela realização do ensaio antifúngico.

Ao Dr. Gilberto Carlos Franchi Junior pela realização do ensaio antitumoral.

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

Aos funcionários da Central Analítica pela realização dos experimentos.

Ao técnico Joca por toda ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas do LQPN, Alberto, Adalberto, Aline, Anderson, Ari, Camila, Cícera, Érica, Felipe, Giovana, Homero, Joca, Juliana, Juliana Reigada, Karina, Lucas, Lydia, Mariana, Nídia e Renata por todos os ensinamentos e momentos que passamos juntos.

À Maria das Graças por toda ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas que fiz durante este período no IQ-USP, Aline Klaisen, Claudinei, Daniel, Denise, Karina, Renata e Ricardo.

Aos amigos e colegas de Belmay do Brasil por todo apoio e incentivo na realização deste trabalho, Airton, Andréia, Ari, Arnaldo, Atair, Claudinei, Cintia, Cintia Baradel, Cristiano, Edson, Elaine, Erika, Fátima, Fernando, Francisca, Jorge, José, Larita, Luciano, Maurício, Meire, Pedro, Rinaldo, Robson, Vandete, Walter e ao grande Warlão.

Aos meus amigos Alessandro, Alexandre Timóteo, Fabiano e Fábio de Jesus, por tudo que nos uniu e ainda nos unem de forma única. Quando penso em vocês, a palavra amizade realmente faz sentido.

A Regina Alves pela amizade e incentivo.

À Tatiana Watanabe por todo apoio e incentivo.

Aos amigos Daniel, Elaine, Evelin, Sebastião, Sérgio e Stela.

À Profa. Márcia Guekezian por todos os ensinamentos e incentivo desde os tempos de graduação.

À Profa. Paulete Romoff por todo apoio e incentivo ao meu ingresso no programa de pós-graduação.

Ao Prof. e amigo João Henrique G. Lago por todos os ensinamentos, conselhos, incentivo, apoio e atenção.

Aos meus pais por terem aceito, compreendido e apoiado minha decisão de trocar o certo pelo incerto. E hoje, tanto vocês como eu concordamos que optei pela escolha correta.

À Júlia Naomi Ikeda por todo apoio, incentivo, revisão ortográfica, por ser quem você é e principalmente por estar ao meu lado.

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

RESUMO

Ferreira, E. A. **2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq.)**. 2009. 139p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O extrato bruto da planta inteira (*Peperomia trineura*) foi submetido à cromatografia de adsorção em sílica gel, cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e CLAE semipreparativa, resultando no isolamento de cinco policetídeos inéditos em função do comprimento ou presença da insaturação na cadeia alquílica. A elucidação estrutural destes policetídeos foi realizada com base nas analises espectroscópicas de RMN 1D e 2D, infravermelho e espectrometria de massas de baixa e alta resolução. As frações provenientes do extrato bruto foram testadas frente a duas linhagens de células leucêmicas (K-562 e Nalm 6), apresentando atividades consideráveis. Já os policetídeos tiveram seu potencial antifúngico avaliado frente a duas espécies de fungos fitopatogênicas - *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* - e apresentaram atividade fraca e média variando de acordo com suas estruturas.

Palavras-chave: Piperaceae, *Peperomia trineura*, policetídeos, antifúngico, antitumoral.

ABSTRACT

Ferreira, E. A. **2-Acylcyclohexane-1,3-diones from *Peperomia trineura* (Miq.)**. 2009. 139p. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The crude extract of whole plant (*Peperomia trineura*) was subjected to adsorption chromatography on silica gel, preparative thin-layer chromatography (CCDP) and semi-preparative HPLC, resulting in the isolation of five novel polyketides with variable chain lenght or presence of unsaturation in the alkyl chain. The structural elucidation of these compounds was based on spectroscopic techniques for 1D and 2D NMR, infrared and low and high resolution mass spectrometry. The fractions from the crude extract were tested against the two leukemic cell lines (K-562 and Nalm 6), showing considerable activities. The polyketides were evaluated against the phytopathogenic fungi - *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* - and displayed low and medium activity.

Keywords: Piperaceae, *Peperomia trineura*, polyketides, antifungal, antitumour.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ácido acetilsalicílico e derivados. 20

Figura 2: Morfina. 21

Figura 3: Fonte de agentes terapêuticos 21

Figura 4: Paclitaxel (Taxol®) e seu derivado Docetaxel (Taxotere®). 28

Figura 5: Exemplos de policetídeos com atividade biológica. 29

Figura 6: Estrutura básica de uma 2-acil-cicloexano-1,3-diona. 31

Figura 7: Agentes antifúngicos. 36

Figura 8: Produtos naturais em fase de estudo clínico contra células cancerígenas. 37

Figura 9: Vinblastina, vincristina e seus derivados vindesina e vinorelbina. 38

Figura 10: *Piper nigrum* e a estrutura da amida aromática piperina. 39

Figura 11: Espécies de *Peperomia* utilizadas como plantas ornamentais. 42

Figura 12: *Peperomia trineura* 53

Figura 13: Placa cromatográfica delgada preparativa da fração PP5/6. 60

Figura 14: Cromatograma CLAE da mistura dos policetídeos **1**, **2** e **3** obtidos a partir da fração PP5/6 60

Figura 15: Cromatograma CLAE da fração PP10 que contém o policetídeo **5** 61

Figura 16: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico de *P. trineura*. 62

Figura 17: Algumas correlações HMBC do policetídeo **1**. 74

Figura 18: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 75

Figura 19: Ampliação da região de δ 6,17 a 7,43 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 75

Figura 20: Ampliação da região de δ 1,10 a 3,50 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 76

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 76

Figura 22: Ampliação da região de δ 0,0 a 130,0 e de δ 195,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 77

Figura 23: Mapa de contornos de ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 77

Figura 24: Ampliação da região de δ 0,0 a 3,2 do mapa de contornos de ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 78

Figura 25: Mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 78

Figura 26: Mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 79

Figura 27: Ampliação de região do mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 79

Figura 28: Ampliação de região do mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**. 80

Figura 29: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **1**. 80

Figura 30: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **1**. 81

Figura 31: Proposta de fragmentações para os íons observados no espectro de massas de baixa resolução do policetídeo **1**. 81

Figura 32: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **1**. 82

Figura 33: Algumas correlações HMBC dos policetídeos **2** e **3**. 86

Figura 34: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 86

Figura 35: Ampliação da região de δ 5,85 a 6,80 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 87

Figura 36: Ampliação da região de δ 0,9 a 3,2 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 87

Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 88

Figura 38: Ampliação da região de δ 0,0 a 150,0 e δ 194,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 88

Figura 39: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**...89

Figura 40: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 89

Figura 41: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 90

Figura 42: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 90

Figura 43: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, CDCl3) do policetídeo **2**. 91

Figura 44: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**. 91

Figura 45: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **2**. 92

Figura 46: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **2**. 92

Figura 47: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **2**. 93

Figura 48: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 95

Figura 49: Ampliação da região de δ 5,78 a 7,77 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.....95

Figura 50: Ampliação da região de δ 1,20 a 3,11 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 96

Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 96

Figura 52: Ampliação da região de δ 0,0 a 150,0 e de δ 194,0 a 208,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 97

Figura 53: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**...97

Figura 54: Ampliação da região de δ 0,0 a 3,8 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 98

Figura 55: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 98

Figura 56: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 99

Figura 57: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 99

Figura 58: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 100

Figura 59: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 100

Figura 60: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**. 101

Figura 61: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **3**. 101

Figura 62: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **3**. 102

Figura 63: Proposta de fragmentação para os policetídeos **2** e **3**. 102

Figura 64: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **3**. 103

Figura 65: Algumas correlações HMBC do policetídeo **4**. 106

Figura 66: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**. 107

Figura 67: Ampliação da região de δ 0,60 a 3,60 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**. 107

Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**. 108

Figura 69: Ampliação da região de δ 0,0 a 60,0; δ 129,0 a 131,0 e δ 194,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.....108

Figura 70: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.109

Figura 71: Ampliação da região de δ 0,0 a 5,6 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**. 109

Figura 72: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**. 110

Figura 73: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.....110

Figura 74: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.....111

Figura 75: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.....111

Figura 76: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **4**.....112

Figura 77: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **4**.....112

Figura 78: (a) Proposta de fragmentação para o policetídeo **4**. (b) Íons fragmentários que levaram a localização da ligação dupla do policetídeo **4**.....113

Figura 79: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **4**. 113

Figura 80: Algumas correlações HMBC do policetídeo **5**. 116

Figura 81: Visão 3D do sistema 3,6-hidróxi-2-cicloexen-1-ona. 116

Figura 82: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 117

Figura 83: Ampliação da região de δ 3,95 a 5,55 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 117

Figura 84: Ampliação da região de δ 0,80 a 3,50 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 118

Figura 85: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 118

Figura 86: Ampliação da região de δ 0,0 a 130,0; δ 129,6 a 130,2 e δ 195,0 a 206,3 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.....119

Figura 87: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.119

Figura 88: Ampliação da região de δ 0,0 a 5,7 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 120

Figura 89: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 120

Figura 90: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 121

Figura 91: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**. 121

Figura 92: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **5**. 122

Figura 93: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **5**. 122

Figura 94: (a) Proposta de fragmentação para o policetídeo **5**. (b) Íons fragmentários que levaram a localização da ligação dupla do policetídeo **5**.....123

Figura 95: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **5**. 123

Figura 96: Atividade das frações do extrato bruto contra células K562 e Nalm 6. .126

Figura 97: Proposta biossintética para policetídeos **1**, **2** e **3**. 129

Figura 98: Proposta biossintética dos policetídeos **4** e **5**. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os 24 produtos naturais aprovados para uso como drogas entre 1970 e 2006 22

Tabela 2: Ocorrência de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas em espécies de *Peperomia* e *Virola*. 32

Tabela 3: Ocorrência de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas em espécies de insetos.....33

Tabela 4: Produtos naturais de espécies de Piperaceae.....40

Tabela 5: Produtos naturais de espécies de *Peperomia*. 44

Tabela 6: Distribuição das massas após o fracionamento cromatográfico do extrato bruto. 58

Tabela 7: Distribuição das massas após o fracionamento cromatográfico da fração PP5. 59

Tabela 8: Gradiente dos solventes utilizados para as análises dos extraídos e frações de *Peperomia trineura*. 63

Tabela 9: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **1** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$). 82

Tabela 10: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **2** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$). 93

Tabela 11: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **3** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$). 103

Tabela 12: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN dos policetídeo **4** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$). 114

Tabela 13: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **5** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$). 124

Tabela 14: Atividade antifúngica dos policetídeos isolados de *Peperomia trineura* frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. 125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
$CDCL_3$	clorofórmio deuterado
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	coenzima A
COSY	homonuclear correlation spectroscopy
d	dupleto
dd	duplo dupleto
DMSO	dimetilssulfóxido
dt	duplo tripleto
EM	espectro de massas
EMIE	espectro de massas por impacto eletrônico
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
Hex	hexano
HRESI	high resolution electrospray ionization
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento em Hz
m	multipleto
$[M^+]$	íon molecular
MeOH	metanol
m/z	razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica em Da
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
PAL	fenilalanina-amonia-liase

PKS	policetídeo sintase
ppm	partes por milhão
rf	fator de retenção
RMN de ^{1}H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
s	simpleto
SAM	s-adenosilmetionina
t	tripleto
td	triplo dupleto
TMS	tetrametilsilano
u.m.a.	unidade de massa atômica
UV	ultravioleta
δ_H	deslocamento químico de hidrogênio (ppm)
δ_c	deslocamento químico de carbono (ppm)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....20

1.1. POLICETÍDEOS 29

1.1.1. 2-Acil-cicloexano-1,3-dionas 31

1.1. PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA. 34

1.2. PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL 36

1.3. A FAMÍLIA PIPERACEAE 38

1.4. GÊNERO *PEPEROMIA*.....41

1.4.1. Peperomia trineura (Miq.).....52

2. OBJETIVOS 54

3. MATERIAL E MÉTODOS.....55

3.1. GENERALIDADES METODOLÓGICAS 55

3.2. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO.....56

3.3. ANÁLISE PRELIMINAR DO EXTRATO BRUTO 57

3.4. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO 57

3.5. ANÁLISE POR CLAE 63

3.6. ISOLAMENTO DOS POLICETÍDEOS 1, 2 E 3 POR CLAE SEMIPREPARATIVA.....64

3.7. DADOS ESPECTROMÉTRICOS E PROPRIEDADES FÍSICAS DOS POLICETÍDEOS ISOLADOS DE *PEPEROMIA TRINEURA* 65

3.8. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....70

3.8.1. Avaliação da atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.....70

3.8.2. Avaliação da viabilidade celular de células K562 e Nalm6.....70

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....72

4.1. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....72

4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....73

4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA 125

4.1.1. Avaliação da atividade antifúngica.....125

4.1.2. Avaliação da viabilidade celular de células K562 e Nalm 6.....126

4.2. PROPOSTA BIOSSINTÉTICA PARA POLICETÍDEOS ISOLADOS.....127

4.2.1. Proposta biossintética para policetídeo **1**.....127

4.2.2. Proposta biossintética para policetídeos **2** e **3**.....128

4.2.3. Proposta biossintética para policetídeos **4** e **5**. 129

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....131

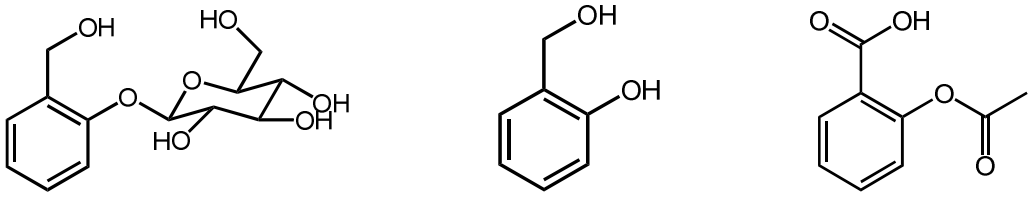
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....133

7. SÚMULA CURRICULAR.....138

1. INTRODUÇÃO

Desde tempos imemoráveis, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas condições de vida. O uso de plantas como alimento sempre existiu, mas o uso de plantas com o propósito medicinal para o tratamento de doenças teve inicio há aproximadamente 5000 anos. Manuscritos deixados por civilizações que viviam na China, Índia e países vizinhos, indicam que estes povos detinham amplo conhecimento sobre plantas medicinais (Hamburger e Hostettmann, 1991). Com o passar dos tempos a humanidade cada vez mais tomou conhecimento sobre a importância do uso de plantas para diversas finalidades e os produtos naturais têm sido uma valiosa fonte de compostos para muitas aplicações no campo da medicina, agricultura e biologia.

Os primeiros relatos sobre os benefícios das cascas de *Salix alba* (Salicaceae) e *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) vêm do século V a.C. em que a planta era utilizada para diminuir as dores do parto. Hoje se sabe que nas cascas de *Salix alba* (Salicaceae) e *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) contém derivados do ácido salicílico como a salicina e salicigenina (**Figura 1**) (Hostettmann *et al.*, 2003).



salicina saligenina ácido acetilsalicílico

Figura 1: Ácido acetilsalicílico e derivados.

Há 4000 anos a.C. os sumérios utilizavam a papoula (*Papaver somniferum*) por suas propriedades analgésicas, em que o composto majoritário é a morfina

(**Figura 2**), um alcalóide com propriedade narcótica, utilizada como analgésico(Hostettmann *et al.*, 2003).

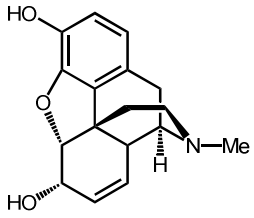


Figura 2: Morfina.

No início do século XIX com o advento da química farmacêutica, as plantas tornaram-se a principal fonte de recursos para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste período, a área de fármacos sintéticos desenvolveu-se enormemente em busca de novas drogas. Porém, os compostos de origem natural são considerados indispensáveis, pois além de seu uso direto como fármacos, também são utilizados como protótipos para a síntese de compostos biologicamente ativos; submetidos a modificações estruturais na busca do aumento de sua atividade biológica e/ou para diminuir sua toxicidade (**Figura 3**) (Hostettmann *et al.*, 2003).

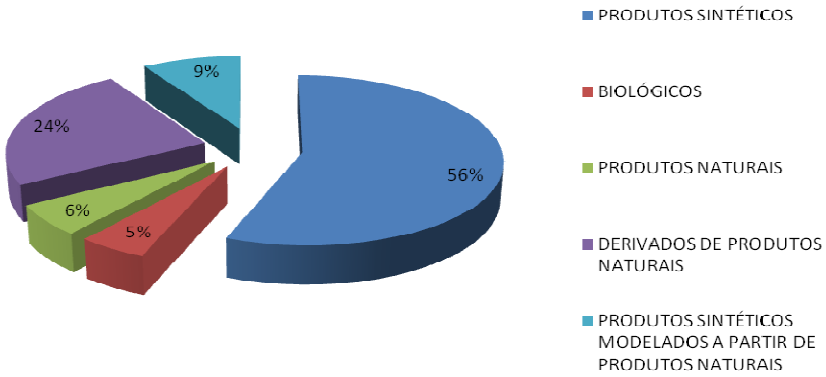
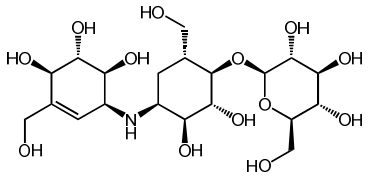
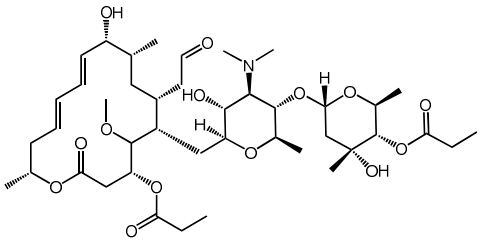
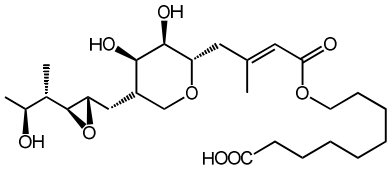
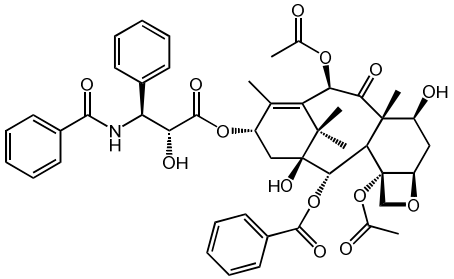
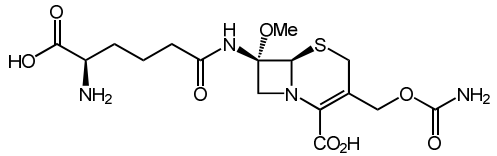
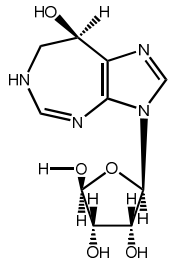
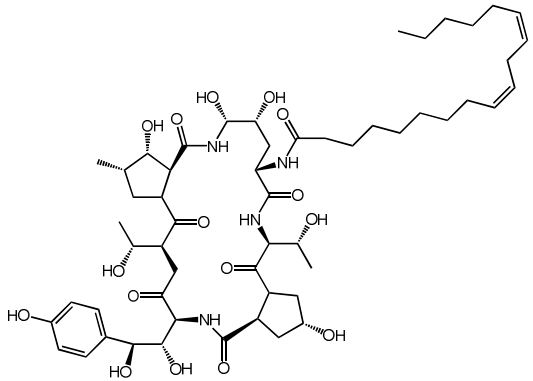
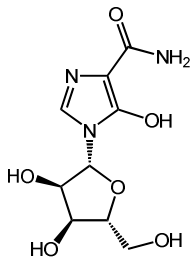


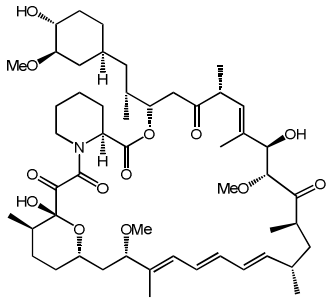
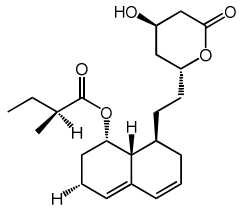
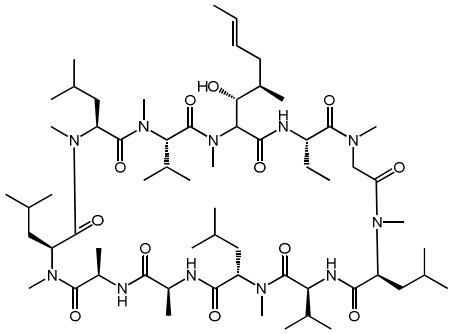
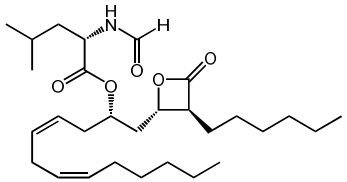
Figura 3: Fonte de agentes terapêuticos (Hostettmann *et al.*, 2003).

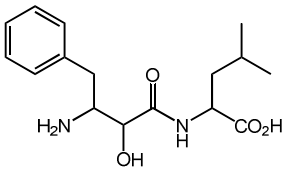
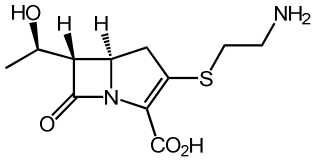
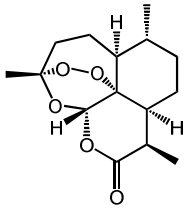
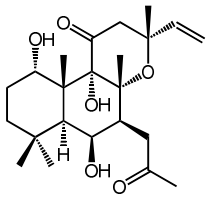
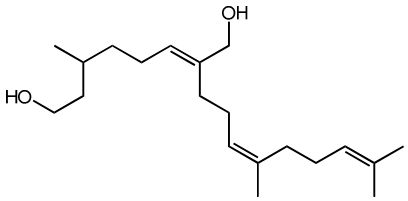
No período de 1970 a 2006, 24 produtos naturais oriundos de plantas, fungos e bactérias tiveram aprovação para uso como droga (**Tabela 1**) (Ganesan, 2008).

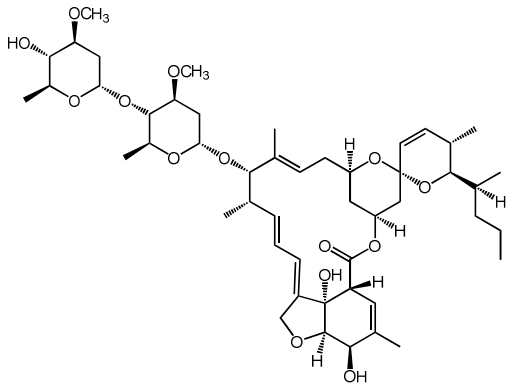
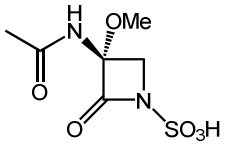
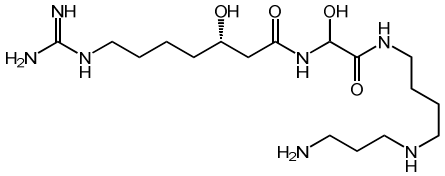
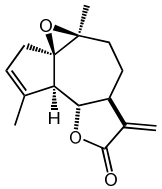
Tabela 1: Os 24 produtos naturais aprovados para uso como drogas entre 1970 e 2006 (Ganesan, 2008).

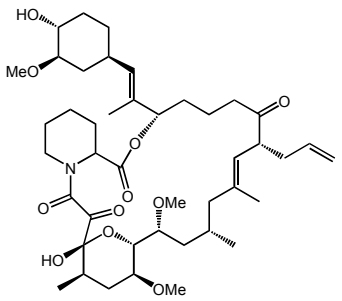
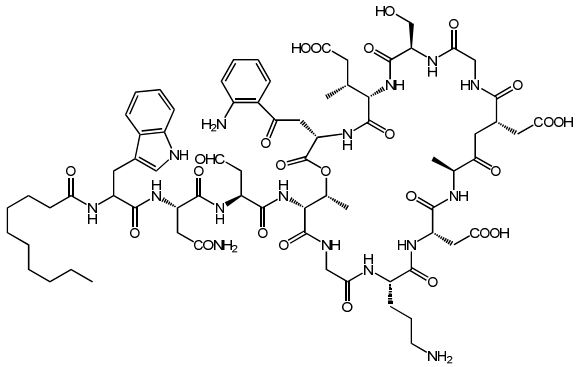
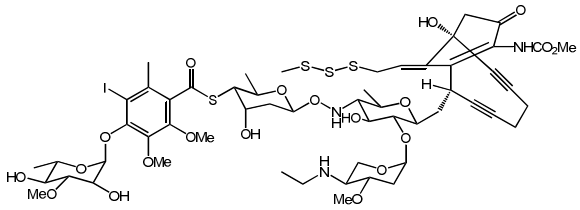
Nome, Ano da descoberta e classe do composto	Estrutura	Origem	Descobridor	Nome comercial e ano de introdução no mercado
Validamicina, 1970 Oligosacarídeo		Actinomiceto	Takeda (Japão)	Acarbose, 1990 Voglibose, 1994
Midecamicina,1971 Macrolídeo		Actinomiceto	Meiji (Japão)	Miocamicina, 1985
Ácido pseudomonico, 1971 Policetídeo		Bactéria	Beecham (UK)	Mupirocina, 1995
Taxol, 1971 Diterpeno		Planta	Res Triangle Inst/NIH (USA)	Paclitaxel, 1993 Docetaxel, 1995

Cefamicina C, 1971 β-lactama		Actinomiceto	Lilly (USA)	Moxalactama, 1982 Cefotetama, 1984 Cefbuperazona, 1985
Coformicina, 1974 Nucleosideo		Actinomiceto	Inst Microbial Chem (Jap)	Pentostatina, 1992
Equinocardina B, 1974 Ciclopeptídeo		Fungo	Ciba-Geigy (Sui)	Caspofungina, 2001 Micafungina, 2002 Anidulafungina, 2006
Mizoribene, 1974 Nucleosídeo		Fungo	Toyo (JAP)	Mizoribina, 1984

Rapamicina, 1974 Policetídeo		Actinomiceto	Ayerst (CAN)	Sirolimus,1999 Everolimus, 2004 Anidulafungina, 2006
Compactina, 1975 Policetídeo		Fungo	Sankyo (JAP)	Lovastatina, 1984 Simvastatina, 1988 Pravastatina, 1989 Fluvastatina, 1994 Atorvastatina, 1997 Cerivastatina, 1997 Pitavastatina, 2003 Rosuvastatina, 2003
Ciclosporina A, 1975 Ciclopeptídeo		Fungo	Sandoz (SUI)	Ciclosporina, 1983
Lipstatina, 1975 Policetídeo		Actinomiceto	Roche (SUI)	Orlistati, 1987

Bestatina, 1976 Peptideo		Actinomiceto	Inst Microbial Chem (JAP)	Ubenimex, 1987
Tienamicida, 1976 β-lactama		Actinomiceto	Merck (USA)	Imipenema, 1985 Meropenema, 1994 Panipenema, 1994 Faropenema, 1997 Biapenema, 2002 Ertapenema, 2002 Doripenema, 2005
Artemisinina, 1997 Sesquiterpeno		Planta	Qinghaosu Res Grp (PRC)	Artemsinina, 1987 Artemeter, 1987 Artenusato, 1987 Arteter, 2000
Forscolina, 1977 Diterpeno		Planta	Hoechst (IND)	Colforsina, 1999
Plaunotol, 1977 Diterpeno		Planta	Sankyo (JAP)	Plaunotol, 1987

Avermectina B_1a, 1979 Policetídeo		Actinomiceto	Kitastato Inst (JAP)/Merck (USA)	Ivermectina, 1987
SQ26, 180, 1981 β-lactama		Actinomiceto	Squibb (USA)	Aztreonam, 1984 Carumonam, 1988
Espergualina, 1981 Peptídeo		Bactéria	Inst Microbial Chem (JAP)	Gusperimus, 1994
Arglabina, 1982 Sesquiterpeno		Planta	Inst Phytochem (USSR)	Arglabina, 1999

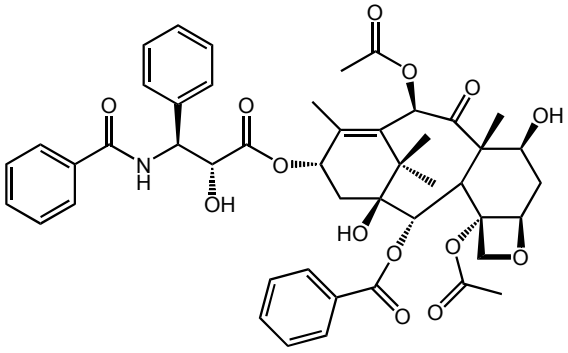
FK506, 1984 Policetídeo		Actinomiceto	Fujisawa (JAP)	Tacrolimus, 1993
Daptomicina, 1986 Ciclodepsipeptideo		Actinomiceto	Lilly (USA)	Daptomicina, 2003
Caliqueamicina, 1988 Policetídeo		Actinomiceto	Lederle (USA)	Gemtuzumab, 2000

Um número significante de produtos naturais disponíveis hoje para uso comercial tem como origem as plantas superiores (Soejarto, 1996).

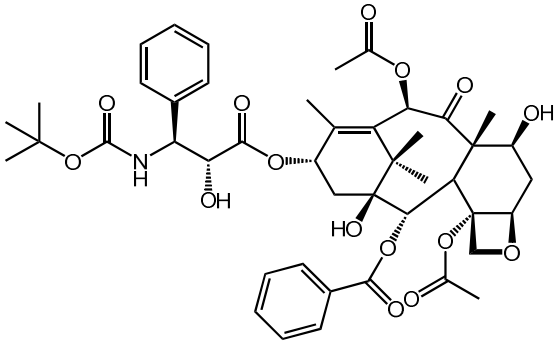
O número de plantas foi estimado em 500.000 espécies (Dixon, 1999), mas somente de 15 a 17% dessas espécies foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996). Tal fato desperta interesse de grandes empresas na busca de novos compostos de origem vegetal com atividade biológica (Hamburger e Hostettmann, 1991).

Os produtos naturais de origem vegetal apresentam uma grande variedade de classe de compostos e estruturas que incluem alcalóides, terpenos, flavonóides, policetídeos, fenilpropanóides, entre outros (Wink, 2003).

Um dos mais conhecidos produtos naturais, o taxol - um diterpeno (**Figura 4**) que apresenta atividade contra câncer de mama e ovário - é extraído da casca do pinheiro *Taxus brevifolia* (Taxaceae) e das folhas de várias espécies de *Taxus.* Sua aprovação junto ao FDA ocorreu em dezembro de 1992 (Ganesan, 2008).



Taxol®



Taxotere®

Figura 4: Paclitaxel (Taxol®) e seu derivado Docetaxel (Taxotere®).

1.1. Policetídeos

Os policetídeos representam uma importante classe de produtos naturais, podendo ser encontrados em diversos organismos, incluindo bactérias, plantas e fungos (Staunton e Weissman, 2001; Austin e Noel, 2003). Apresentam grande variedade estrutural, incluindo estruturas das mais simples como o ácido 6-metilsalicílico até estruturas bem complexas como a anfotericina B (**Figura 5**). Também se destacam como compostos biologicamente ativos, incluindo a atividade antibiótica, antitumoral, antifúngica, antiparasitária e propriedades imunossupressoras (Staunton e Weissman, 2001).

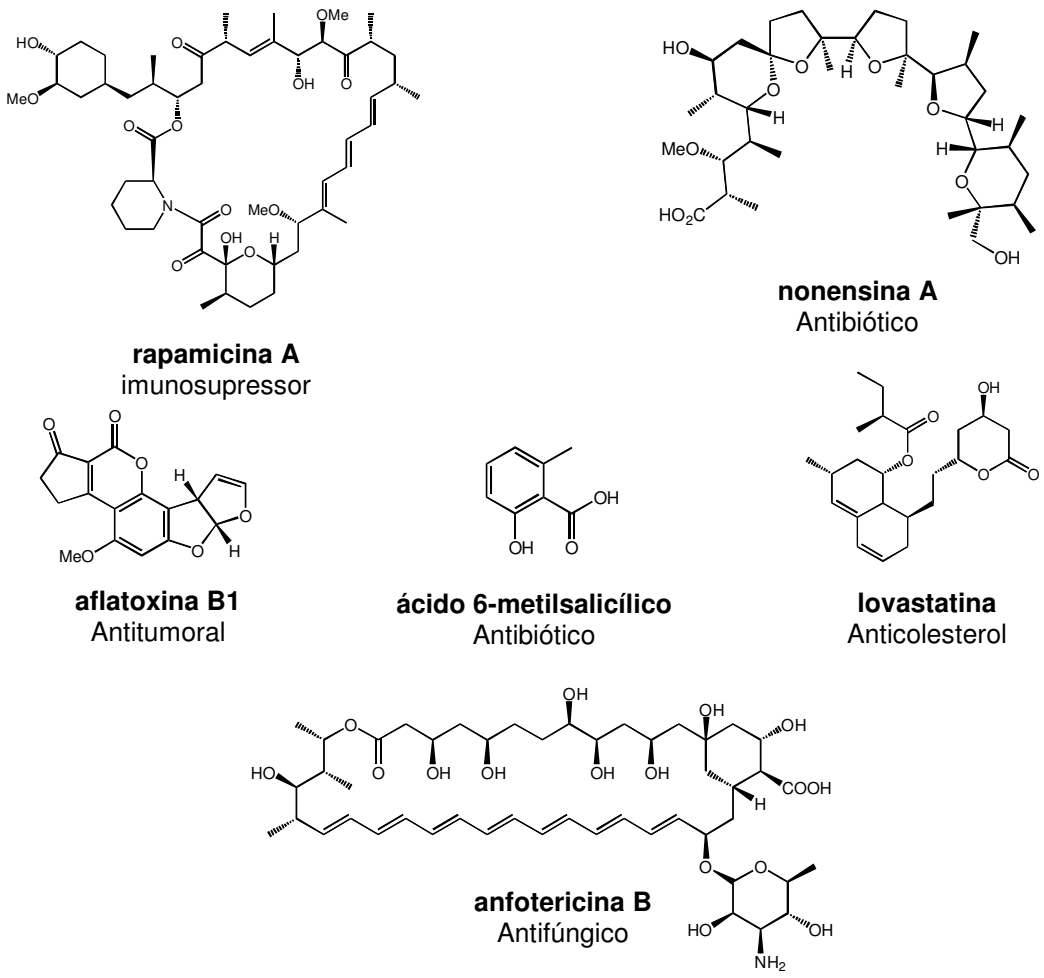


Figura 5: Exemplos de policetídeos com atividade biológica.

A biossíntese dos policetídeos de estruturas complexas e a dos ácidos graxos estão intimamente relacionadas. Suas rotas biossintéticas apresentam muitas semelhanças no que diz respeito à formação da cadeia alquílica, onde estão envolvidas etapas de condensação, redução, desidratação, além de apresentarem precursores em comum (Austin e Noel, 2003).

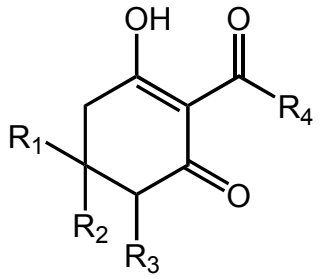
As enzimas envolvidas nos processos de formação dos policetídeos são denominadas de PKSs (policetídeo sintases), sendo estas classificadas em três tipos: PKS I, PKS II e PKS III (Staunton e Weissman, 2001; Austin e Noel, 2003).

- PKS I: Enzima multifuncional organizada em módulos, responsável pela síntese de macrolídeos - como a rapamicina A (**Figura 5**). Este tipo de enzima é análogo às enzimas encontradas nos vertebrados responsável pela síntese de ácidos graxos e está tipicamente envolvida na biossíntese de policetídeos em fungos.
- PKS II: Complexo enzimático monofuncional. Os sítios ativos estão distribuídos entre polipeptídios pequenos e monofuncionais. Catalisa a formação de compostos que requerem aromatização e ciclização. Estão envolvidas na biossíntese de produtos naturais de bactérias.
- PKS III: Responsável pela biossíntese de chalconas e estilbenos em plantas e poliidroxifenóis em bactérias. São proteínas pequenas com uma cadeia polipeptídica simples.

1.1.1. 2-Acil-cicloexano-1,3-dionas

Os policetídeos denominados 2-acil-cicloexano-1,3-dionas (**Figura 6**) são de ocorrência restrita na natureza, sendo encontrados somente em espécies dos gêneros *Peperomia* (Piperaceae), *Virola* (Myristicaceae) (**Tabela 2**) e em larvas de insetos das ordens *Lepidoptera* e *Hymenoptera* (**Tabela 3**). Neste último caso, atuam como cairomônios para parasitóides. Os cairomônios constituem-se numa classe de produtos que favorecem indivíduos de outras espécies (receptor), atuando como hormônios de oviposição dos parasitóides (Sbarbati e Osculati, 2006).

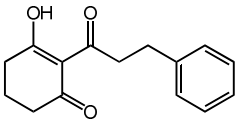
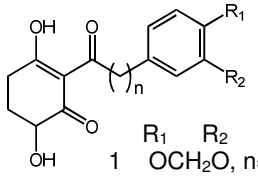
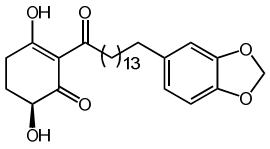
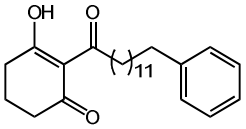
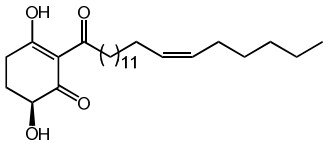
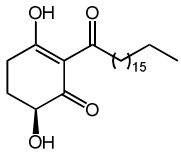
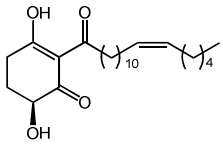
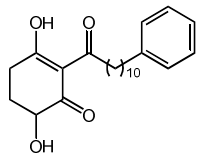
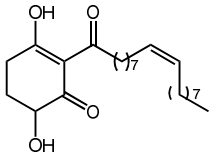
Alguns relatos encontrados na literatura indicam que estes policetídeos são promissores agentes antitumorais (**Tabela 2**).



R_1=R_2= H, CH_3, OH
R_3=H, OH
R_4= CH_3, fenila, alquila, alquilfenol.

Figura 6: Estrutura básica de uma 2-acil-cicloexano-1,3-diona.

Tabela 2: Ocorrência de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas em espécies de *Peperomia* e *Virola*.

Espécie	Atividade	Estrutura	Referências
Peperomia dindygulensis	-		(Wu *et al.*, 2005)
P. duclouxii	Citotóxica contra células WI-38, VA-13 e HepG2	 R1 R2 1 OCH_2O, n=8 2 OCH_2O, n=10 3 OCH_2O, n=12 4 OCH_2O, n=14 5 H H, n=12	(Li *et al.*, 2007b)
P. sui	Citotóxica contra células HONE-1 e NUGC-3	  	(Cheng *et al.*, 2003)
P. proctorii	-	 	(Seeram *et al.*, 2000)
Virola elongata	-	 	(Kato *et al.*, 1985)

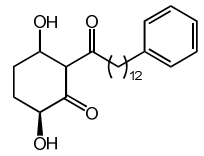
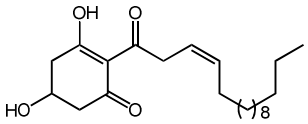
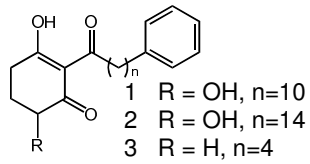
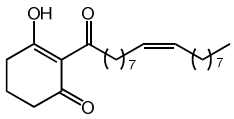
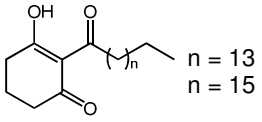
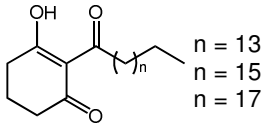
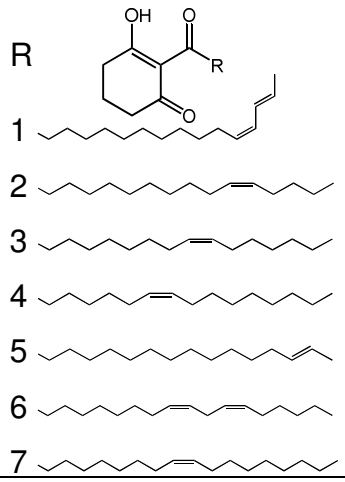
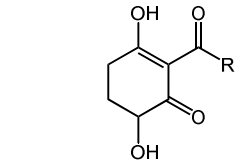
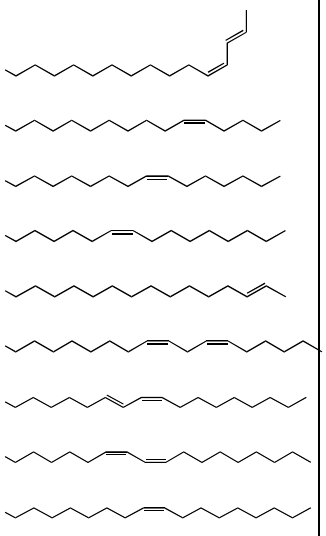
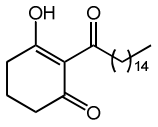
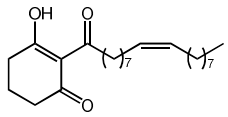
V. oleifera	-		(Azevedo *et al.*, 1997)
V. sebifera	Antiproliferativa frente a células OVCAR03 e NCI-ADR		(Denny *et al.*, 2008)
V. surinamensis	-		(Blumenthal *et al.*, 1997)
			

Tabela 3: Ocorrência de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas em espécies de insetos.

Espécie	Ordem	Atividade	Estrutura	Referência
Venturia canescens	Hymenoptera	Cairomonal		(Nemoto, 1987)
Plodia interpunctella	Lepidoptera			
Cadra cautella	Lepidoptera	Cairomonal		
Ephestia kuehniella	Lepidoptera	Cairomonal		(Mudd, 1983)

Ephestia kuehniella	Lepidoptera	Cairomonal	 R 	(Mudd, 1983)
Plodia interpunctella	Lepidoptera	Cairomonal	 	(Kuwahara *et al*., 1983)

1.1. Produtos naturais com atividade antifúngica.

Devido ao aumento da resistência microbiana e de infecções causas por fungos, é constante a busca por agentes antifúngicos mais eficazes e com um amplo espectro de ação. Além de seu uso como medicamento, os produtos antifúngicos encontram uso na agricultura, conservação de alimentos e cosméticos (Hadacek e Greger, 2000; Barrett, 2002). E, nesse sentido, os produtos naturais oriundos de

micro-organismos e plantas são as principais fontes de potenciais produtos (Fenner *et al.*, 2006).

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

Um dos mais potentes agentes antifúngicos é a anfotericina B (**Figura 7**). Ela atua ligando-se a um constituinte da membrana plasmática (ergosterol), alterando a permeabilidade da membrana celular e ocasionando a perda de constituintes do citoplasma. Dessa forma, causa modificações no metabolismo do fungo, levando-o à morte celular (Martinez, 2006). Porém, a anfotericina B acarreta efeitos colaterais, limitando seu uso clínico.

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

Uma doença conhecida como carvão interno, que ocorre nos frutos do mamão, deixa a fruta numa condição inapropriada para o seu consumo. O fungo mais frequentemente encontrado nos frutos doentes é o *Cladosporium cladosporioides (*Vieira *et al.,* 2005).

O *Cladosporium* é um dos maiores e mais heterogêneos gêneros de *hifomicetos*. Suas espécies podem ser endofíticas, patogênicas humanas, fitopatogênicas e saprófitas (Crous *et al.*, 2007).

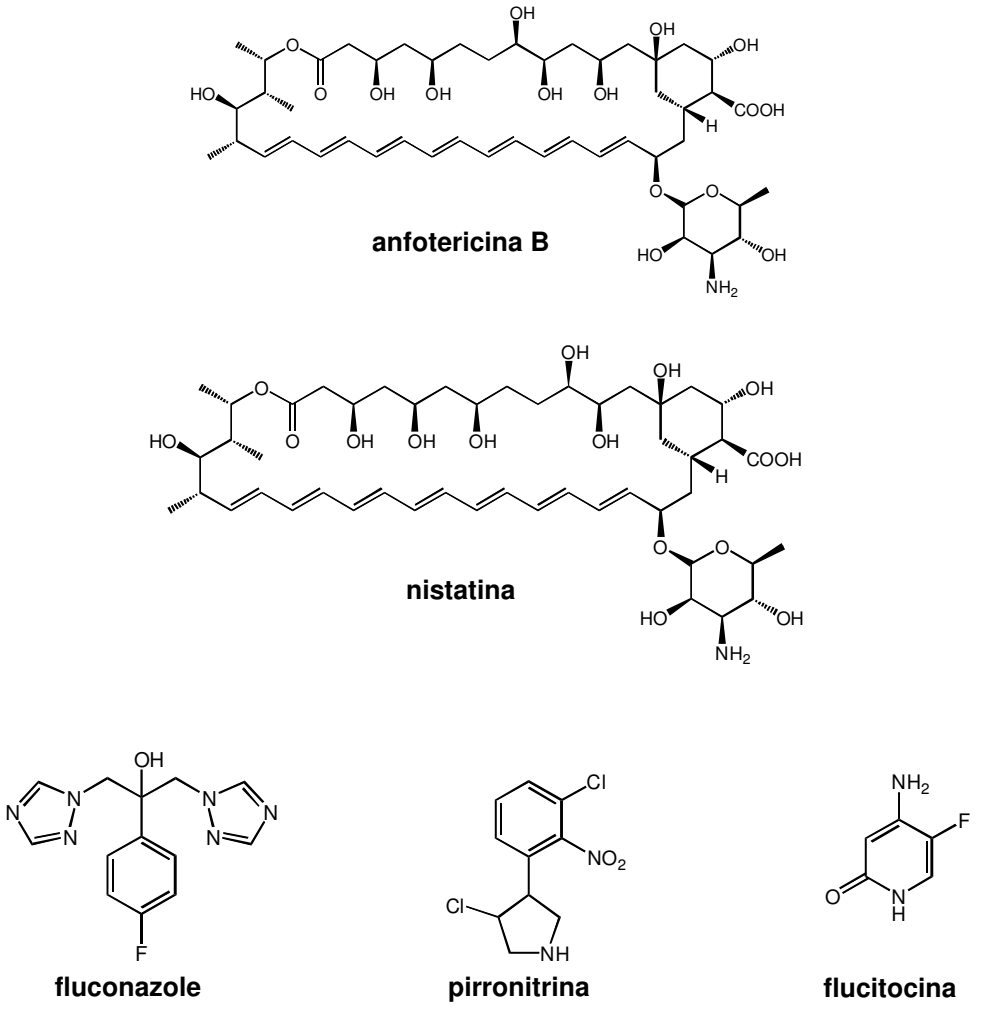


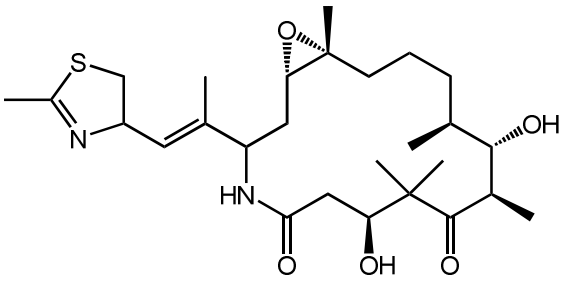
Figura 7: Agentes antifúngicos.

1.2. Produtos naturais com atividade antitumoral

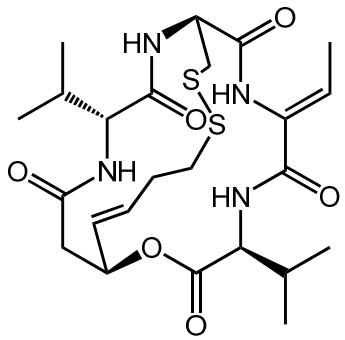
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2005, das 58 milhões de mortes, 7,6 milhões são atribuídas aos mais diversos tipos de câncer existentes (Cossy, 2008). No entanto, mais de 90% dos tumores podem ser prevenidos. Afinal, cigarro, álcool, poluição, raios ultravioleta e dieta são os maiores responsáveis por este índice (Aggarwal *et al.*, 2008). Dentro deste quadro, a busca por agentes antitumorais torna-se incessante, e os produtos de origem natural são uma das

principais fontes de recursos para aquisição e desenvolvimento de novas drogas. Mais da metade das drogas atualmente comercializadas são produtos naturais ou relacionadas à eles (Newman e Cragg, 2007). Considerando os agentes antitumorais, esta proporção supera 60% (Gordaliza, 2007).

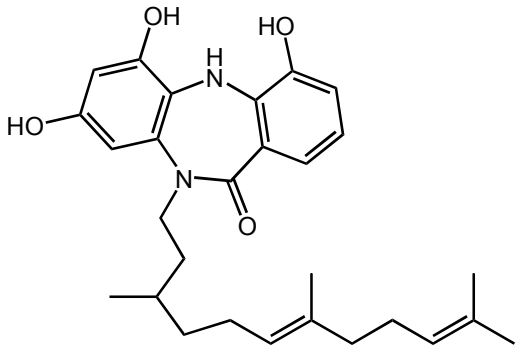
Atualmente, mais de 30 compostos de origem natural estão em diferentes fases de estudo clínico para os mais diversos tipos de câncer (**Figura 8**) (Gordaliza, 2007).



ixabepilona



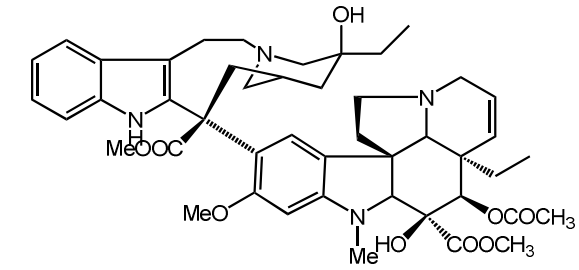
romidepsina



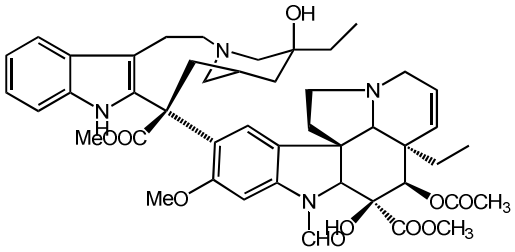
ECO-4601

Figura 8: Produtos naturais em fase de estudo clínico contra células cancerígenas.

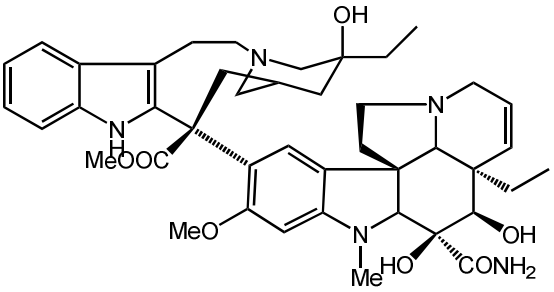
Entre os produtos naturais oriundos de plantas com atividade antitumoral destacam-se o paclitaxel e docetaxel com atividade contra câncer de mama e ovário, além da vinblastina, vincristina e seus derivados vindesina e vinorelbina (**Figura 9**).



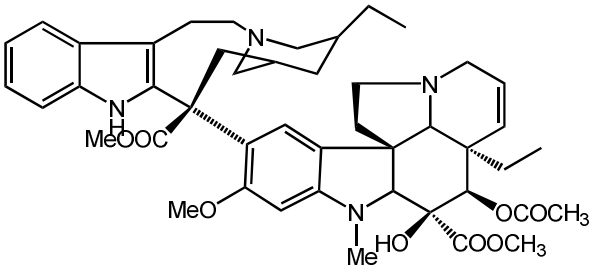
vinblastina



vincristina



vindesina



vinorelbina

Figura 9: Vinblastina, vincristina e seus derivados vindesina e vinorelbina.

1.3. A família Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales, e suas espécies estão distribuídas entre cinco gêneros: *Macropiper, Zippelia, Piper, Peperomia* e *Manekia* (Jaramillo *et al.*, 2004). Estes últimos três são encontrados no Brasil sobretudo nas florestas Atlântica e Amazônica (Monteiro e Guimarães, 2008). Os gêneros mais representativos, em número de espécies, são *Piper* e *Peperomia,* com aproximadamente 2000 e 1600 espécies, respectivamente (Wanke *et al.*, 2006).

Um grande número de espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Scott *et al.*, 2005) sob porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo, com

árvores podendo alcançar mais de três metros de altura (Figueiredo e Sazima, 2000).

A espécie mais conhecida da família Piperaceae e pertencente ao gênero *Piper é a Piper nigrum* (**Figura 10**), popularmente conhecida como "pimenta-do-reino". Suas sementes, são utilizadas popularmente como tempero, e possuem grande importância econômica mundial há muitos anos. As substâncias responsáveis pelo seu sabor picante são as amidas aromáticas, destacando-se a piperina.

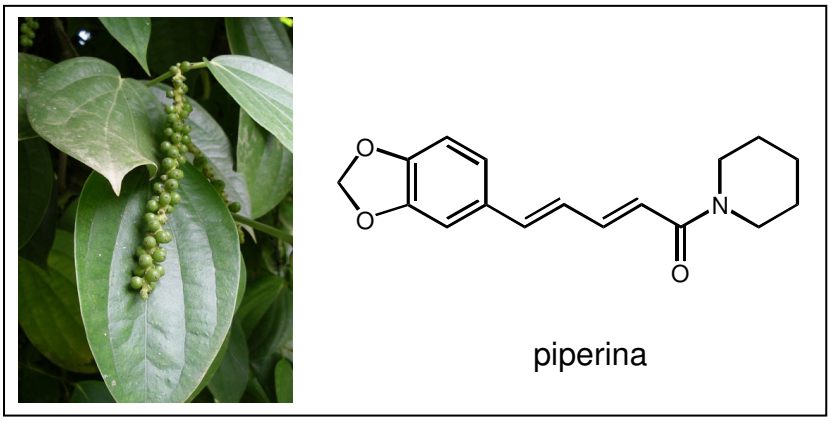
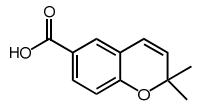
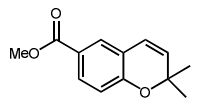
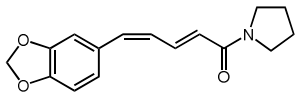
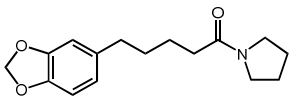
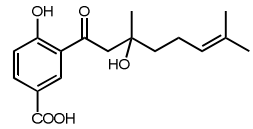
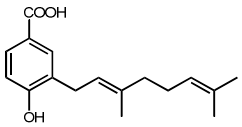
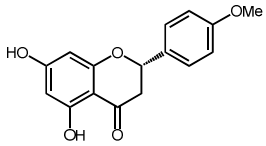
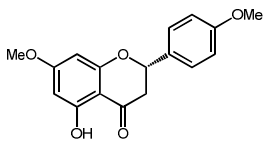
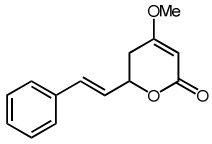
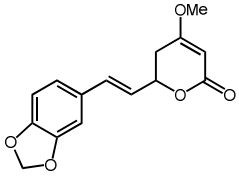
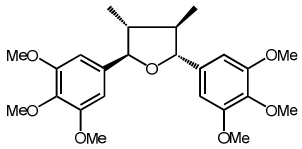
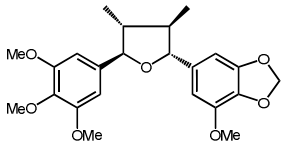
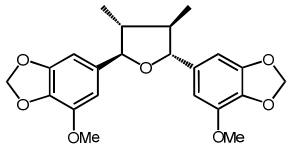
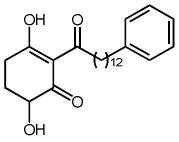
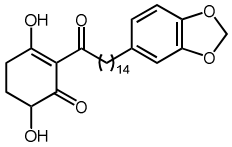


Figura 10: *Piper nigrum* e a estrutura da amida aromática piperina.

Além das amidas, espécies da família Piperaceae apresentam em sua composição química fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, ácidos benzóicos, cromenos, alcalóides, policetídeos, flavonóides e pironas (**Tabela 4**). Devido a grande variedade de metabólitos secundários, a família Piperaceae tem sido uma importante fonte de compostos biologicamente ativos (Scott *et al.*, 2005; Kato e Furlan, 2007) (**Tabela 4**).

Tabela 4: Produtos naturais de espécies de Piperaceae.

Espécie	Atividade	Estrutura	Classe de compostos	Referência
Piper aduncum	Antitumoral fraca	 	Cromenos	(Baldoqui *et al.*, 1999)
P. arboreum	Antifúngica	 	Amidas/ Alcalóides	(Silva *et al.*, 2002)
P. crassinervium	Antifúngica	 	Ácido benzóico/ Hidroquinonas	(Danelutte *et al.*, 2003)
P. marginatum	Antifúngica	 	Flavanóides	(Reigada *et al.*, 2007)
P. methysticum	Antitrombótica		Pironas	(Gleitz *et al.*, 1997)
	Antagônica sobre estricnina			(Kretzschmar *et al.*, 1970)

P. solmsianum	Tripanocida		Lignanas	(Martins *et al.*, 2003)
				
				
Peperomia duclouxii	Citotóxica contra células WI-38, VA-13 e HepG2		Policetídeos	(Li *et al.*, 2007b)
				

1.4. Gênero *Peperomia*

O gênero *Peperomia* é o segundo maior em quantidade de espécies da família Piperaceae, compreendendo de 1500 a 1700 espécies (Wanke *et al.*, 2007).

São plantas epífitas, rupículas, terrestres ou suculentas, encontradas em regiões de florestas úmidas e áreas montanhosas (Monteiro e Guimarães, 2008). A maioria de espécies ocorre nos neotrópicos, seguidas pelo sul da Ásia com aproximadamente 100 espécies; África com cerca de 20 espécies; Madagascar, com aproximadamente 40 espécie; Nova Zelândia e Austrália com menos de 20 espécies

(Wanke *et al.*, 2006). Também podem ser encontradas no sul da América do Norte e no Norte da América do Sul (Mathieu, 2007).

Muitas espécies são cultivadas e comercializadas mundialmente como plantas ornamentais (**Figura 11**).

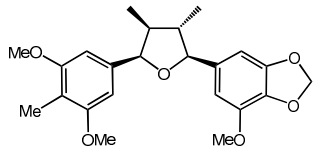
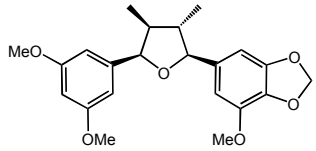
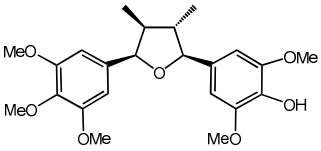
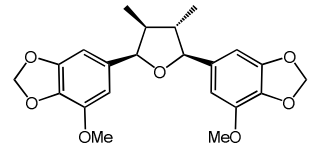
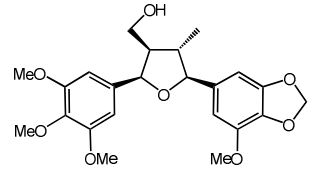
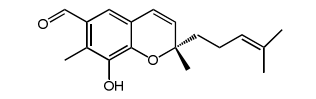
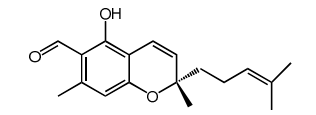
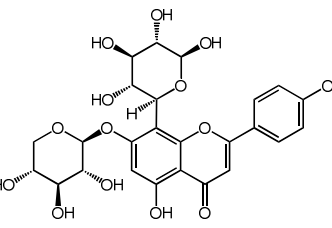
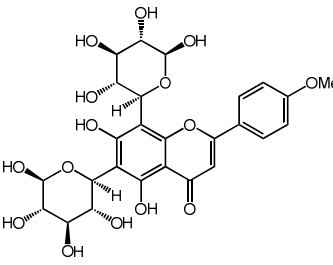
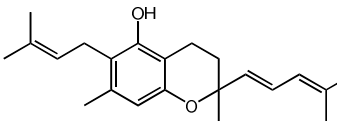
Figura 11: Espécies de *Peperomia* utilizadas como plantas ornamentais.

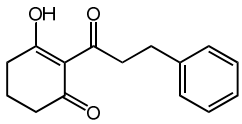
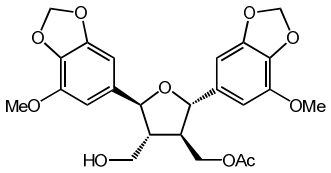
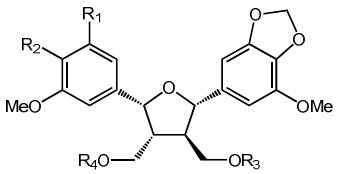
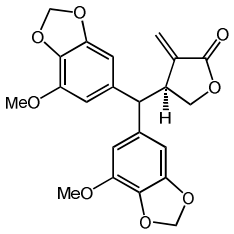
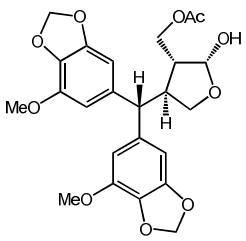
Popularmente são utilizadas como plantas medicinais com as mais diversas finalidades: *Peperomia pellucida* é utilizada no tratamento de impotência sexual,

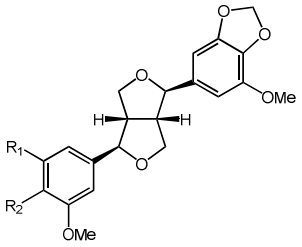
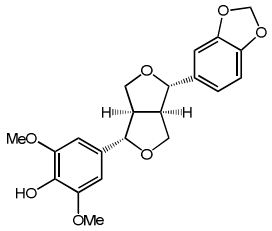
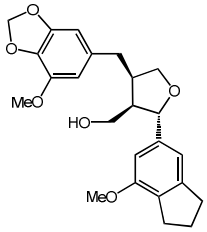
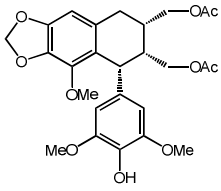
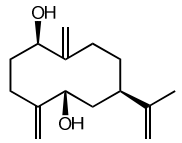
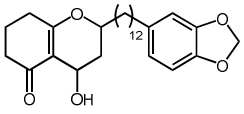
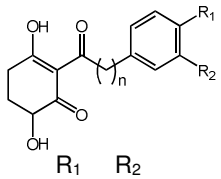
desordens mentais e câncer de mama (Aziba *et al.*, 2001); *P. vulcanica* é usada contra esterilidade; *P. japonica* é utilizada contra tumores malignos (Mbah *et al.*, 2002); *P. duclouxii* é utilizada contra câncer (Li *et al.*, 2007b); *P. glabella* é utilizada contra asma (Monache e Compagnone, 1996); *P. tetraphylla* é usada para casos de disenteria (Zhang *et al.*, 2007) e *P. dindygulensis* é utilizada contra dores de estômago (Wu *et al.*, 2005).

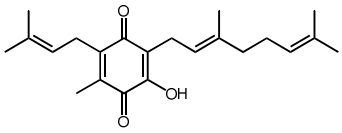
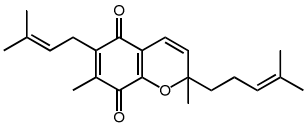
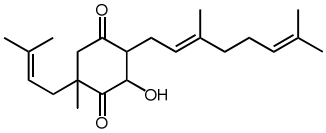
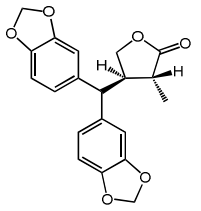
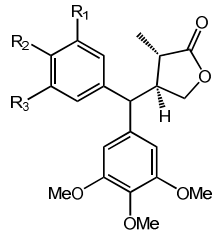
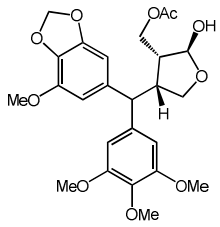
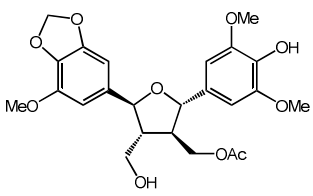
Apesar da grande quantidade de espécies, somente uma pequena fração teve o estudo fitoquímico realizado, comparado com estudos envolvendo espécies de *Piper.* Apesar da poucas de espécies estudadas, os resultados mostraram a ocorrência de uma grande variedade de metabólitos secundários e muitos destes apresentaram atividade biológica frente a diversos ensaios (**Tabela 5**).

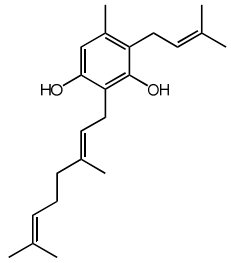
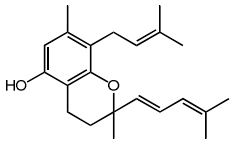
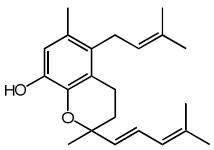
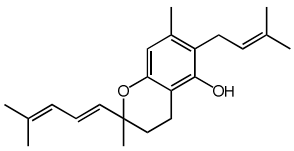
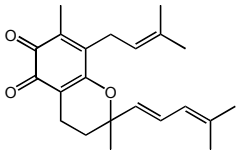
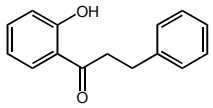
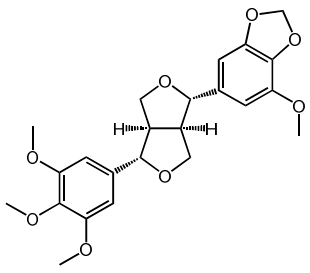
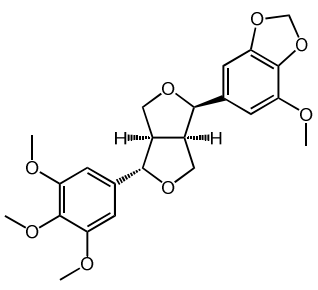
Tabela 5: Produtos naturais de espécies de *Peperomia*.

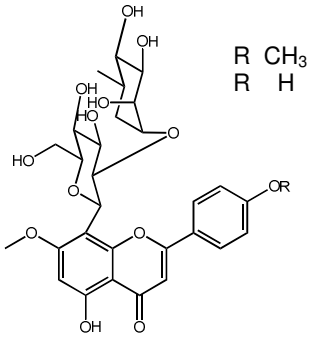
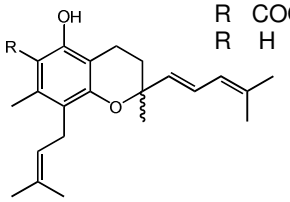
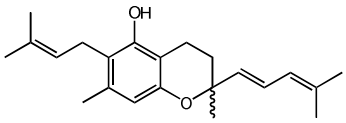
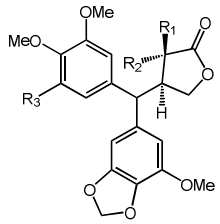
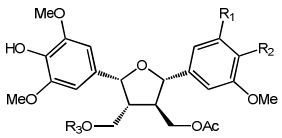
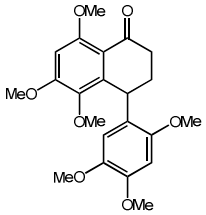
Espécie	Atividade	Estrutura	Classe de compostos	Referência
Peperomia blapnda	Tripanocida		Lignanas	(Felippe *et al.*, 2008)
				
				
				
				
	-		Cromenos	(Velozo *et al.*, 2006)
				
	Antioxidante		Flavonas	(Velozo *et al.*, 2009)
				
P. clusiifolia	-		Benzopirona	(Seeram *et al.*, 1998)

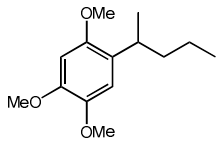
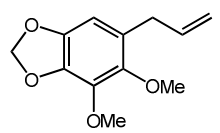
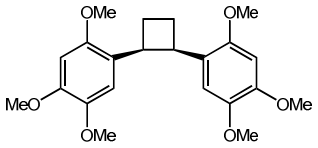
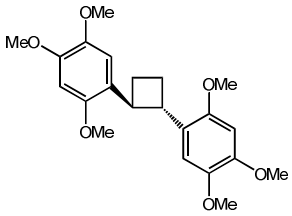
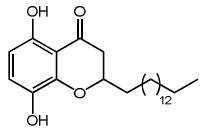
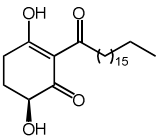
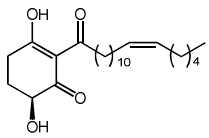
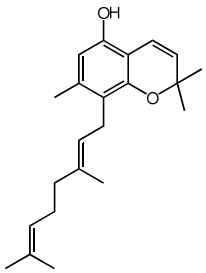
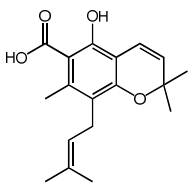
P. dindygulensis	Antiinflamatória		Policetídeo	(Wu *et al.*, 2005)
			Lignanas	
		 R1 R2 R3 R4 1 OCH_2O Ac H 2 OCH_2O H Ac 3 OCH_3 OH Ac Ac 4 OCH_3 OCH_3 Ac H		
	-		Secolignanas	(Govindachari *et al.*, 1998)
				

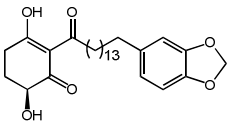
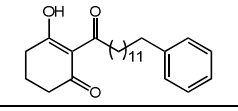
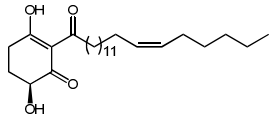
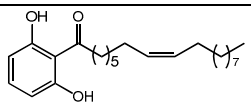
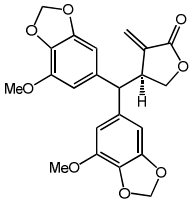
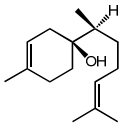
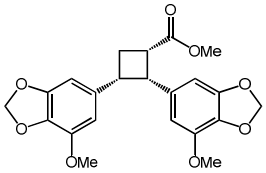
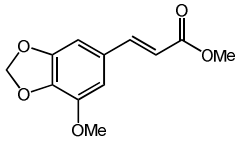
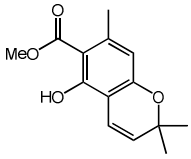
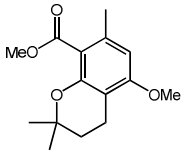
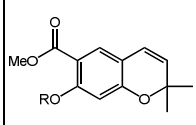
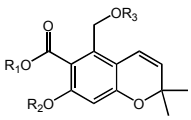
P. duclouxii	Atividade contra células VA-13 e HepG2	 R1 R2 1 OCH_2O 2 OCH_3 OH 3 OH OH	Lignanas	(Li *et al.*, 2007a)
				
				
	Citotóxica contra células WI-38, VA-13 e HepG2		Lignana	(Li *et al.*, 2007b)
			sesquiterpeno	
			Policetídeos	
		 R_1 R_2 1 OCH_2O, n=8 2 OCH_2O, n=10 3 OCH_2O, n=12 4 OCH_2O, n=14 5 H H, n=12		

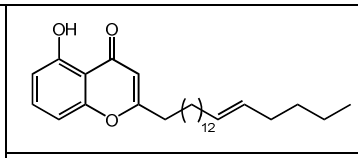
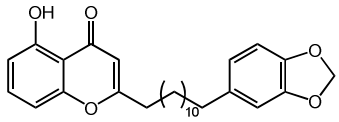
P. galioides	Contra Leishmania		Quinonas preniladas	(Mahiou *et al.*, 1996)
				
			Diidroquinona prenilada	
P. glabella	-		Secolignana	(Monache e Compagnone, 1996)
P. heyneana	Contra HIV	 R_1 R_2 R_3 1 OH OH OCH_3 2 OCH_2O OH	Lignanas	(Zhang *et al.*, 2007)
				
				

P. obtusifolia	-		Difenol prenilado	(Tanaka *et al.*, 1998)
			Benzopironas	
				
				
			Benzoquinona	
			Chalcona	
	Tripanocida		lignanas	(Mota *et al.*, 2009)
				

P. obtusifolia	Tripanocida	 R CH_3 R H	Flavona	(Mota *et al.*, 2009)
		 R COOH R H	Benzopironas	
				
P. pellucida	Antitumoral	 R_1 R_2 R_3 1 CH_2 OCH_3 2 H CH_3 OH	Lignanas	(Xu *et al.*, 2006)
		 R_1 R_2 R_3 3 OCH_2O H 4 OCH_3 OH Ac		
				

P. pellucida	-		Fenilbutanóide	(Bayma *et al.*, 2000)
			Fenilpropanóide	
			Norlignanas	
				
P. proctorii	-		Policetídeos	(Seeram *et al.*, 2000)
				
				
P. serpens	Fungicida		Cromenos	(Kitamura *et al.*, 2006)
				

P. sui	antitumoral		Policetídeos	(Cheng *et al.*, 2003)
				
				
				
			Secolignana	
			Sesquiterpeno	
P. tetraphylla	-		Norlignana	(Li *et al.*, 2007c)
			Fenilpropanóide	
P. villipetiola	Fungicida		Cromenos	(Salazar *et al.*, 2005)
				
		 3 R = H 4 R = Me		
		 R1 R2 R3 5 H H H 6 H Me H 7 Me H Ac		

P.vulcânica	-	 	Cromenos	(Mbah *et al*., 2002)

1.4.1. Peperomia trineura (Miq.)

A espécie *Peperomia trineura* (**Figura 12**) é uma erva que pode ser epífita ou rupícula, alcançando de 15 a 25 cm de altura (Monteiro e Guimarães, 2008). No Brasil é encontrada em todos os estados da região sul e sudeste, exceto no Espírito Santo.

Esta espécie é reconhecida pela fitotaxia verticilada, tamanho e forma das folhas. Seu florescimento e sua frutificação ocorrem de dezembro a fevereiro (Monteiro e Guimarães, 2008).

Figura 12: *Peperomia trineura* (Foto: Massuo Jorge Kato).

2. OBJETIVOS

1.1. Descrever os principais metabólitos secundários através do fracionamento cromatográfico do extrato da planta inteira (folhas, caules e frutos) de *Peperomia trineura* e elucidação estrutural através de análises espectroscópicas.

1.2. Avaliar a atividade antifúngica frente às espécies *Cladosporium cladosporioides e C. sphaerospermum,* e antitumoral às células leucêmicas K562 e Nalm 6, dos extratos e/ou produtos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades metodológicas

Os solventes utilizados nas extrações e nas eluições das colunas cromatográficas foram de grau PA e previamente destilados. Para as análises cromatográficas em CLAE foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Tedia).

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizadas sílica gel do tipo 60, com partículas 63-200 μm da Merck.

Para CCDP foram utilizadas tanto placas de sílica gel comerciais como placas confeccionadas no laboratório. As placas de sílica gel comerciais utilizadas apresentavam espessura de 25 mm e tamanho das partículas de 17 μm, sobre suporte de vidro (20x20 cm) da Sigma-Aldrich. Já para a confecção das placas no laboratório, utilizou-se sílica 60 PF_{254} com partículas de 5-40 μm da Merck e espessura de 1 mm sobre suporte de vidro (20x20 cm).

Para CCDA, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 PF_{254} para cromatografia de camada fina, sobre suporte de alumínio da Merck.

As placas de CCDA e CCDP foram reveladas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm). Após este procedimento, as placas de CCDA foram reveladas com aspersão de uma solução a 2% de sulfato cérico em ácido sulfúrico (2 $mol.L^{-1}$) seguido de aquecimento em chapa.

Os espectros no infravermelho foram obtidos por meio de pastilhas de KBr em espectrômetro Bomen MB100.

As análises em CLAE foram obtidas em um sistema Shimadzu constituído de duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector ultravioleta

modelo SPD-10A, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e tratados pelo programa de computador LC-10.

Os espectros de RMN de ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX 500.

As amostras submetidas aos experimentos de RMN foram solubilizadas em $CDCl_3$ da Sigma-Aldrich utilizando TMS como padrão interno.

Os valores de rotação óptica foram obtidos em um polarímetro Perkin Elmer Precisely modelo 343 com lâmpada de sódio.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Bruker Daltonics modelo microTOF LC por injeção direta das amostras, utilizando uma solução de formoldeído 0,05% para ionizar os compostos.

Os espectros de massas (IE) foram medidos a 70 eV em um espectrômetro CG-EM SHIMADZU modelo GCMS-QP5050A e equipado com coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 m. i.d., 0.25 μm). As condições empregadas nas análises foram: temperatura do injetor: 250°C; detector: 280°C; gás de arraste: He; fluxo da coluna: 1 mL min^{-1}; temperaturas programadas: 100°C (1 min); e taxa de elevação da temperatura: 10°C min^{-1} e 280°C (20 min).

3.2. Coleta do material vegetal e obtenção do extrato

A espécie *Peperomia trineura* (K-831) (**Figura 12**), foi coletada no município de Encantado/RS, em Dezembro de 2006, e identificada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Rio de Janeiro.

As plantas foram secas ao ar livre e depois em estufa a temperatura de 50 ºC por 48 horas. Depois de secas foram levados a um moinho de facas, sendo obtido

270 g de material seco e moído. Parte deste material (240 g) foi duas vezes submetido à extração com clorofórmio a frio durante dois dias. Após este procedimento, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, sendo obtido 9 g de extrato bruto.

3.3. Análise preliminar do extrato bruto

Visando a obtenção do perfil químico da espécie *Peperomia trineura* (K-831), o extrato da planta foi analisado por CLAE. Este foi solubilizado em ACN e algumas gotas de DMSO, seguindo os procedimentos descritos item 3.5.

O cromatograma revelou a presença de um constituinte majoritário com máximo de absorção no UV em 278 nm.

Em uma análise do espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto pôde-se observar, além de um tripleto em δ 5,35 referente a hidrogênios metilênicos e um simpleto extremamente desprotegido em δ 18,20 sugestivo de hidrogênio quelatado, alguns sinais característicos, como dois multipletos em δ 6,61-6,72 e 7,16-7,35 referentes a dois anéis aromáticos, e um simpleto em δ 5,91 referente ao grupo metilenodioxila.

3.4. Fracionamento cromatográfico

A metodologia utilizada para a separação das substâncias foi à cromatografia de adsorção em sílica gel, cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e CLAE semipreparativa. Nos dois primeiros métodos as separações foram monitoradas por CCDA.

Visando o isolamento dos compostos presentes no extrato bruto da espécie *Peperomia trineura* (K-831), 6 g deste extrato foram inicialmente submetidos a uma

coluna filtrante empacotada com sílica gel 60 (63-200 μm), no modo gradiente de polaridade (Hex; Hex: AcOEt; AcOEt; AcOEt: MeOH; MeOH). Foram recolhidas 46 frações de 200 mL cada, estas reunidas em doze frações, com base na cromatografia de camada delgada analítica, e as massas reunidas de acordo com a **Tabela 6**.

Tabela 6: Distribuição das massas após o fracionamento cromatográfico do extrato bruto.

Fração	Quantidade (mg)	Eluente
PP1	138	Hex: AcOEt 4:1 (V:V)
PP2	970	Hex: AcOEt 4:1 (V:V)
PP3	57	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP4	446	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP5	595	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP6	260	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP7	178	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP8	464	AcOEt
PP9	120	AcOEt:MeOH 4:1 (V:V)
PP10	1074	AcOEt:MeOH 4:1 (V:V)
PP11	685	AcOEt:MeOH 1:1 (V:V)
PP12	564	MeOH

Foi realizada uma análise dos espectros de RMN de ^{1}H das frações recolhidas, onde se pôde ter informações das possíveis classes de substâncias contidas em cada fração. Além desta informação, foram observadas as quantidades

das massas recolhidas e os cromatogramas das frações obtidas, optando-se, finalmente, por trabalhar com as frações PP5, PP6 e PP10.

O espectro de RMN de ^{1}H da fração PP5 apresentou sinais característicos de policetídeos aromáticos. No entanto, esta fração ainda necessitava de etapas de purificação. Então esta foi submetida a uma separação cromatográfica em ordem crescente de polaridade (Hex; Hex:AcOEt; MeOH), sendo recolhidas 71 frações de 20 mL cada, posteriormente reunidas em doze frações com base na cromatografia de camada delgada analítica, e as massas reunidas de acordo com a **Tabela 7**.

Tabela 7: Distribuição das massas após o fracionamento cromatográfico da fração PP5.

Fração	Quantidade (mg)	Eluente
PP5/1	4	Hex
PP5/2	8	Hex
PP5/3	6	Hex:AcOEt 4:1 (V:V)
PP5/4	72	Hex:AcOEt 4:1 (V:V)
PP5/5	50	Hex:AcOEt 4:1 (V:V)
PP5/6	112	Hex:AcOEt 7:3 (V:V)
PP5/7	65	Hex:AcOEt 3:2 (V:V)
PP5/8	45	Hex:AcOEt 1:1 (V:V)
PP5/9	29	Hex:AcOEt 2:3 (V:V)
PP5/10	15	MeOH
PP5/11	36	MeOH
PP5/12	24	MeOH

Após a análise de RMN de ^{1}H das novas frações e seus cromatogramas, a fração PP5/6 foi então aplicada em CCDP utilizando como fase móvel hex:AcOEt (3:2), de onde foi extraída uma mancha (**Figura 13**) e esta injetada em CLAE gerando o cromatograma da **Figura 14**. Assim foi possível observar a ocorrência de três sinais referentes aos policetídeos (**1**, **2** e **3**). Como a diferença entre os tempos de retenção para os três picos foi satisfatório, optou-se por separar as substâncias relativas a estes utilizando CLAE semipreparativa (vide pág. 64, item 3.6). Os três policetídeos (**1, 2** e **3**) são inéditos em função do comprimento da cadeia alquílica ou pela presença da insaturação.

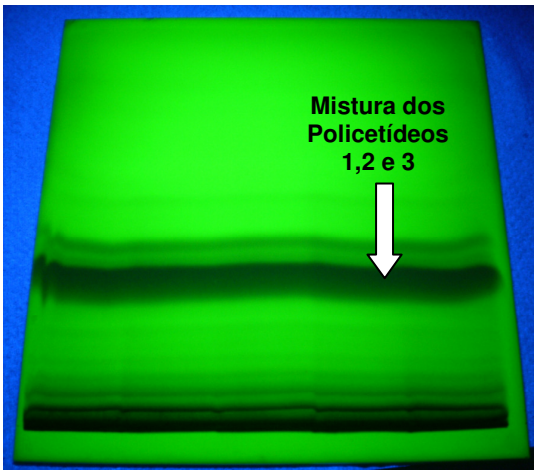


Figura 13: Placa cromatográfica delgada preparativa da fração PP5/6.

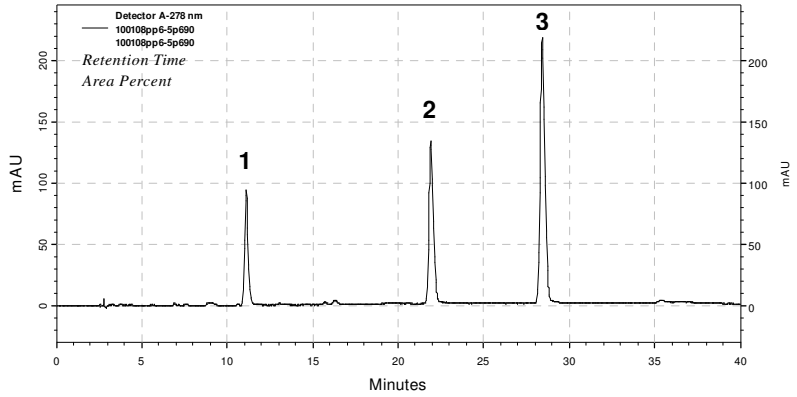


Figura 14: Cromatograma CLAE da mistura dos policetídeos **1**, **2** e **3** obtidos a partir da fração PP5/6.

A fração PP5/7 também apresentava sinais característicos de policetídeos. Desta forma, também foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como eluente uma mistura de hexano e AcOEt (3:2), e resultando no isolamento de outro policetídeo inédito (**4**), em função da configuração *cis* da ligação dupla.

Assim como para as outras frações estudadas anteriormente, a fração PP10 também apresentou sinais característicos de policetídeos, no entanto sem a presença de anel aromático. Assim, esta fração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como eluente hexano e AcOEt (3:2). Foi obtido mais um polícetídeo desconhecido (**5**), sendo este a substância majoritária encontrada na planta (**Figura 15**).

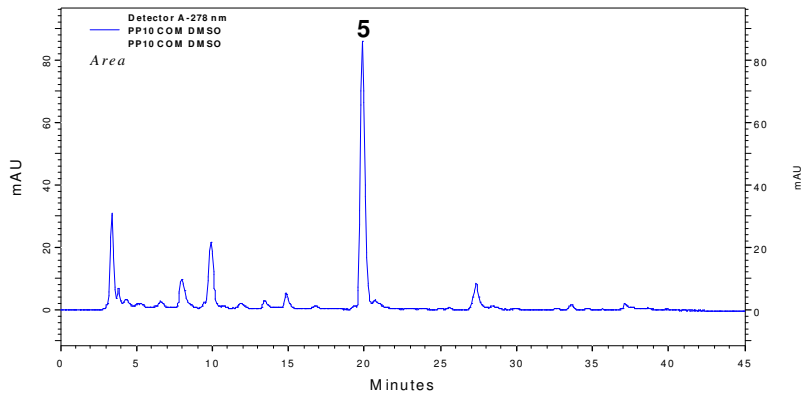


Figura 15: Cromatograma CLAE da fração PP10 que contém o policetídeo **5**.

Os compostos isolados foram analisados por RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C e CG-EM para a elucidação estrutural, além da comparação com os dados descritos na literatura.

Abaixo estão representados, sob forma de fluxograma (**Figura 16**), os fracionamentos cromatográficos realizados com o extrato bruto.

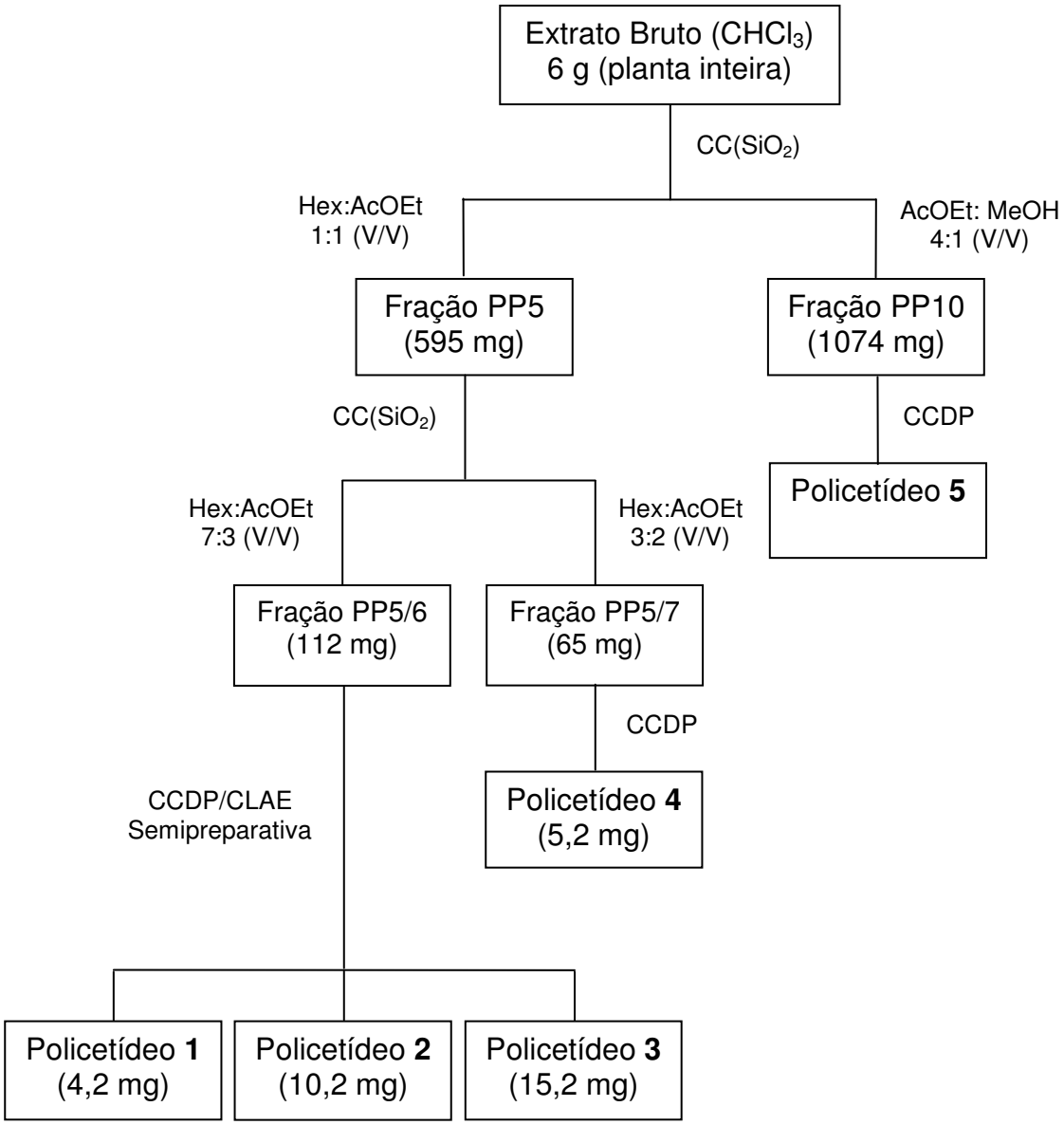


Figura 16: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico de *P. trineura*.

3.5. Análise por CLAE

O extrato e as frações obtidas dos fracionamentos cromatográficos foram solubilizadas em ACN (5% DMSO) e preparadas em uma concentração de 1 mg/mL.

As soluções foram submetidas a um tratamento onde as mesmas foram filtradas com filtro de teflon (3 mm, 20 µm). Em seguida, 20 µL das amostras foram injetados em CLAE.

A análise por CLAE foi realizada utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi ACN e água milli-Q com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi realizada no modo gradiente (**Tabela 8**). A detecção foi através de ultravioleta no comprimento de onda de 278 nm. O programa de computador Shimadzu Class LC-10 foi empregado para o tratamento dos dados.

Tabela 8: Gradiente dos solventes utilizados para as análises dos extraídos e frações de *Peperomia trineura*.

Tempo	ACN (%)
0-4	90
4-25	100
25-30	100
30-35	90
35-40	90

3.6. Isolamento dos policetídeos 1, 2 e 3 por CLAE semipreparativa

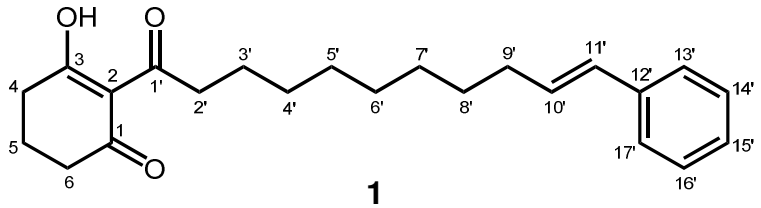
Para o isolamento dos policetídeos **1**, **2** e **3** foi utilizado CLAE semipreparativa e uma coluna semipreparativa de fase reversa C18 (Phenomenex®, 250 x 10,00 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi ACN e água milli-Q com um fluxo de 4,3 mL/min. A eluição foi feita também modo gradiente (Tabela 8).

As frações injetadas foram solubilizadas em ACN (5% DMSO) e preparadas em uma concentração de 5 mg/mL.

As soluções foram submetidas a um tratamento onde as mesmas foram filtradas com filtro de teflon (3 mm, 20 µm), posteriormente sendo injetadas 500 µL dessa amostra em CLAE.

3.7. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos policetídeos isolados de *Peperomia trineura*

3-Hidróxi-2-[(10*E*)-11´-fenilundec-10´-enoil)]cicloex-2-an-1-ona



1

Fórmula molecular: $C_{23}H_{30}O_3$

Massa molecular: 354 u.m.a.

Estado físico: Óleo amarelado

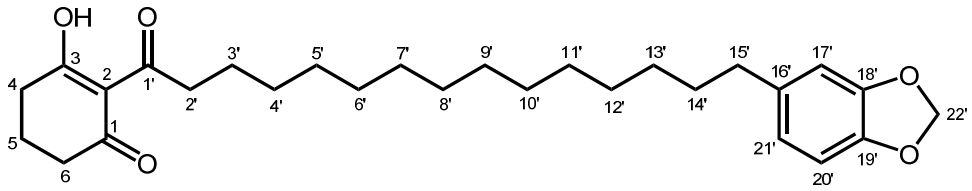
IV: 3027 cm^{-1}; 2925 cm^{-1}; 1667 cm^{-1}; 1556 cm^{-1}.

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1,27-1,41 (8H, *m*, H4´-H7´), 1,61 (2H, *m*, *J*=7,0; H3´), 1,48 (2H, *m, J*=7,0, H8´), 1,97 (2H, *m*, *J*=6,5; H5), 2,20 (2H, *td*, *J*=7,0; 6,5; 1,5; H9´), 2,48 (2H, *t*, *J*=6,5; H6), 2,66 (2H, *t*, *J*=6,5; H4), 3,01 (2H, *t*, *J*=7,0; H2´), 6,22 (1H, *dt*, *J*=16,0; 7,0; H10´), 6,37 (1H, *d*, *J*=16,0; H11´), 7,16-7,19 (1H, *m*, H15'), 7,26-7,30 (2H, *m*, H14´, H16´), 7,31-7,36 (2H, *m*, H13', H17'), 18,26 (1H, *s*, OH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 19,1 (C5), 24,7 (C3´), 29,2-29,4 (C4´-C7´), 32,3 (C8´), 33,0 (C9´), 33,3 (C4), 38,9 (C6), 40,6 (C2´), 113,0 (C2), 125,9 (C13´, C17´), 126,7 (C15´), 128,4 (C14´, C16´), 129,7 (C10´), 131,2 (C11´), 137,9 (C12´), 195,3 (C1), 198,6 (C3), 206,3 (C1´).

EM *m/z* (Int rel. %): 354 ($C_{23}H_{30}O_3$, [M^+], 11), 167 (71), 154(58), 139(65), 126(17), 117(100), 115(63), 104(77), 91(74); 69(64), 55(79), 41(44).

3-Hidróxi-2-(15´-fenil-18´-metilenodioxi-pentadecanoil)cicloex-2-an-1-ona



2

Fórmula molecular: $C_{28}H_{40}O_5$

Massa molecular: 456 u.m.a.

Estado físico: Óleo amarelado.

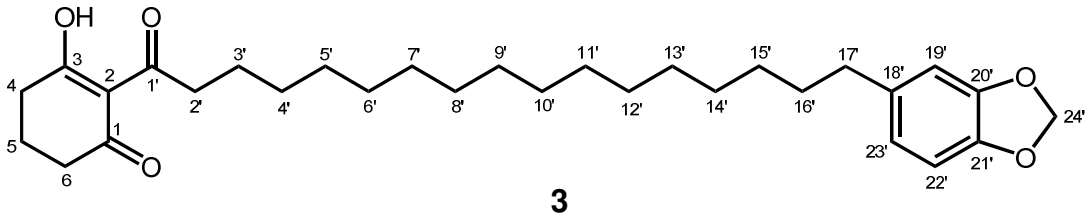
IV: 1665 cm^{-1}; 1559 cm^{-1}; 1490 cm^{-1}; 1470 cm^{-1};1442 cm^{-1}; 1032 cm^{-1}; 935 cm^{-1}.

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1,22-1,38 (20H, *m*, H4´-H13´), 1,53-1,64 (4H, *m*, H3´,H14´), 1,97 (2H, *m*, *J*=6,5; H5), 2,48 (2H, *d*, *J*=6,5; H6), 2,51 (2H, *t*, *J*= 7,5; H15´), 2,66 (2H, *t*, *J*=6,5; H4), 3,01 (2H, *t*, *J*=7,5; H2´), 5,91 (2H, *s*, H22´), 6,61 (1H, *dd*, *J*=8,0; 1,5; H21´), 6,67 (1H, *d*, *J*= 1,5; H17´), 6,71 (1H, *d*, *J*= 8,0; H20´), 18,26 (1H, *s*, OH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 19,1 (C5), 24,7 (C3´), 29,2-29,7 (C4´-C13´), 31,8 (C14´), 33,3 (C4), 35,7 (C15´), 38,9 (C6), 40,6 (C2´), 100,7 (C22´), 108,0 (C20´), 108,9 (C17´), 113,0 (C2), 121,0 (C21´), 136,9 (C16´), 145,3 (C18´), 147,4 (C19´), 195,3 (C1), 198,6 (C3), 206,4 (C1´).

EM *m/z* (Int rel. %): 456 ($C_{28}H_{40}O_5$, [M^+],12), 167(27); 136(23), 135(100), 69(17), 55(28), 43(13), 41(15).

3-Hidróxi-2-(15´-fenil-18´-metilenodioxi-heptadecanoil)-2-cicloexen-1-ona



3

Fórmula molecular: $C_{30}H_{44}O_5$

Massa molecular: 484 u.m.a.

Estado físico: Óleo amarelado.

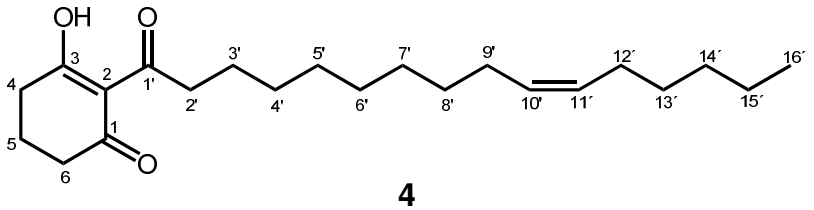
IV: 1686 cm^{-1}; 1559 cm^{-1}; 1490 cm^{-1}; 1470 cm^{-1};1442 cm^{-1}; 1032 cm^{-1}; 935 cm^{-1}.

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1,22-1,38 (20H, *m*, H4´-H15´), 1,52-1,64 (4H, *m*, H3´,H16´), 1,97 (2H, *m*, *J*=6,5; H5), 2,48 (2H, *d*, *J=6,5*; H6), 2,51 (2H, *t*, *J*=7,5; H17´), 2,66 (2H, *t*, *J*=6,5; H4), 3,01 (2H, *t*, *J*=7,5; H2´), 5,91 (2H, *s*, H24´), 6,61 (1H, *dd*, *J*= 8,0; 1,5; H23´), 6,67 (1H, *d*, *J*=1,5; H19´), 6,71 (1H, *d*, *J*=8,0; H22´), 18,27 (1H, *s*, OH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 19,1 (C5), 24,7 (C3´), 29,2-29,7 (C4´-C15´), 31,8 (C16´), 33,3 (C4), 35,7 (C17´), 38,9 (C6), 40,6 (C2´), 100,7 (C24´), 108,0 (C22´), 108,9 (C19´), 113,0 (C2), 121,0 (C23´), 136,9 (C18´); 145,4 (C20´), 147,4 (C21´), 195,3 (C1), 198,7 (C3), 206,4 (C1´).

EM *m/z* (Int rel. %): 484 ($C_{30}H_{44}O_5$, [M^+], 4), 167(21), 139(15), 136(20), 135(100), 69(16), 55(29), 43(17), 41(18).

3-Hidróxi-2-[(10*Z*)-hexadecanoil)-2-cicloexen-1-ona



4

Fórmula molecular: $C_{22}H_{36}O_3$

Massa molecular: 348 u.m.a.

Estado físico: Óleo amarelado.

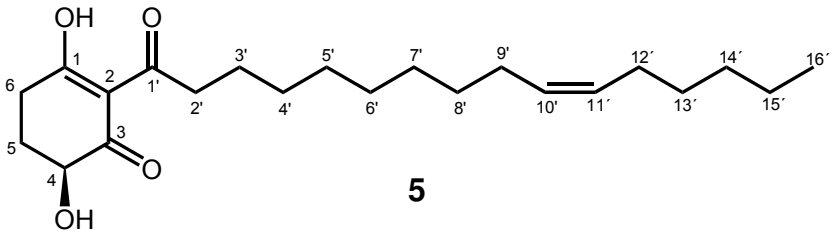
IV: 3004 cm^{-1}; 1669 cm^{-1}; 1560 cm^{-1}.

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0,90 (3H, *t*, H16´), 1,25-1,38 (16H, *m*, H4´-H8´; H13´-H15´), 1,61 (2H, *m*, H3´), 1,97 (2H, *m*, *J*=6,5; H5), 2,02 (4H, *m*, H9´,H12´), 2,48 (2H, *d*, *J=6,5*; H6), 2,66 (2H, *t*, *J*=6,5; H4), 3,01 (2H, *t*, *J*=7,5; H2´), 5,34 (2H, *t*, *J*=5,0; H10´,H11´), 18,27 (1H, *s*, OH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 14,0 (C16), 19,1 (C5), 22,3 (15´), 24,7 (C3´), 26,9 (12´), 27,2 (9´), 29,3-29,8 (C4´-C8´, 13´), 31,8 (C16´), 31,2 (14´), 33,3 (C6), 38,8 (C4), 40,6 (C2´), 113,0 (C2), 129,9 (C10´,C11´), 195,3 (C1), 198,6 (C3), 206,3 (C1´).

EM *m/z* (Int rel. %): 348 ($C_{22}H_{36}O_3$, [M^+], 6), 221(9), 203(10), 189(14), 168(11), 167(100), 154(65), 139(56), 126(12), 111(13), 97(9), 81(7), 69(36), 55(75), 43(30), 41(58).

3,6-Hidróxi-2-[(10*Z*)-hexadecanoil)-2-cicloexen-1-ona



5

Fórmula molecular: $C_{22}H_{36}O_3$

Massa molecular: 364 u.m.a.

Estado físico: Óleo amarelado.

IV: 3466 cm^{-1}; 1667 cm^{-1}; 1562 cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{25}$: -3,6° (*c* 0,05, $CHCl_3$).

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0,90 (3H, *t*, *J*=7,0; H16´), 1,25-1,40 (16H, *m*, H4´-H8´; H13´-H15´), 1,63 (2H, *m*, H3´), 2,02 (4H, *m*, H9´,H12´), 2,76 (2H, *m*, H6), 2,97 (1H, *m*, H4 eq.), 3,07 (1H, *m*, H4 ax.), 5,34 (2H, *t*, *J*=5,0; H10´,H11´), 18,27 (1H, *s*, OH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 14,0 (C16), 22,3 (15´), 24,6 (C3´), 26,9 (C5), 27,2 (12´), 27,2 (9´), 29,3-29,8 (C4´-C8´, 13´), 31,3 (14´), 32,0 (C6), 40,2 (C2´), 71,6 (C4), 110,3 (C2), 129,8 (C11´), 129,9 (C10´), 195,6 (C3), 197,9 (C1), 206,1 (C1´).

EM *m/z* (Int rel. %): 364 ($C_{22}H_{36}O_4$, [M^+], 17), 183(20), 168(26), 153(8); 137(14), 126(11), 109(7), 95(10), 85(16), 81(15), 69(36), 67(21), 55(100), 43(42), 41(78), 39(12).

3.8. Atividade biológica

3.8.1. Avaliação da atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

Para a realização do ensaio antifúngico às espécies *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, foram utilizados 2 mg de cada uma das substâncias purificadas. Os ensaios foram realizados na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Max Young. As duas espécies de fungos são mantidas no próprio Instituto de Botânica.

Cinco soluções de cada uma das substâncias isoladas e uma substância padrão (nistatina), todas com concentrações de 10,0; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,1 mg/mL foram aplicadas (10 µL) em placa de sílica gel GF_{254} com suporte de alumínio e eluído com Hex:AcOEt (3:2 V/V). Após a eluição, o solvente foi completamente evaporado. Então, uma solução de cada um dos fungos foi borrifada nas placas. Essas placas foram incubadas em câmara úmida e escura por 48 horas e a uma temperatura de 28°C. Após o período de incubação, o surgimento de regiões claras indicam o potencial de inibição de crescimento dos fungos.

3.8.2. Avaliação da viabilidade celular de células K562 e Nalm6

Para a realização do ensaio de viabilidade das células K562 e Nalm6 (Leucemia mielóide / eritroleucemia Ph+ e Leucemia Linfóide aguda B [12-13]), 8 mg dos policetídeos 1, 2, 3 e 5 foram enviados para o CIPOI (Centro Integrado de

Pesquisa Onco-hematológica da Infância) sob responsabilidade do Dr. Gilberto Carlos Franchi Junior.

Foram preparadas sete soluções de cada uma das substâncias enviadas e dos padrões Aracetin e Gleevec, todas com concentrações de 100; 10; 1; 0,1; 0,01, 0,001 e 0,0001 µg/mL de meio de cultura.

Uma quantidade de 30.000 cel/poço foi adicionada em uma placa de 96 poços. As soluções foram adicionadas sobre as células e incubadas por um período de 48 horas. Após este período, a placa foi centrifugada, o meio de cultura retirado, as células ressuspensas com 100 µL de PBS, adicionados 10 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) Sigma M2128, 5mg/mL em PBS e incubado por quatro horas. Após o período de incubação, a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante retirado, então foi adicionado 150 µL de álcool isopropílico e homogeneizado. A leitura foi realizada em leitora de Elisa com filtro de 570 nm.

Para o teste de cinética temporal foram utilizadas seis placas de 96 poços ou 576 poços divididos em 288 para ambas as células (K562 e Nalm6).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fracionamento Cromatográfico

O fracionamento do extrato bruto da planta inteira (*Peperomia trineura*) resultou no isolamento de cinco novos policetídeos.

O extrato bruto (6 g) foi inicialmente submetido a uma coluna filtrante no modo gradiente de polaridade, resultando em treze frações (PP1-PP12). A fração PP5, foi então submetida a uma separação cromatográfica em ordem crescente de polaridade, gerando doze frações (PP5/1-PP5/12).

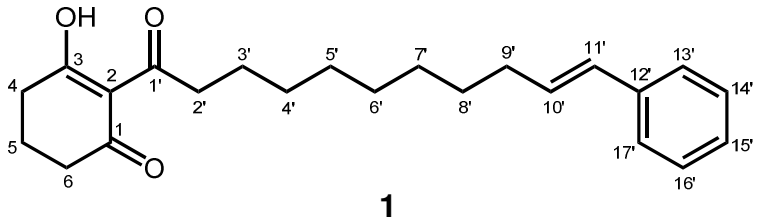
A fração PP5/6 foi aplicada em CCDP utilizando como fase móvel hexano:AcOEt (3:2), de onde foi extraída uma mancha que possuía uma mistura de três policetíceos (**1**, **2** e **3**). Estes, então, foram isolados empregando-se CLAE semipreparativa, como descrito no item 3.6.

A fração PP5/7 foi aplicada em CCDP também utilizando hexano:AcOEt (3:2) como eluente, obtendo o policetídeo **4**.

A fração PP10 foi submetida à CCDP utilizando hexano:AcOEt (3:2), assim como nos outros casos, resultando no isolamento do policetídeo **5**, também inédito na literatura, em função do seu comprimento da cadeia alquílica e da insaturação.

4.2. Elucidação Estrutural

3-hidróxi-2-(11'-fenil-10'-undecenoil)-2-cicloexen-1-ona (1)



1

O policetídeo **1** foi isolado como um óleo amarelado, em que sua fórmula molecular, $C_{23}H_{30}O_3$, foi determinada por CG-EM ($[M]^+$, *m/z* 354) (**Figura 30**) e HRESI ($[M+H]^+$, *m/z* 355,2274) (**Figura 32**).

O espectro no infravermelho (**Figura 29**) apresentou bandas em 3027, 2925, 1667 e 1556 cm^{-1}, referentes a um grupo hidroxila quelatado, anel aromático, carbonila conjugado e uma carbonila quelatada conjugada, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 18-20**) mostra sinais correspondentes a um anel aromático monosubstituído em δ 7,16-7,20 (*m*; H15), 7,26-7,30 (*m;* H14', H16') e, 7,32-7,36 (*m;* H13', H17'), que juntamente com um dupleto em δ 6,37 (*J*=16,0 Hz; H11') e um duplo-tripleto em δ 6,22 (*J*=16,0 Hz; 7,0 Hz; H10') indica que este anel aromático contém uma ligação dupla conjugada, fato que pode ser evidenciado pelo íon fragmentário com *m/z* 117 em seu espectro de massas de baixa resolução (**Figura 31**).

A geometria *trans* da ligação dupla foi atribuída com base na constante de acoplamento entre os hidrogênios ligados aos carbonos 10' e 11' (*J* = 16 Hz).

Os sinais relativos à cadeia alquílica foram observados no espectro de RMN de ^1H entre δ1,27-1,41 e no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 21** e **22**) entre δ 29,2-29,4.

O simpleto observado em δ 18,26 é referente ao hidrogênio do grupo hidroxila, que forma uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila.

O espectro HMBC mostrou as correlações deste hidrogênio com os carbonos C2, C3 e C4 (**Figura 17**).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou dois sinais relativos à carbonila (δ 195,3; C1 e 198,7; C3), um sinal referente à ligação dupla (δ 113,0; C2) e três sinais de carbonos saturados (δ 33,3; C4, 19,1; C5, e 38,9; C6), que levam a uma proposta de um sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona. Esta proposta foi sustentada pelos espectros COSY (**Figura 21 e 24**), HSQC (**Figura 25**) e HMBC (**Figura 26-28**). No espectro COSY foi possível observar H4 correlacionando com H5; H5 correlacionando com H4 e H6; H6 com H5.

A proposta foi confirmada por espectrometria de massas de baixa resolução, onde foi possível identificar os íons fragmentários propostos na elucidação estrutural (**Figura 31**).

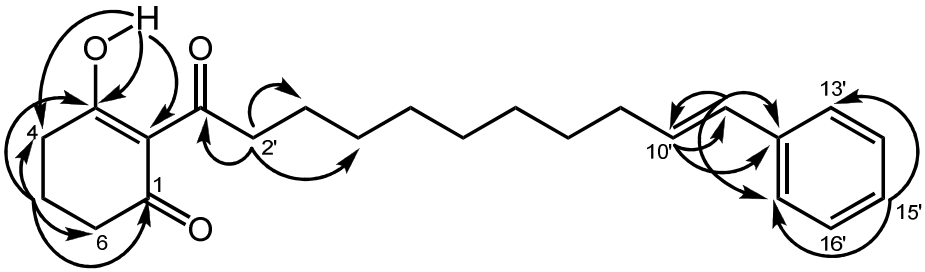


Figura 17: Algumas correlações HMBC do policetídeo **1**.

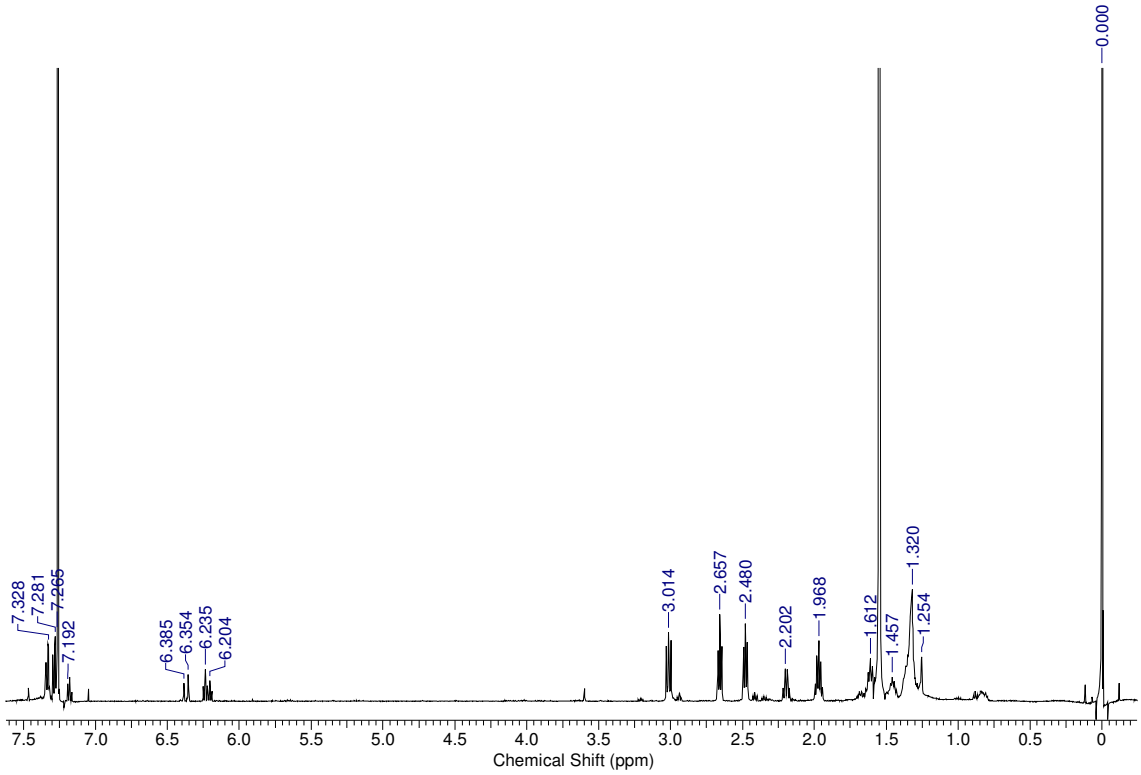


Figura 18: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

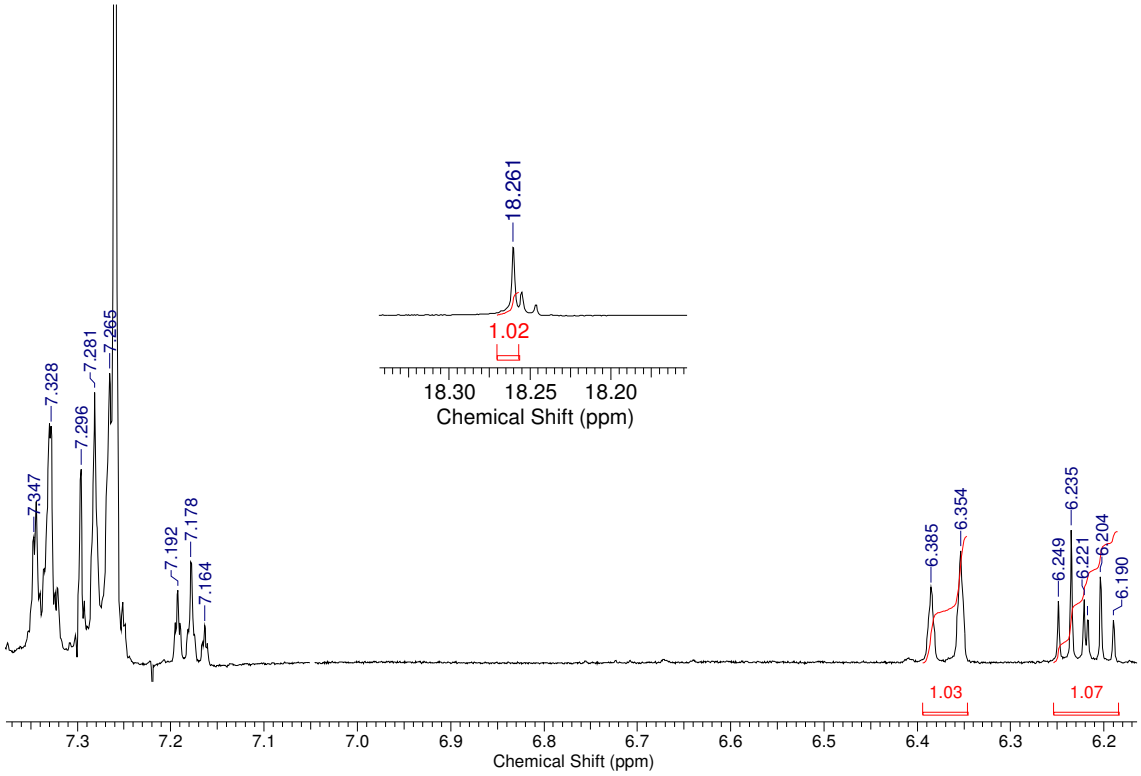


Figura 19: Ampliação da região de δ 6,17 a 7,43 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

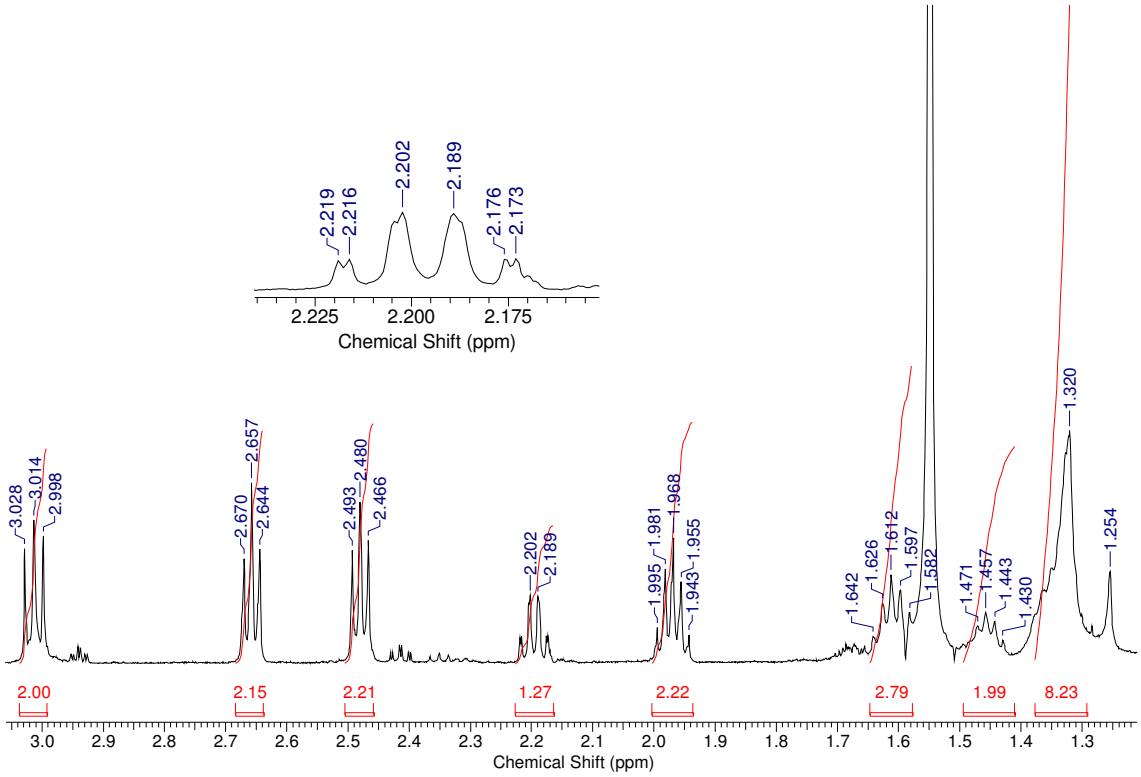


Figura 20: Ampliação da região de δ 1,10 a 3,50 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

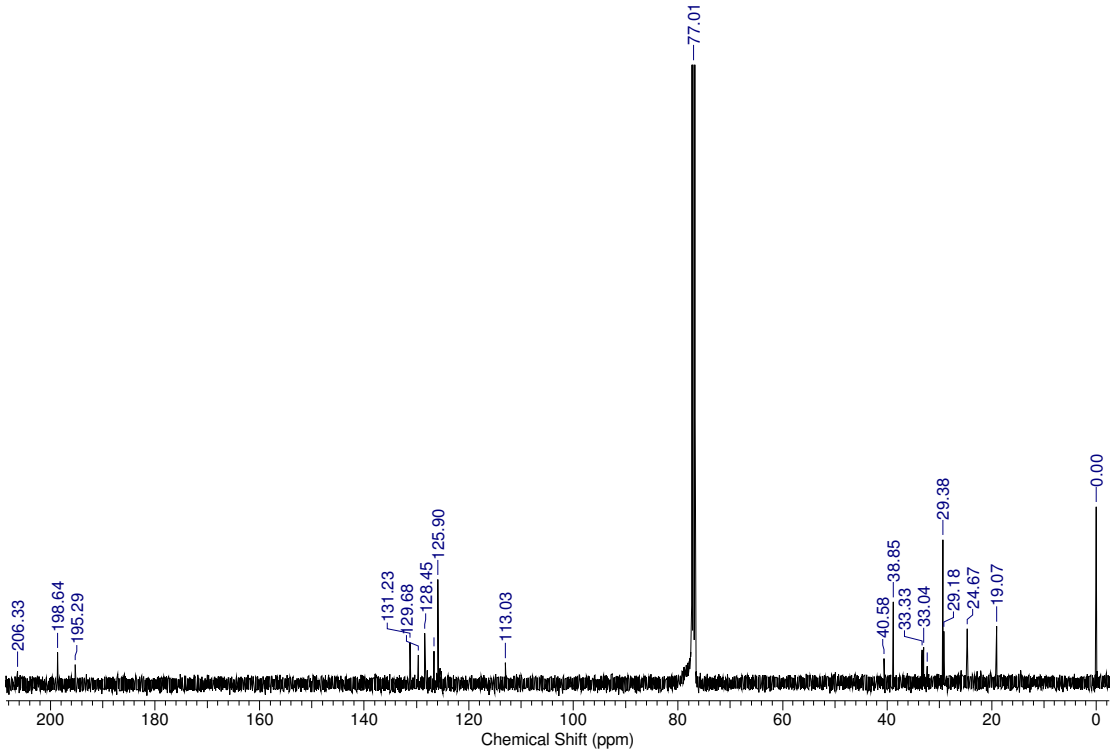


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

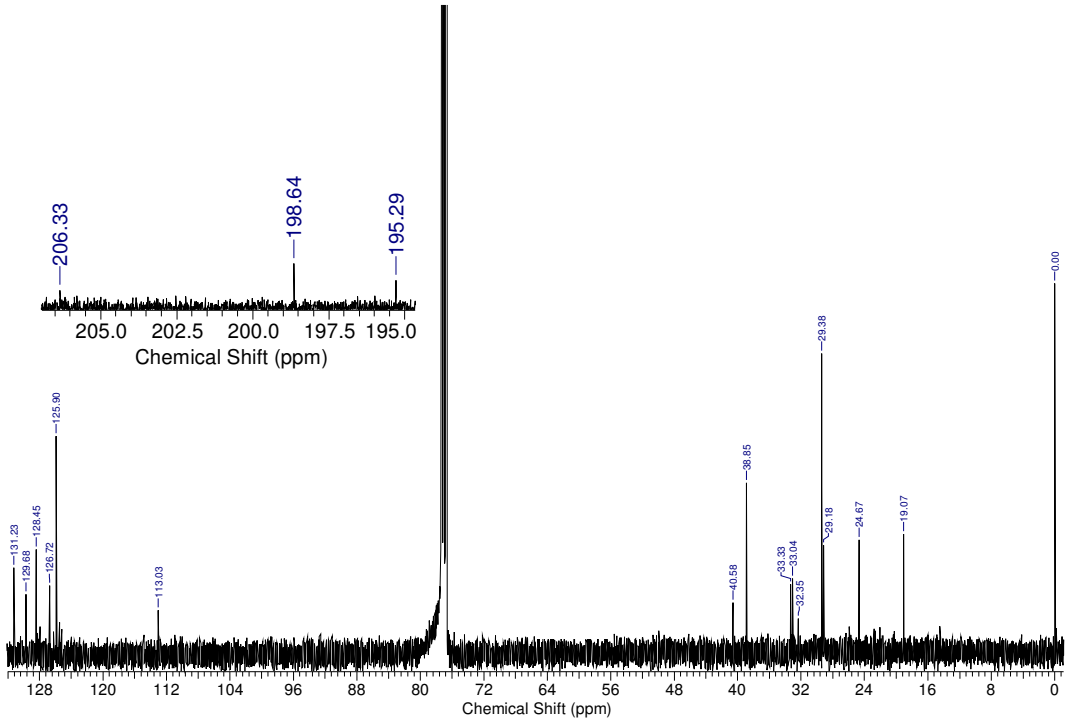


Figura 22: Ampliação da região de δ 0,0 a 130,0 e de δ 195,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

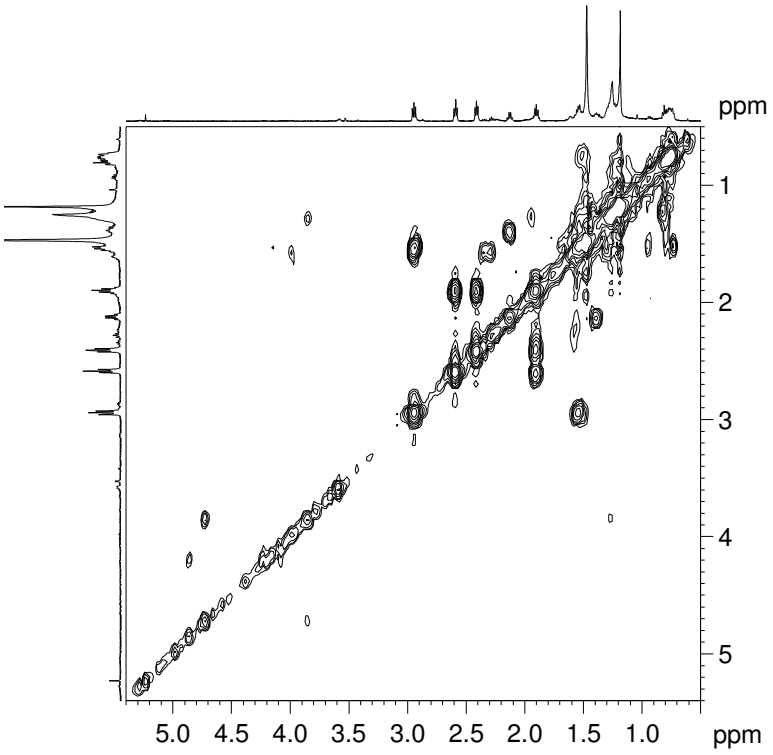


Figura 23: Mapa de contornos de ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

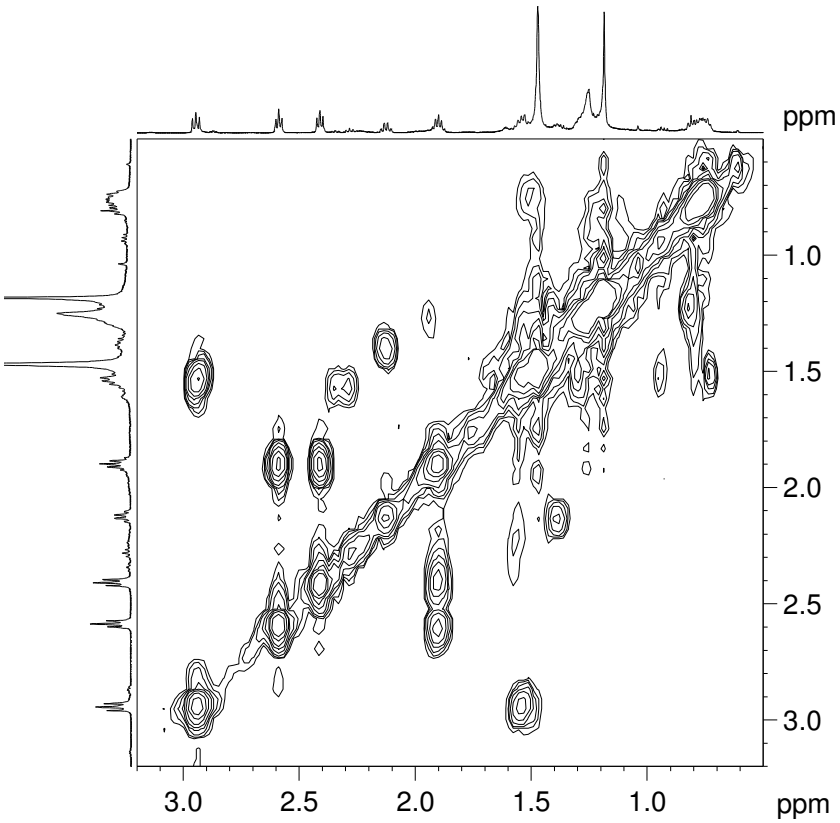


Figura 24: Ampliação da região de δ 0,0 a 3,2 do mapa de contornos de ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

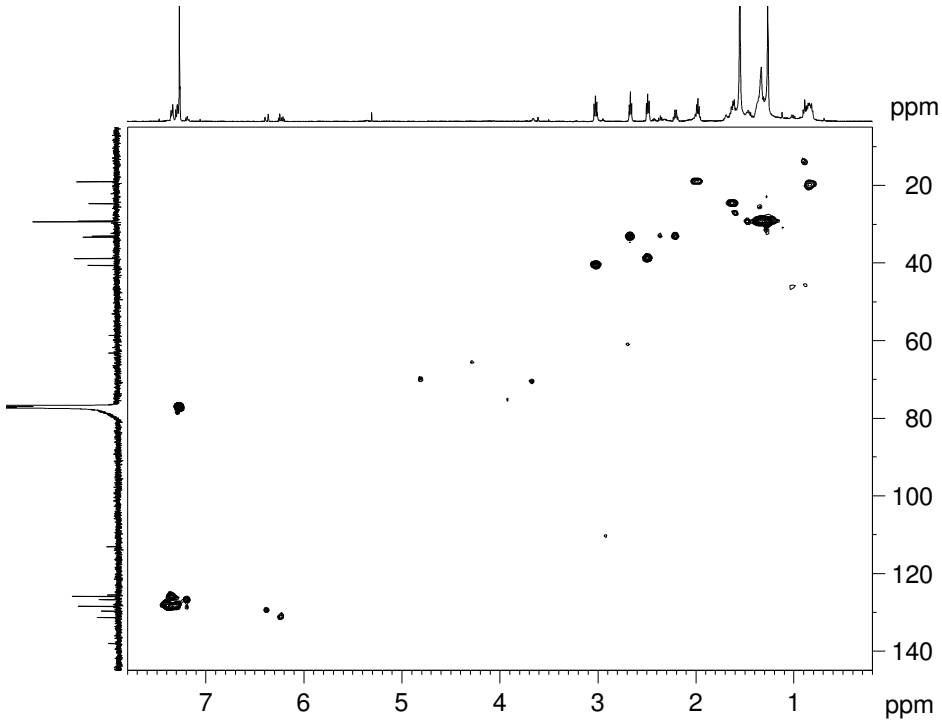


Figura 25: Mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

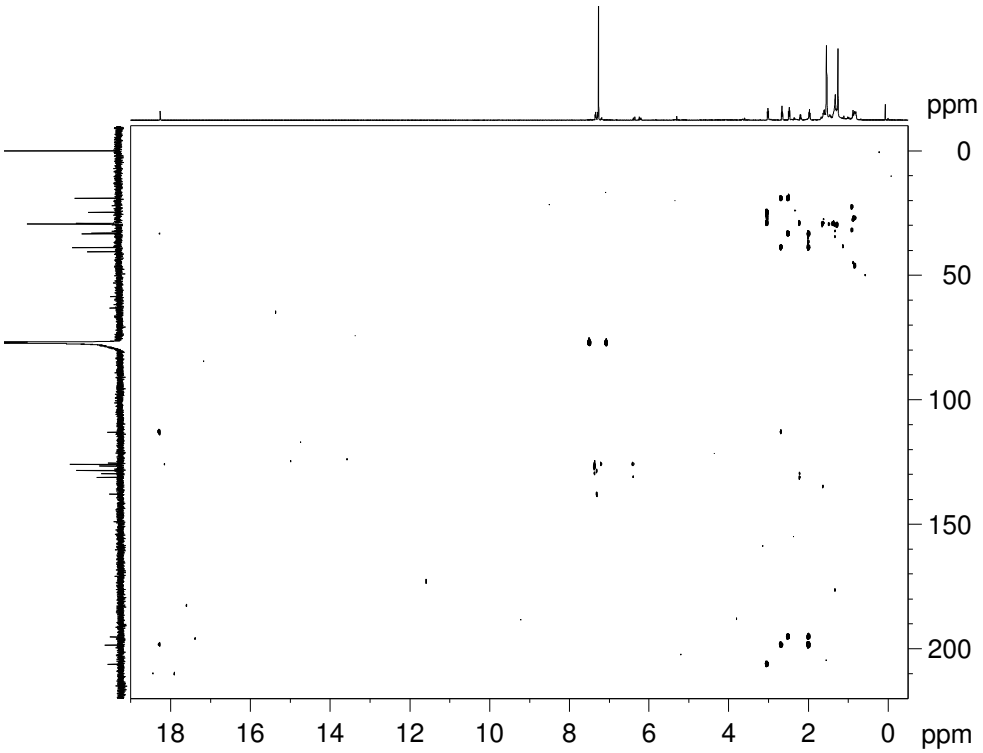


Figura 26: Mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

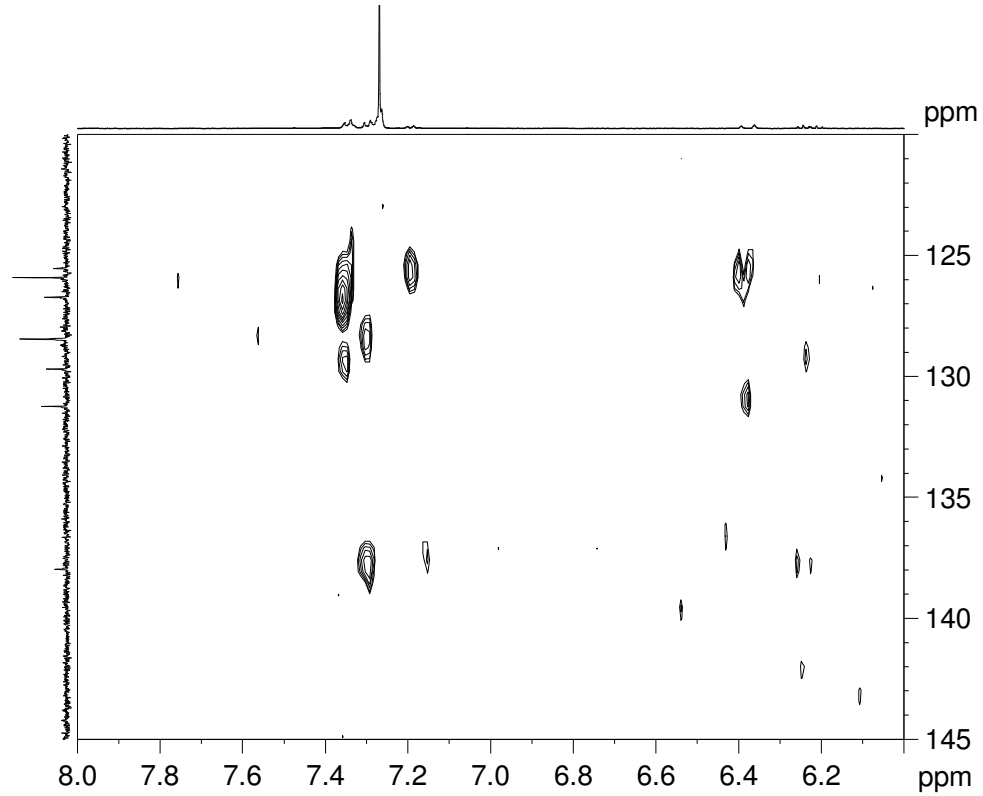


Figura 27: Ampliação de região do mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

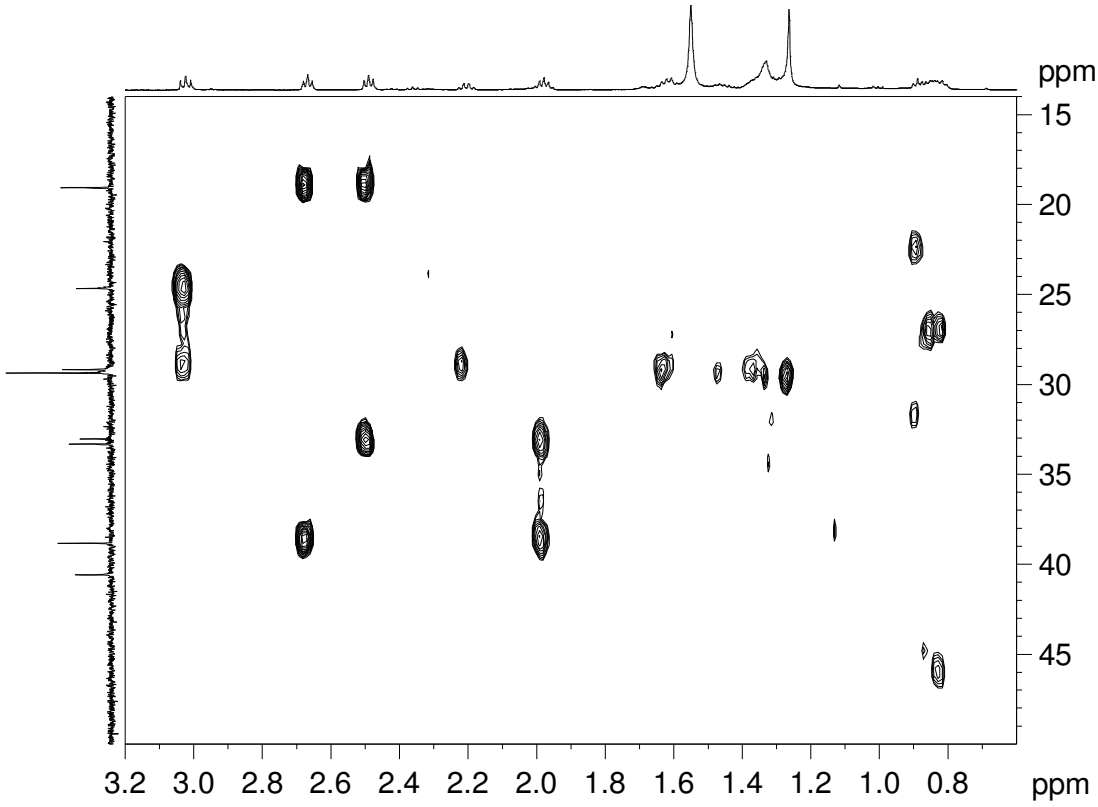


Figura 28: Ampliação de região do mapa de contornos de ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **1**.

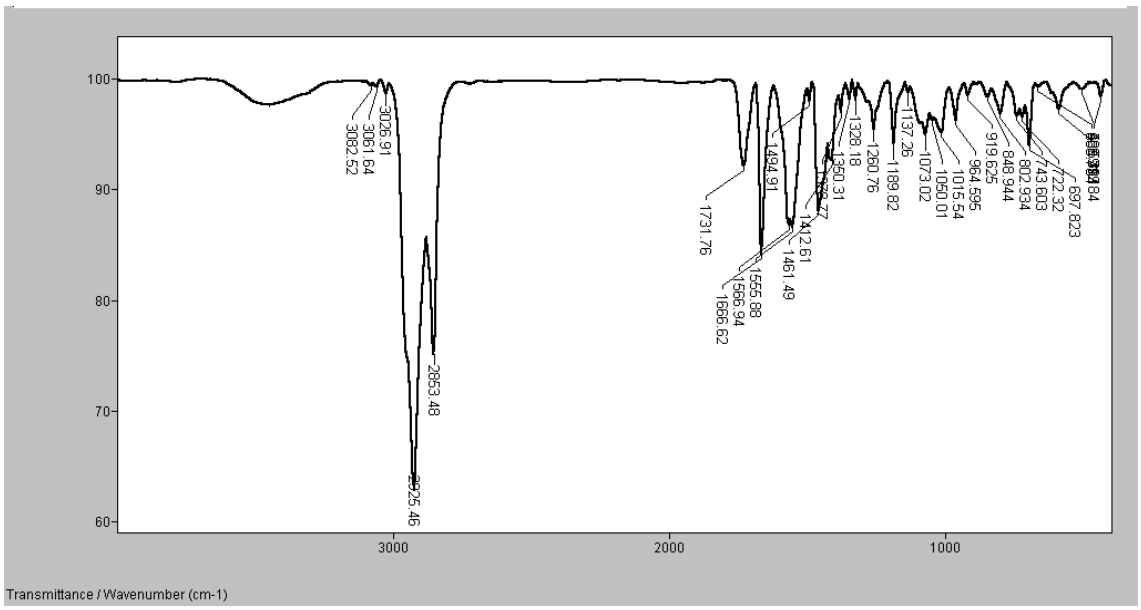


Figura 29: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **1**.

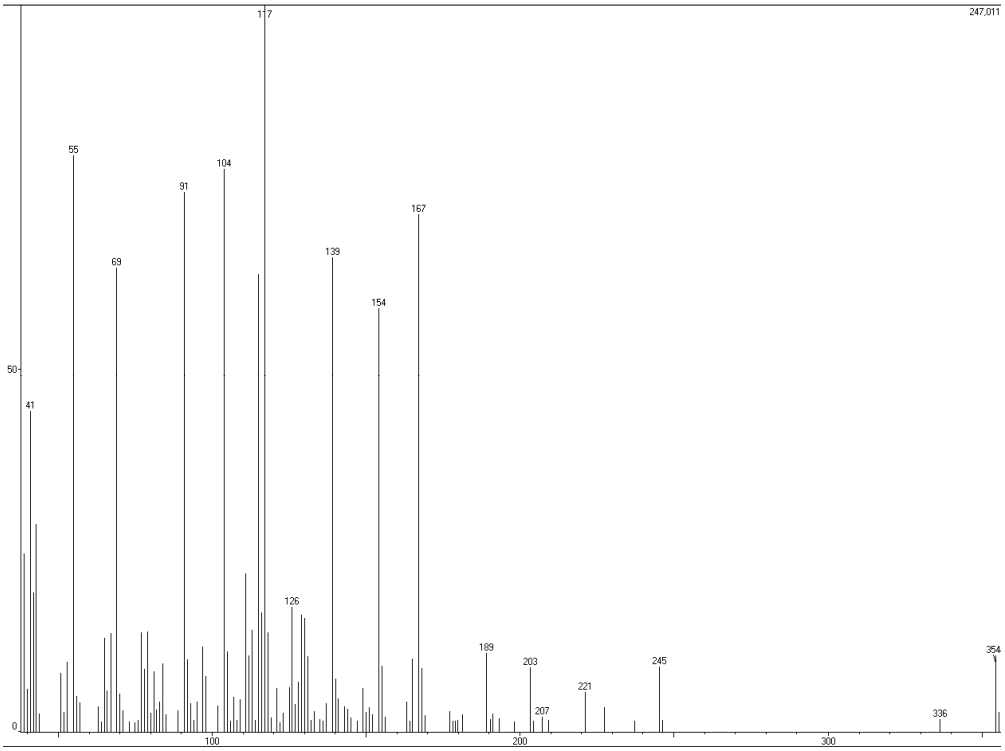


Figura 30: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **1**.

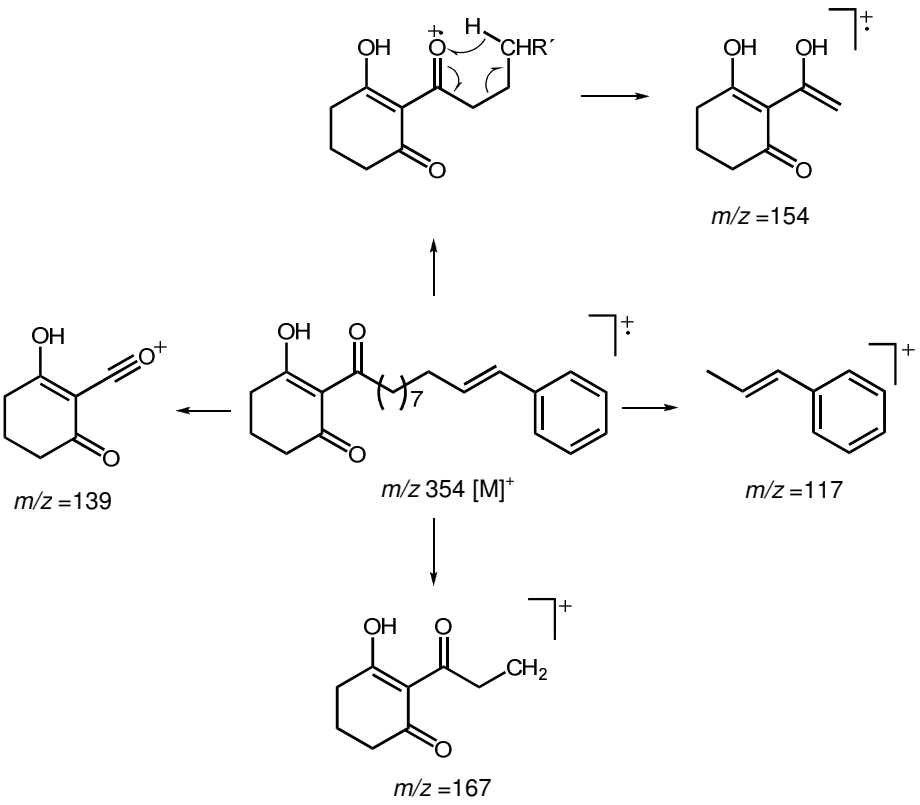


Figura 31: Proposta de fragmentações para os íons observados no espectro de massas de baixa resolução do policetídeo **1**.

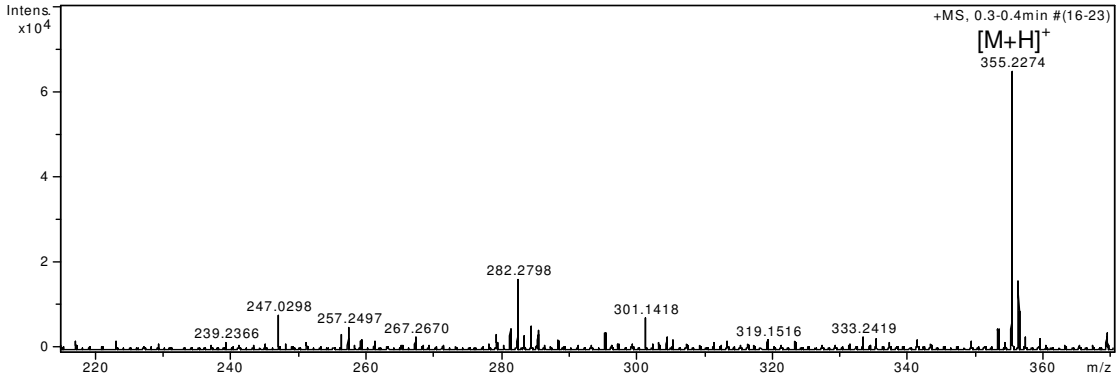


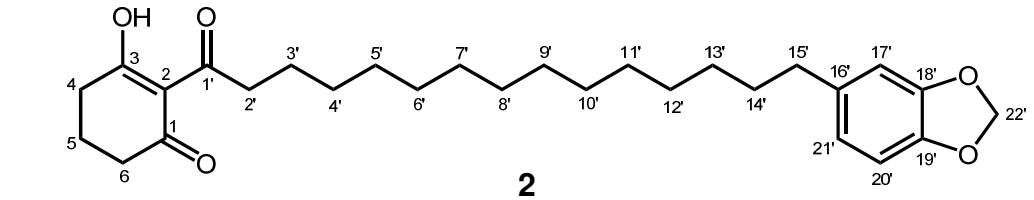
Figura 32: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **1**.

Tabela 9: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **1** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$).

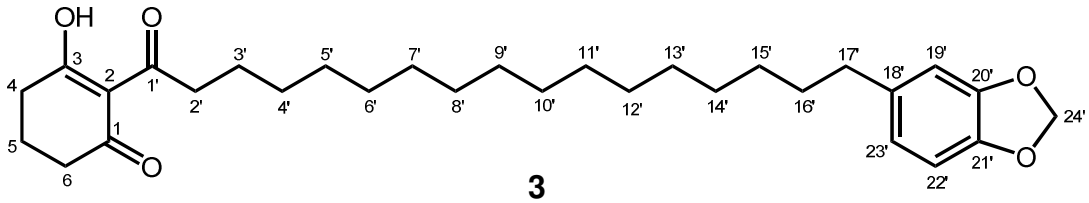
Posição	δ_H(multiplicidade, *J*/Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1	-	195,3	-	-
2	-	113,0	-	-
3	-	198,6	-	-
4	2,66 (*t*, 6,5)	33,3	H5	C2, C3, C5, C6
5	1,97 (*m*, 6,5)	19,1	H4, H6	C1, C3, C4, C6
6	2,48 (*t*, 6,5)	38,9	H5	C1, C4, C5
1´	-	206,3	H3’	C3’, C4’, C1’
2´	3,01 (*t*, 7,0)	40,6	H2’	C1’, C3’, C4’
3´	1,61 (*m*, 7,0)	24,7	-	-
4´	1,27 – 1,41 (*m*)	29,2-29,4	-	-
5´	1,27 – 1,41 (*m*)	29,2-29,4	-	-
6´	1,27 – 1,41 (*m*)	29,2-29,4	-	-
7´	1,27 – 1,41 (*m*)	29,2-29,4	-	-
8´	1,48 (*m*, 7,0)	32,3	H9’	C8’, C10’

9´	2,20 (*td*, 7,0;6,5;1,5)	33,0	H8', H10'	C7', C11'
10´	6,22 (*dt*, 16,0; 7,0)	131,2	H9', H11'	C12', C11'
11´	6,37 (*d*, 16,0)	129,7	H10'	C10', C13', C17'
12´	-	137,9	-	-
13´	7,31 – 7,36 (*m*)	125,9	-	C11', C17', C15'
14´	7,26 – 7,30 (*m*)	128,4	-	C12', C16'
15´	7,16 – 7,19 (*m*)	126,7	-	C13', C17'
16´	7,26 – 7,30 (*m*)	128,4	-	C12', C14'
17´	7,31 – 7,36 (*m*)	125,9	-	C11', C13', C15'
OH	18,26 (*s*)	-	-	C2, C3, C4

3-Hidróxi-2-(15'-fenil-18´-metilenodioxipentadecanoil)-2-cicloexen-1-ona (2) e 3-Hidróxi-2-(17'-fenil-20´-metilenodioxieptadecanoil)-2-cicloexen-1-ona (3)



2



3

O policetídeo **2** foi isolado como um óleo amarelado, em que sua fórmula molecular, $C_{28}H_{40}O_5$, foi determinada por CG-EM ($[M]^+$, *m/z* 456) (**Figura 46**) e HRESI ($[M+H]^+$, *m/z* 457,2947) (**Figura 47**).

O espectro no infravermelho (**Figura 45**) apresentou bandas em 1686, 1559, 1032 e 935 cm^{-1}, referentes a um grupo carbonila conjugado, grupo carbonila quelatado conjugado e ao grupo metilenodioxila, respectivamente.

Assim como o policetídeo **2**, o policetídeo **3** também foi isolado como um óleo amarelado, em que sua fórmula molecular, $C_{30}H_{44}O_5$, foi determinada por CG-EM ($[M]^+$, *m/z* 484) (**Figura 62**) e HRESI ($[M+H]^+$, *m/z* 485,3264) (**Figura 64**).

O espectro no infravermelho do policetídeo **3** (**Figura 61**) apresentou bandas em 1686, 1559, 1032 e 935 cm^{-1}, referentes a um grupo carbonila conjugado, grupo carbonila quelatado conjugado e ao grupo metilenodioxila, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C para os policetídeos **2** (**Figura 34-38**) e **3** (**Figura 48-52**) apresentaram os mesmos sinais referentes ao sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona observados nos espectros de RMN do policetídeo **1**. A proposta foi sustentada pelos espectros COSY (**Figura 39, 53** e **54**), HSQC (**Figura**

40 e 55) e HMBC (**Figura 41-44** e **Figura 56-60**), em que no espectro COSY foi possível observar as correlações entre H4 e H5; H5 e H4 e H6; H6 e H5; e as correlações observadas no espectro de HMBC estão apresentadas na **Figura 33**.

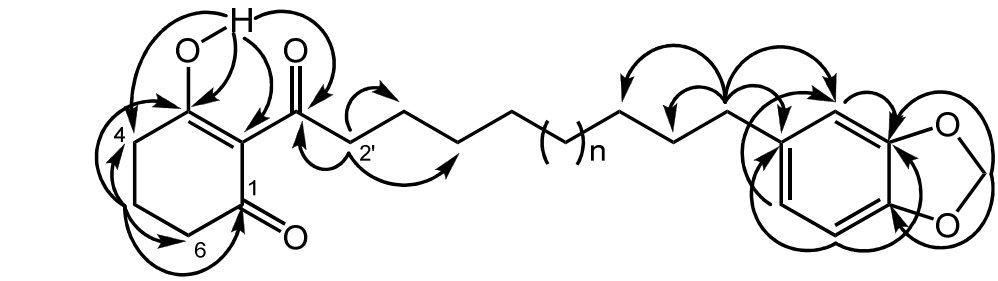
A presença dos sinais em δ 6,67 (*d*, *J*=1,5 Hz, H17'), δ 6,72 (*d*, *J*=8,0 Hz, H20'), δ 6,61 (*dd*, *J*=8,0 Hz e 1,5 Hz, 21') indica a ocorrência de um anel aromático trissubstituído em 16´, 18´ e 19´ para o policetídeo **2**; e em 18´, 20´ e 21´ para o policetídeo **3**.

A ocorrência de um simpleto em δ 5,91, H22', indica a existência do grupo metilenodioxílico.

O espectro de RMN de ^{13}C dos dois compostos indica a presença de uma grande cadeia alquílica com uma sobreposição de sinais na região de δ 29,2-29,7 e no espectro de RMN de ^{1}H a sobreposição de sinais ocorre na região de δ 1,22-1,38.

A diferenciação destes dois compostos somente foi possível mediante a observação dos espectros de massas que resultou em uma diferença m/z de 28 u.m.a., equivalente a duas unidades de metileno (CH_2). Com isto, a semelhança dos espectros de RMN de ^{1}H e de RMN de ^{13}C das duas substâncias pôde ser explicada. A única diferença entre os dois compostos estava no tamanho da cadeia alquílica, não sendo possível diferenciá-las pelos espectros de RMN, pois ocorre uma grande sobreposição de sinais tanto no espectro de RMN de ^{1}H, quanto no espectro de RMN de ^{13}C.

A proposta foi confirmada por espectrometria de massas de baixa resolução, onde foi possível identificar os íons fragmentários propostos na elucidação estrutural (**Figura 63**).



n= 7, 9

Figura 33: Algumas correlações HMBC dos policetídeos **2** e **3**.

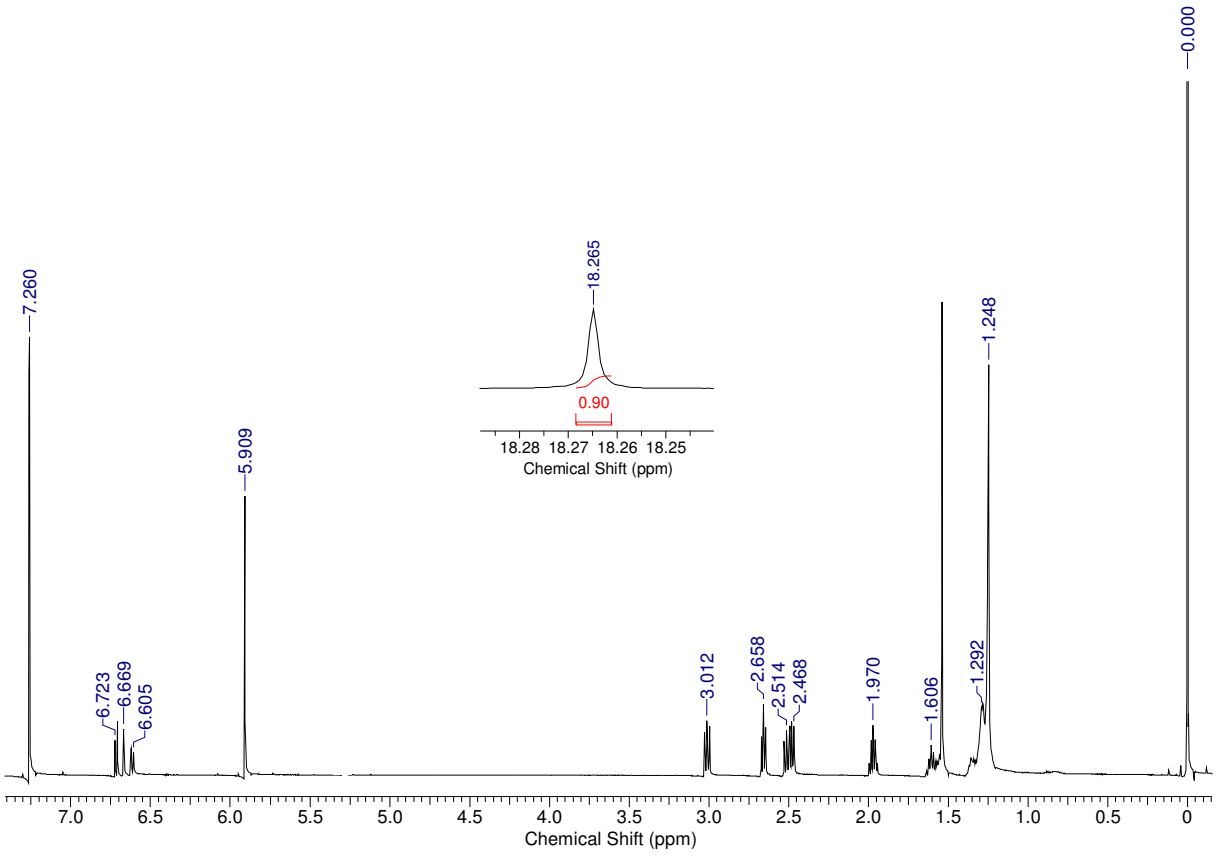


Figura 34: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

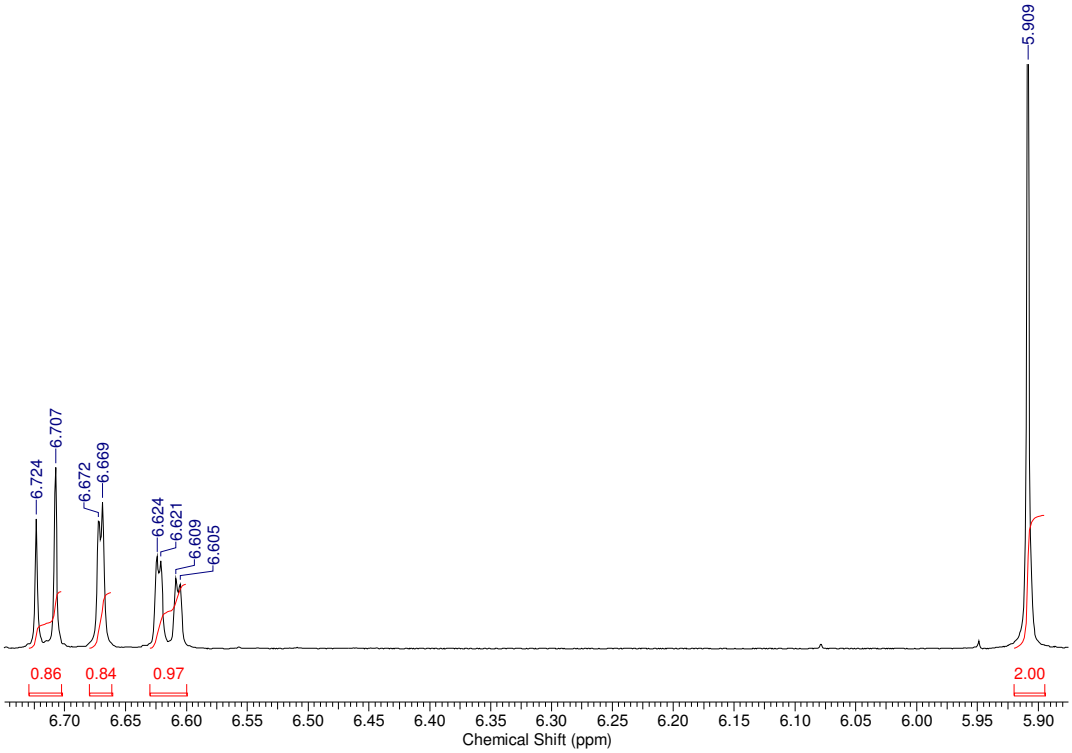


Figura 35: Ampliação da região de δ 5,85 a 6,80 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

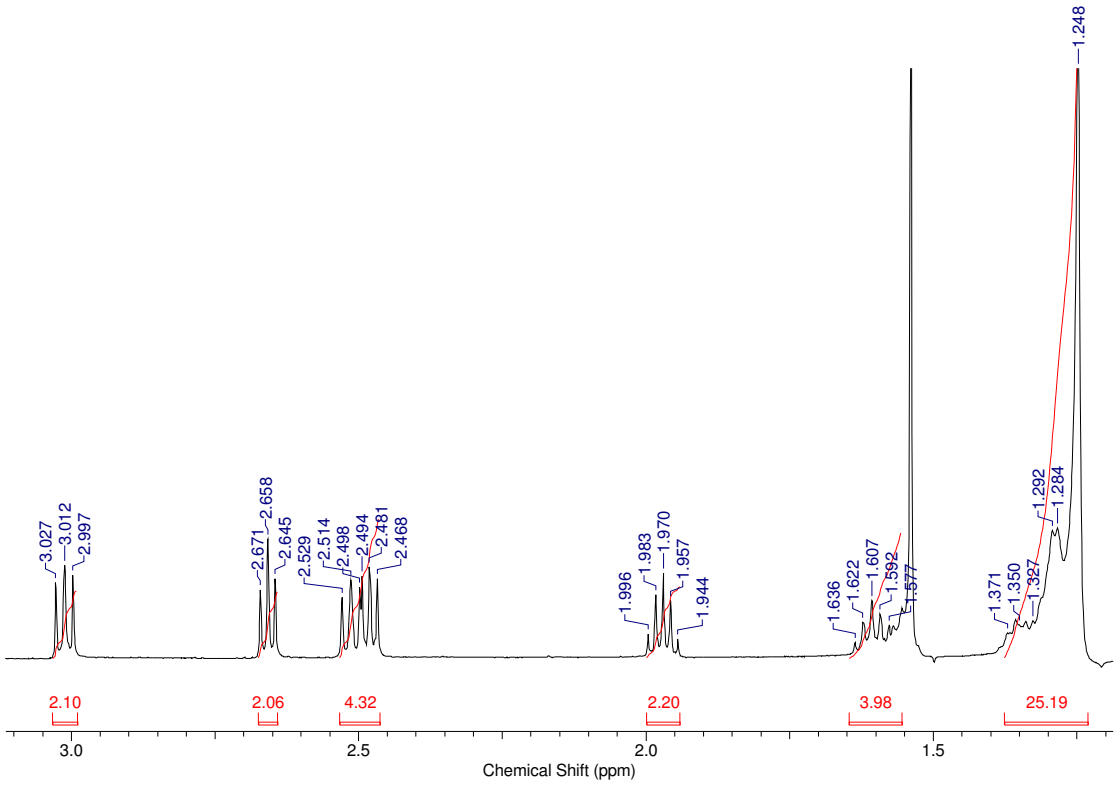


Figura 36: Ampliação da região de δ 0,9 a 3,2 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

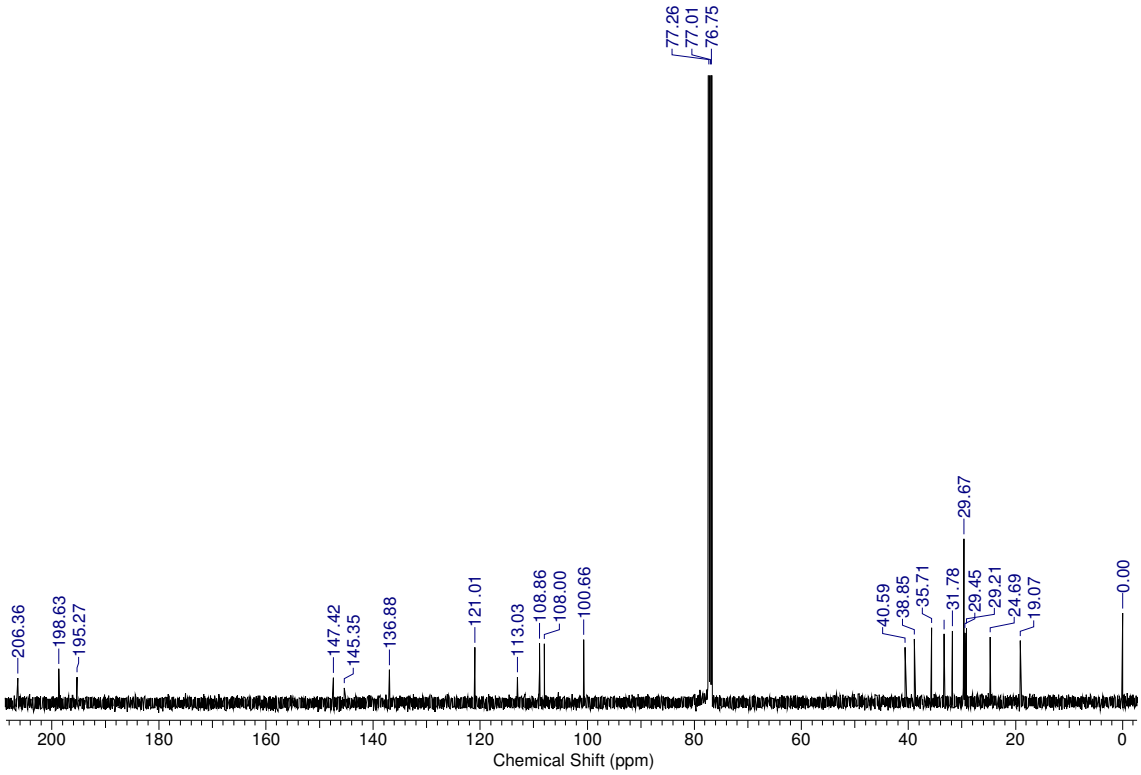


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

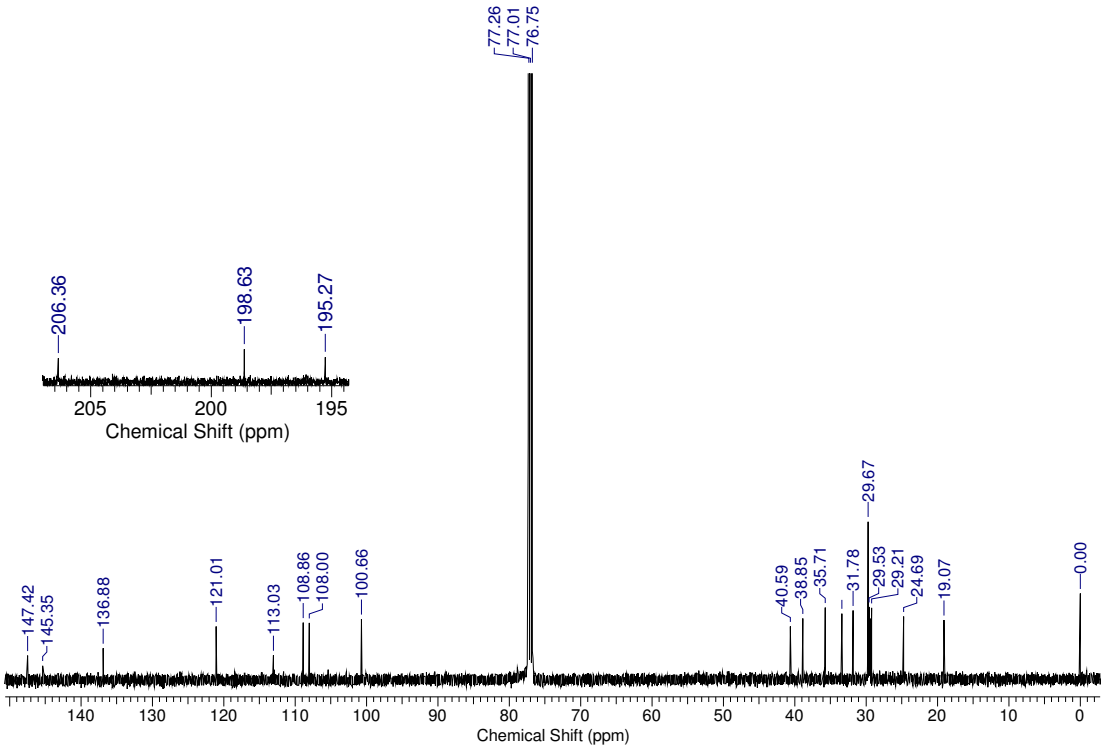


Figura 38: Ampliação da região de δ 0,0 a 150,0 e δ 194,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

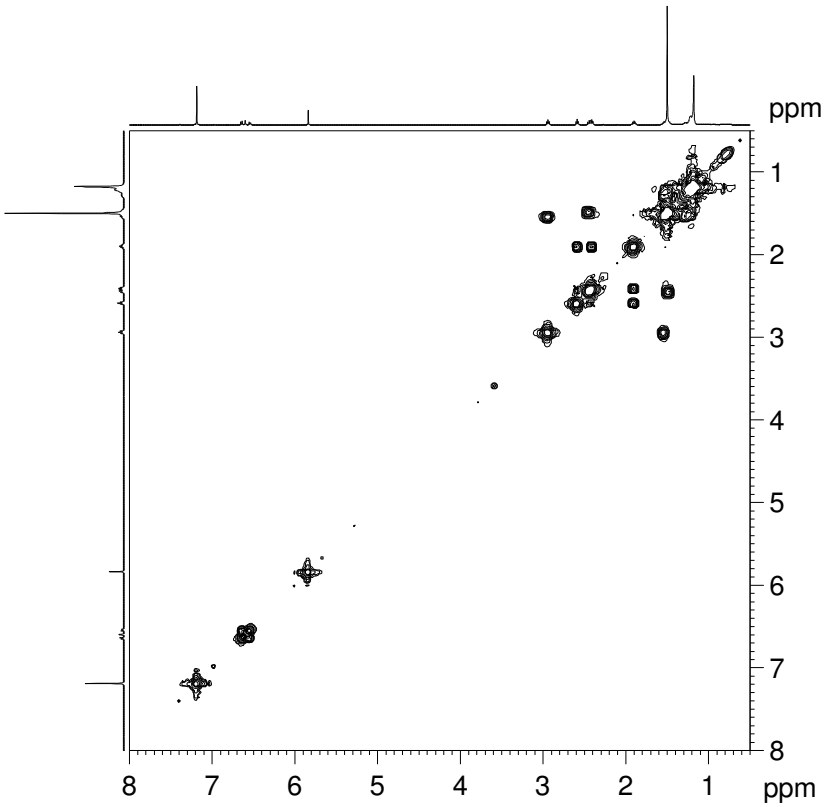


Figura 39: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

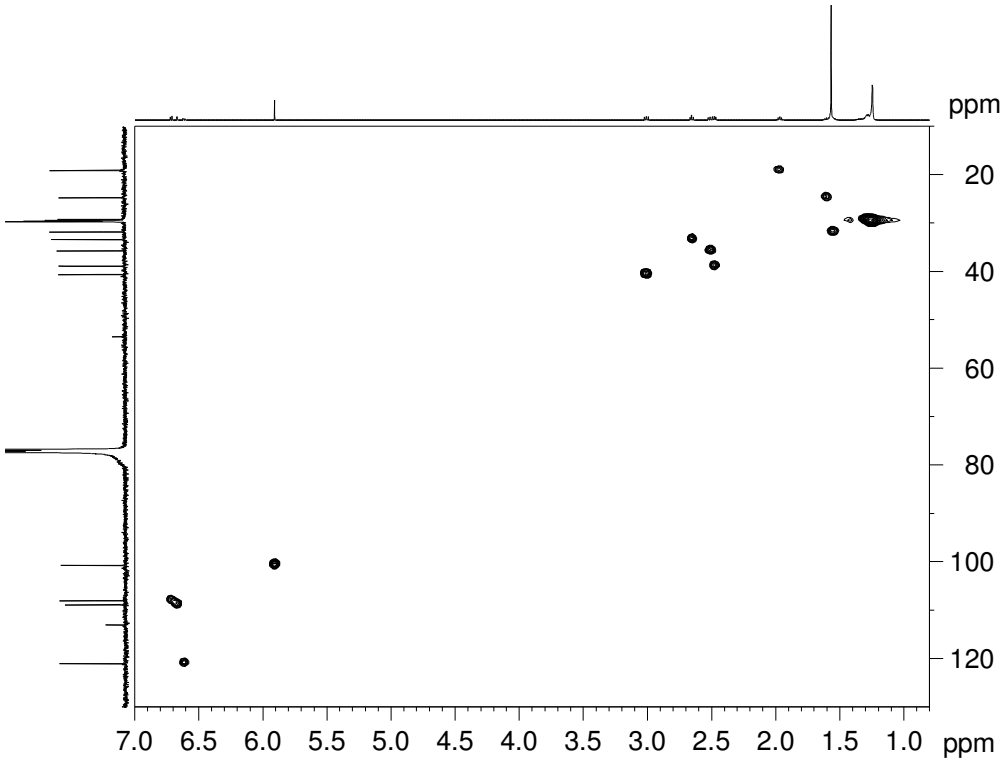


Figura 40: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

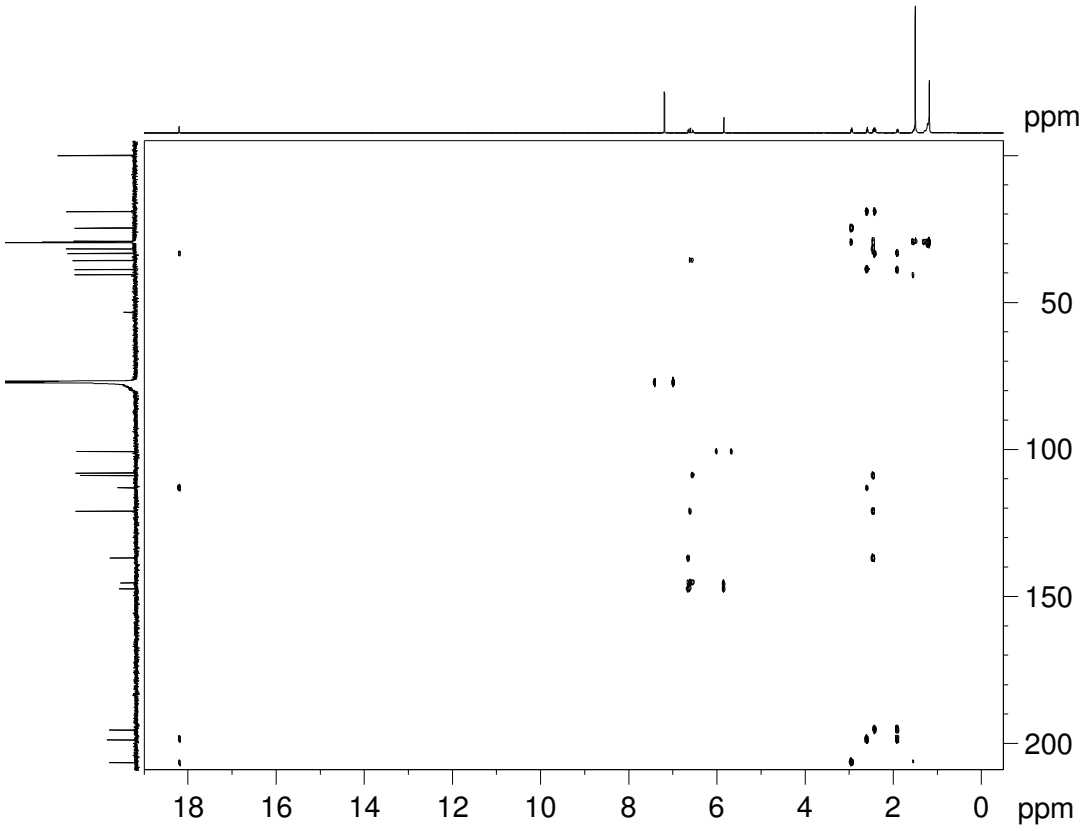


Figura 41: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

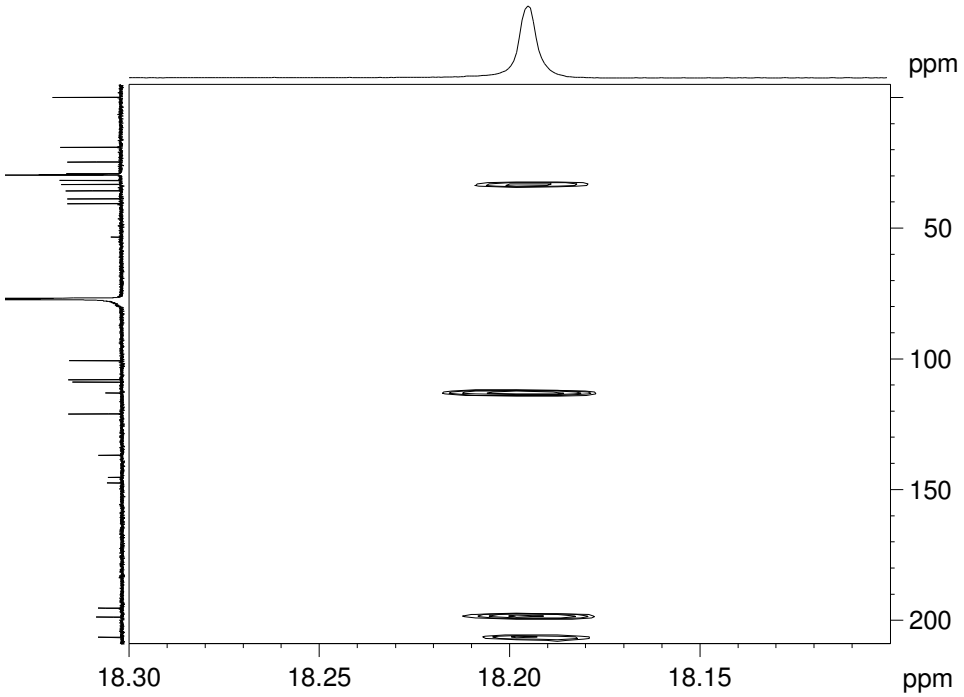


Figura 42: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

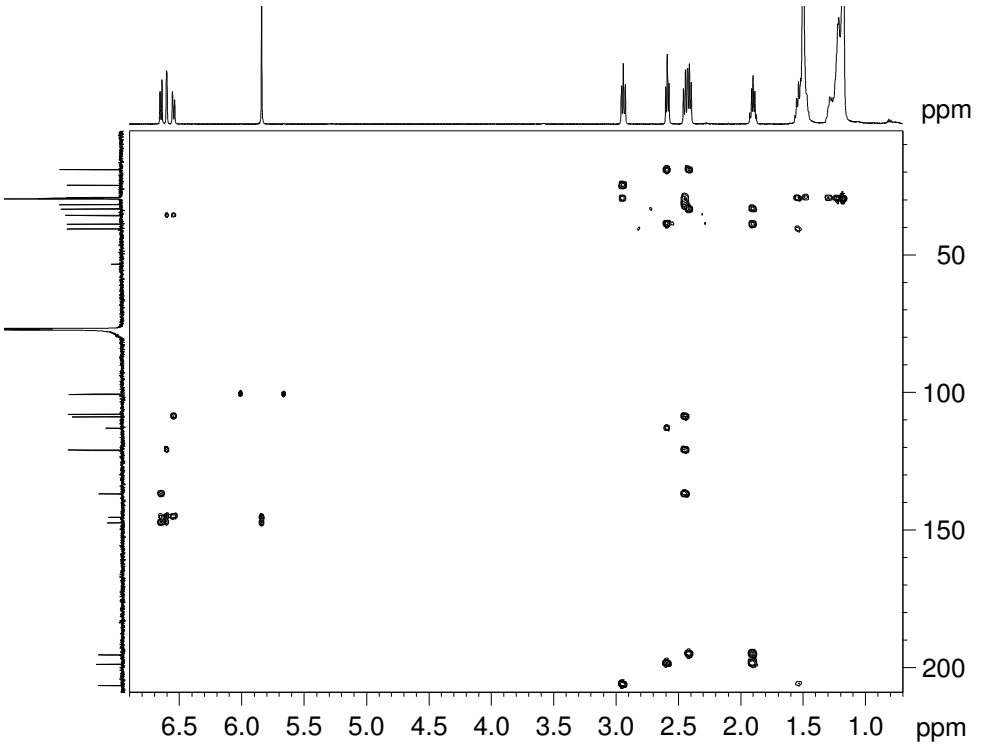


Figura 43: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, CDCl3) do policetídeo **2**.

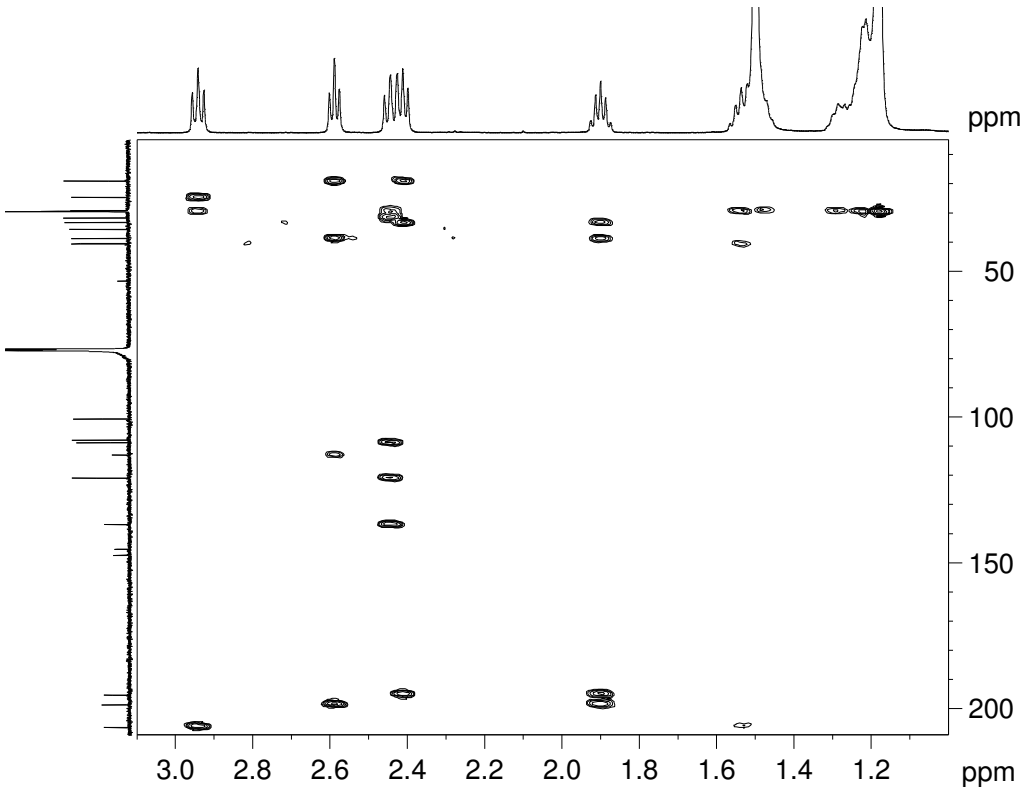


Figura 44: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **2**.

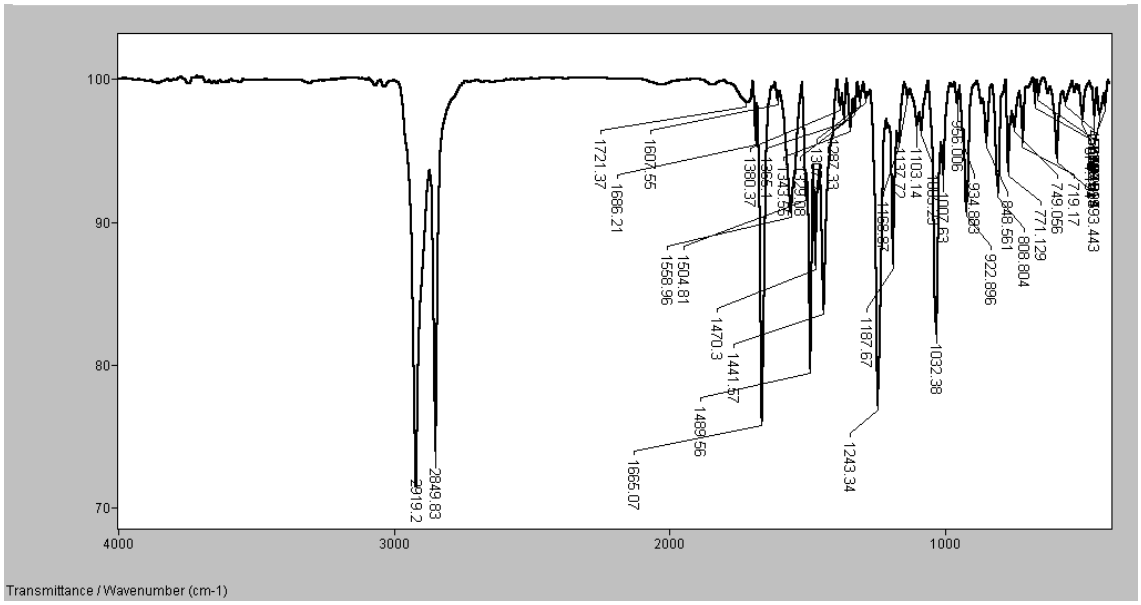


Figura 45: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **2**.

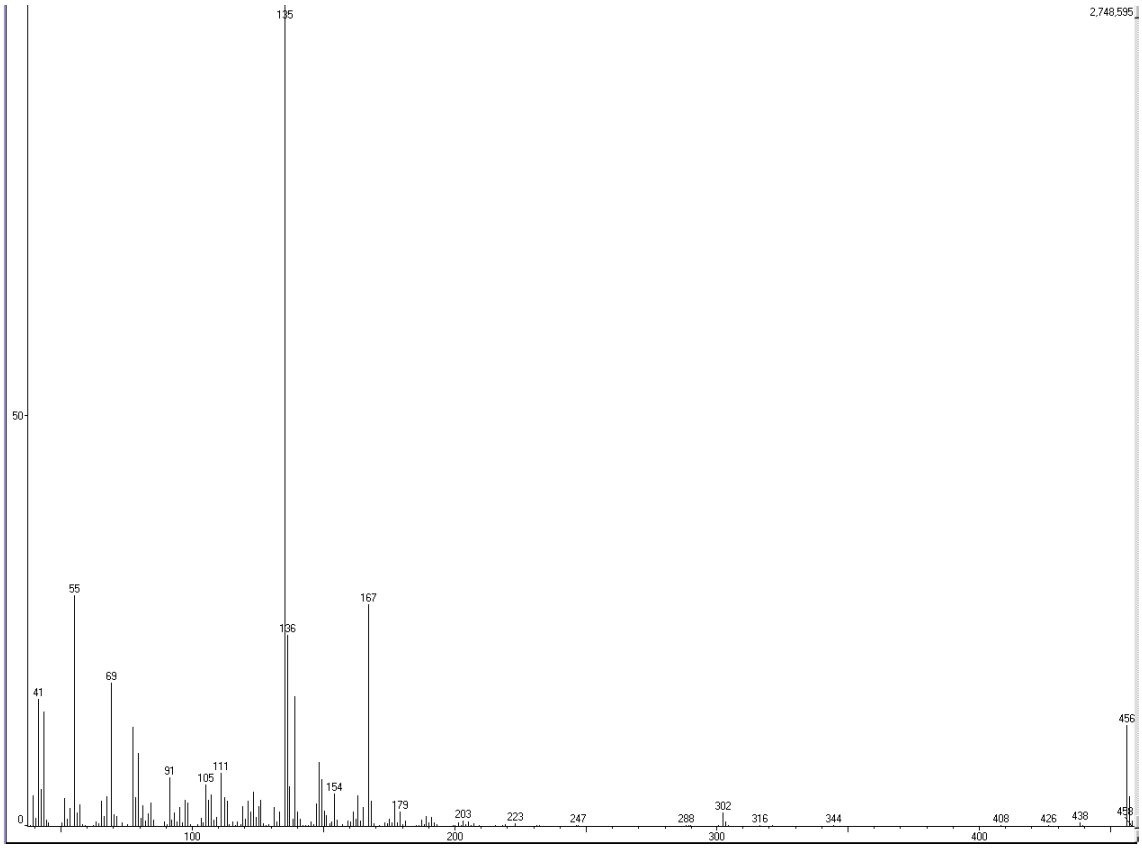


Figura 46: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **2**.

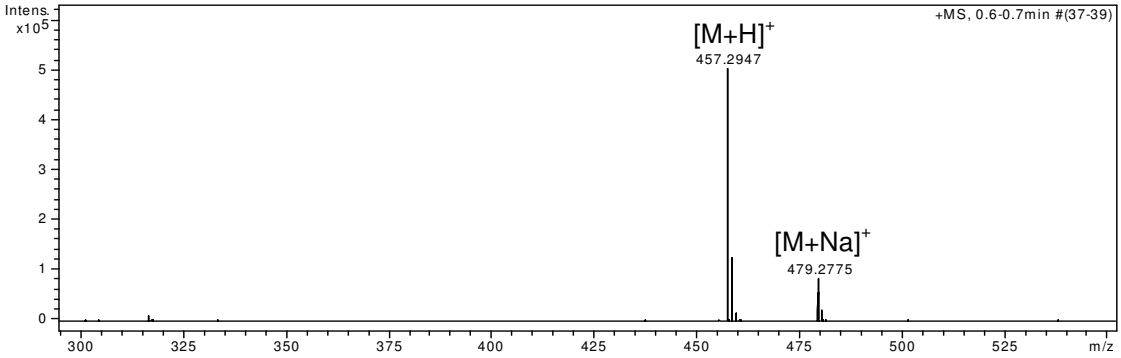


Figura 47: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **2**.

Tabela 10: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **2** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δ_H(multiplicidade, *J*/Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1	-	195,3	-	-
2	-	113,0	-	-
3	-	198,6	-	-
4	2,66 (*t*, 6,5)	33,3	H5	C2,C3, C5, C6
5	1,97 (*m*, 6,5)	19,1	H4, H6	C1,C3,C4, C6
6	2,48 (*t*, 6,5)	38,9	H5	C1, C4, C5
1´	-	206,4	-	-
2´	3,01 (*t*, 7,5)	40,6	H3’	C1’, C3’, C4’
3´	1,53-1,64 (*m*)	24,7	H2’	C1’, C2’, C4’
4´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
5´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
6´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
7´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
8´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-

9´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
10´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
11´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
12´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
13´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
14´	1,53-1,64 (*m*)	31,8	H15’	C13’
15´	2,51 (*t*, 7,5)	35,7	H14’	C13’, C14’, C16’, C17’, C21’
16´	-	136,9	-	-
17´	6,67 (*d*, 1,5)	108,9	-	C15’, C18’, C19’, C21’
18´	-	145,3	-	-
19´	-	147,4	-	-
20´	6,71 (*d*, 8,0)	108,0	H21’	C16’, C18’, C19’
21´	6.61 (*dd*, 8,0; 1,5)	121,0	H20’	C15’, C17’, C18’
22´	5,91 (*s*)	100,7	-	C18’, C19’
OH	18,26 (*s*)	-	-	C2, C3, C4, C1’

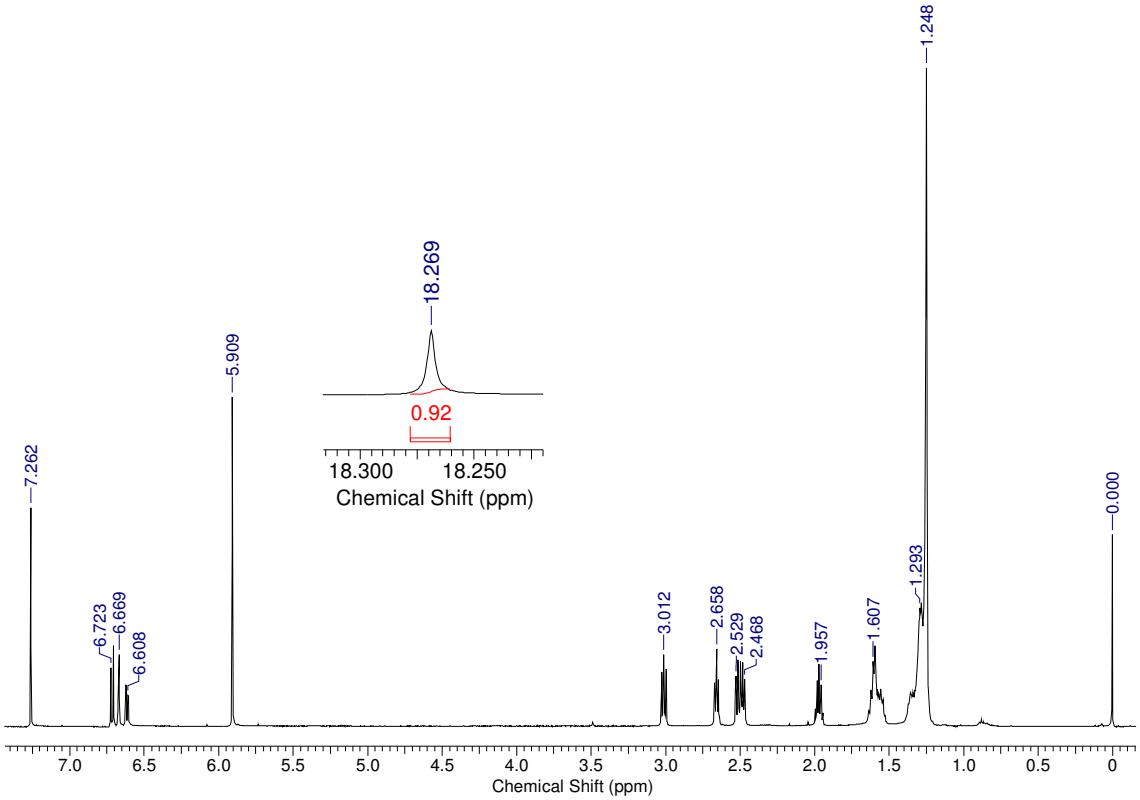


Figura 48: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

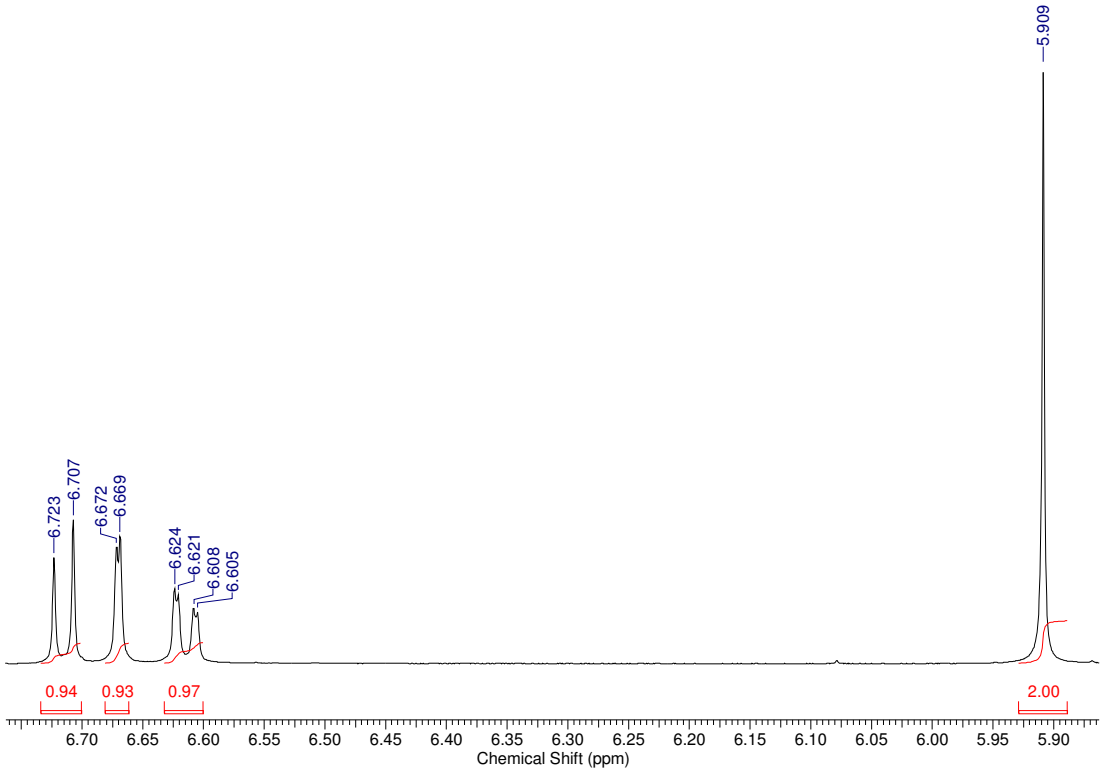


Figura 49: Ampliação da região de δ 5,78 a 7,77 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

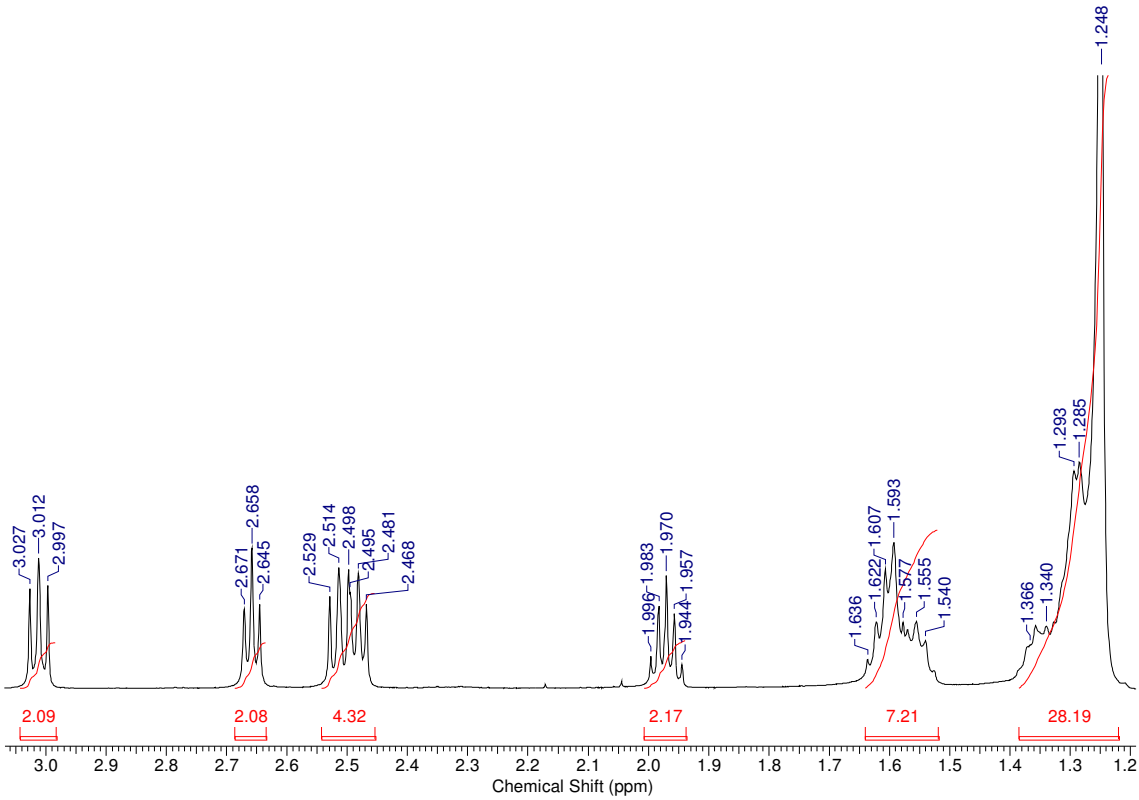


Figura 50: Ampliação da região de δ 1,20 a 3,11 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

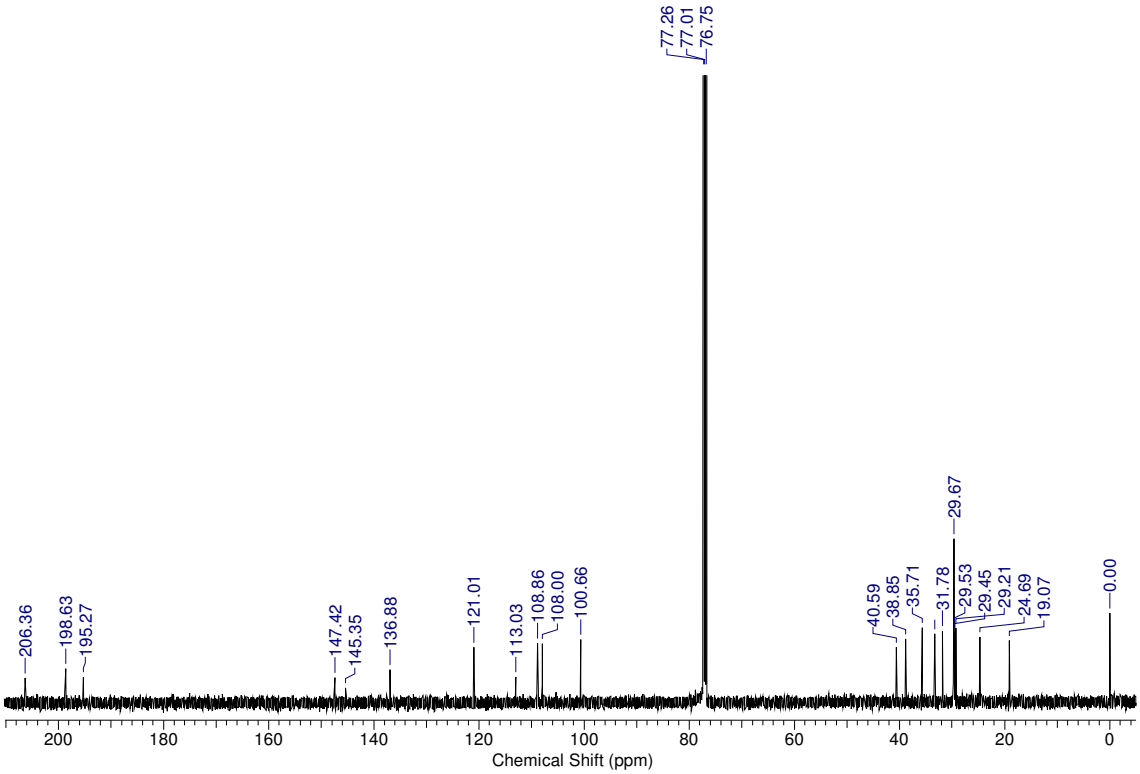


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

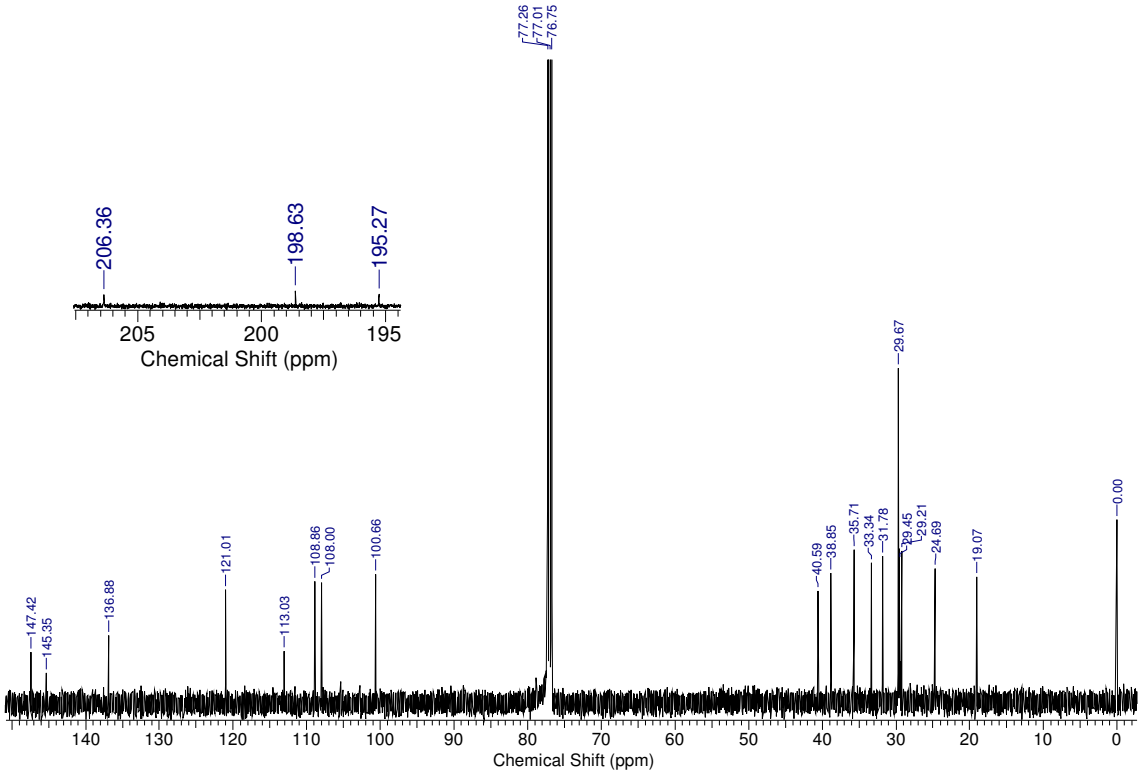


Figura 52: Ampliação da região de δ 0,0 a 150,0 e de δ 194,0 a 208,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

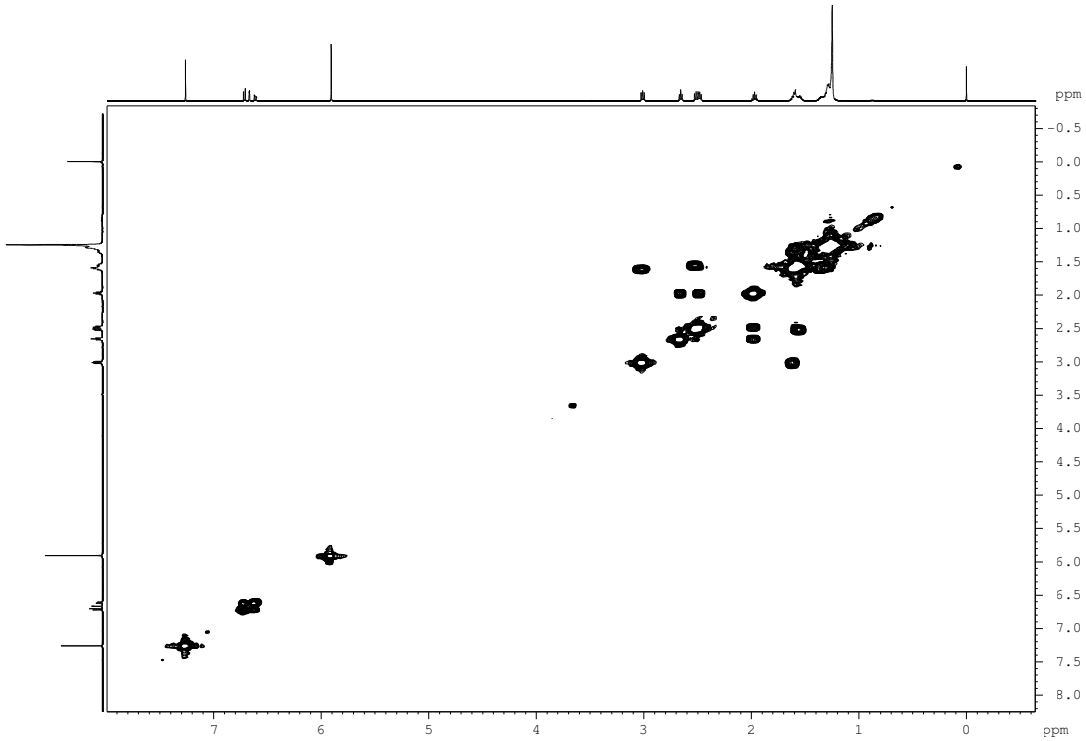


Figura 53: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

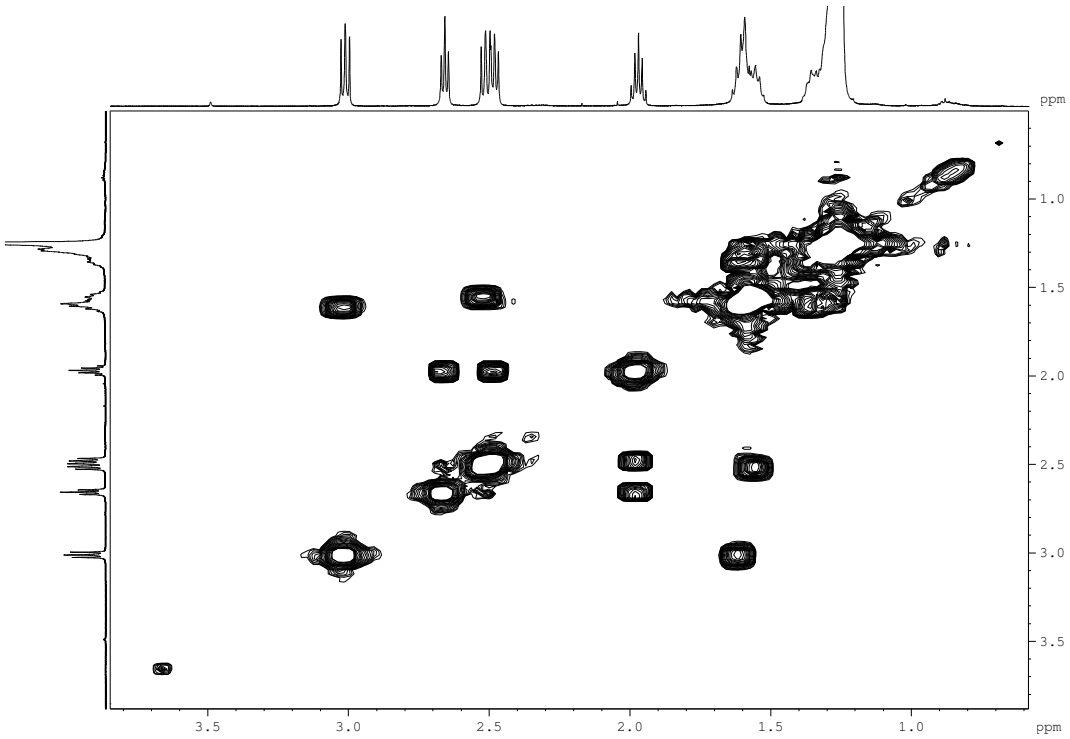


Figura 54: Ampliação da região de δ 0,0 a 3,8 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

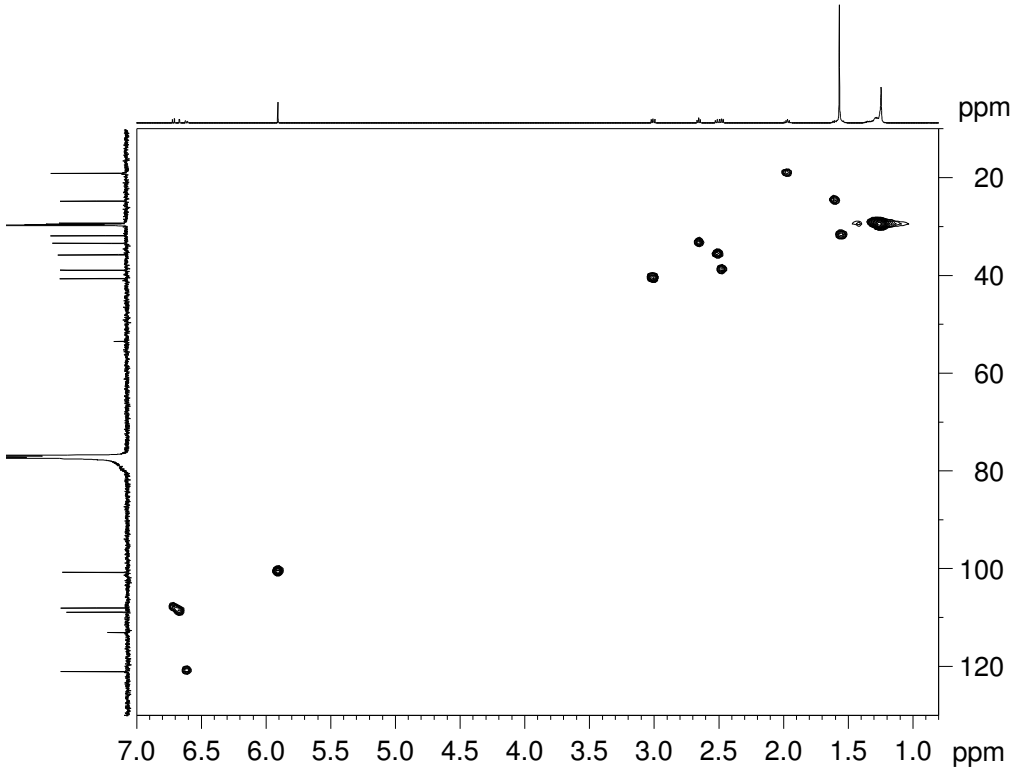


Figura 55: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

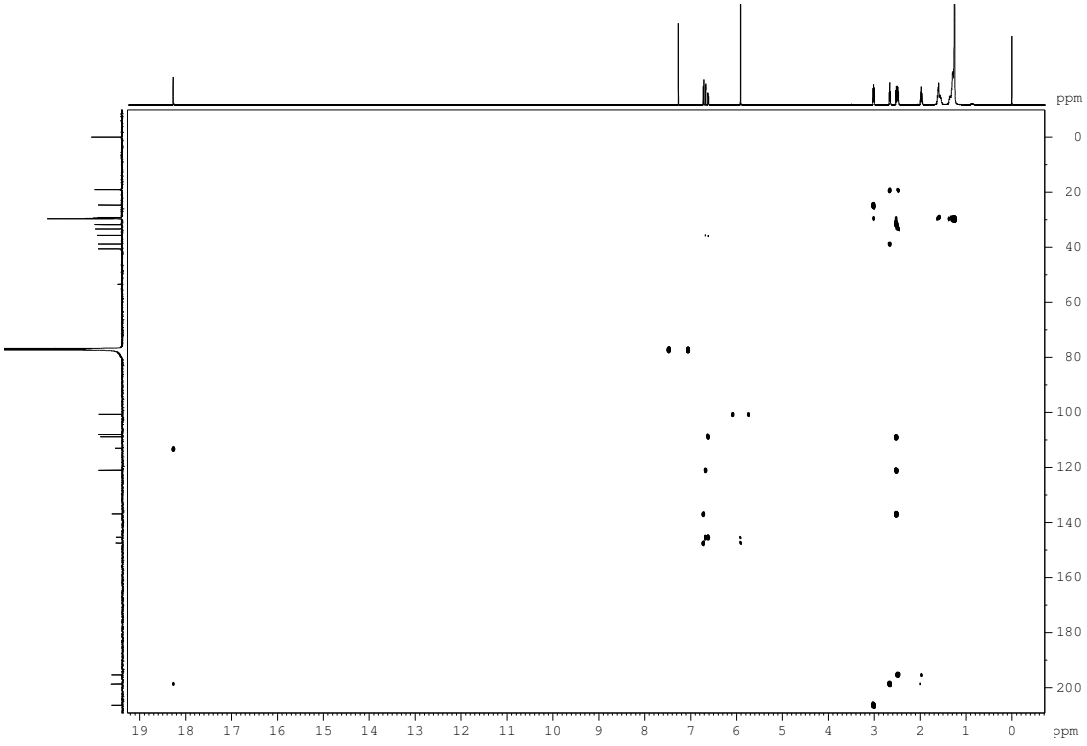


Figura 56: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

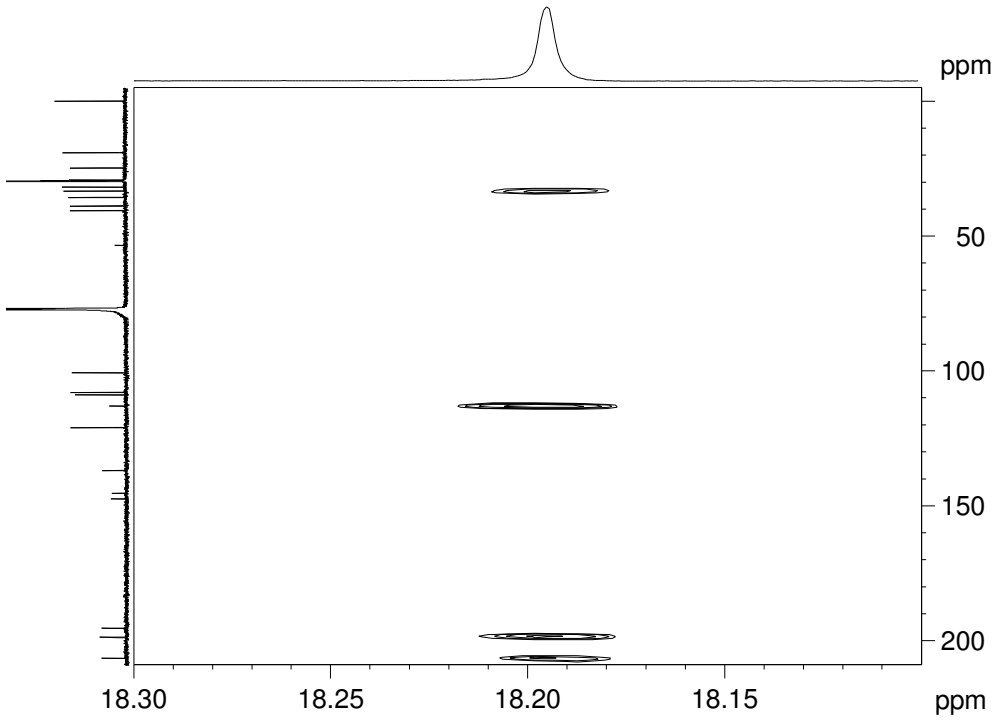


Figura 57: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

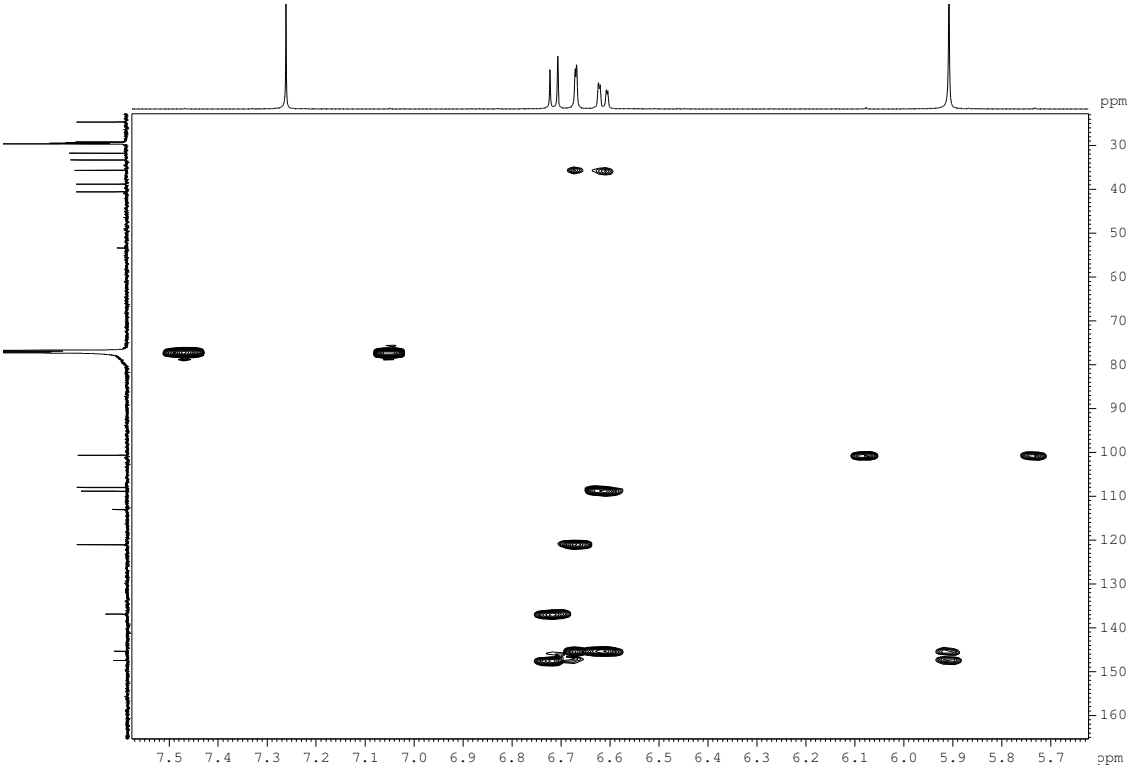


Figura 58: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

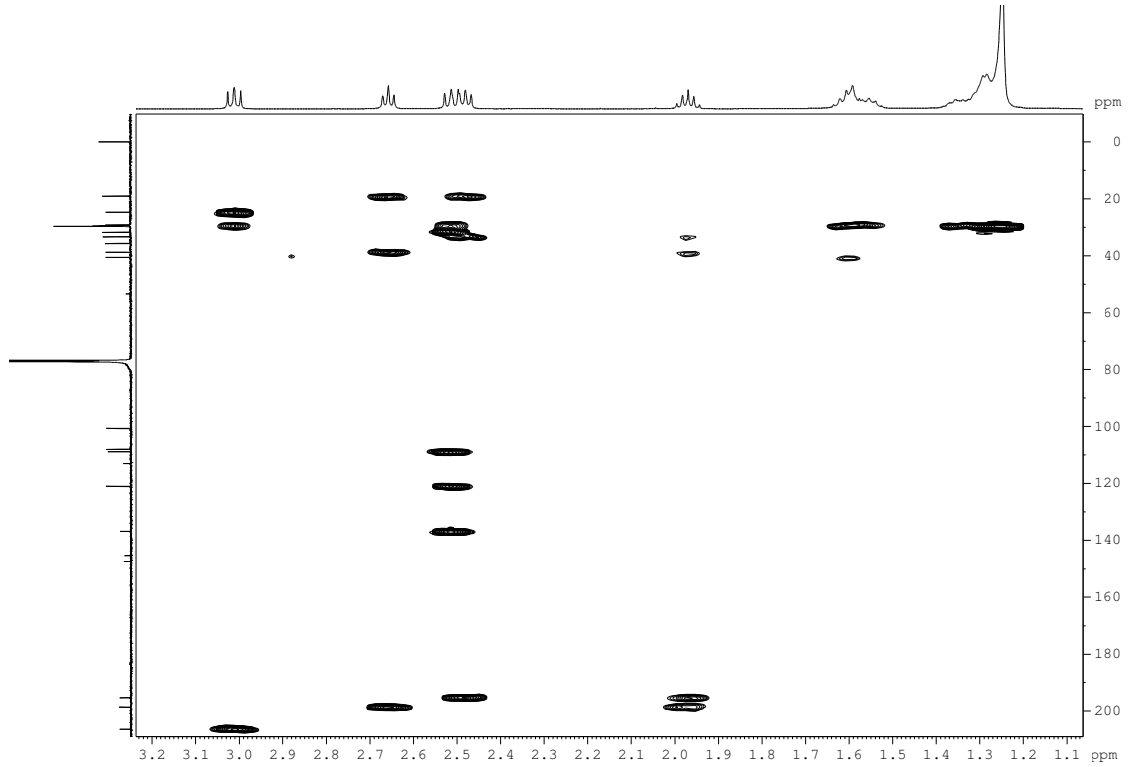


Figura 59: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

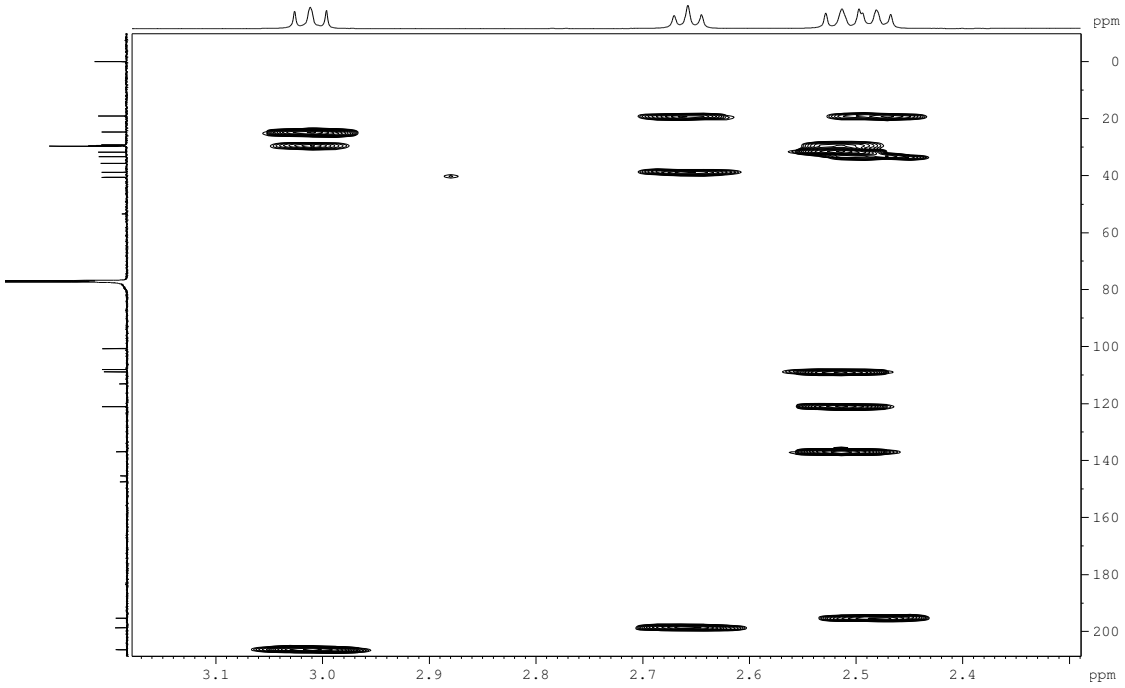


Figura 60: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **3**.

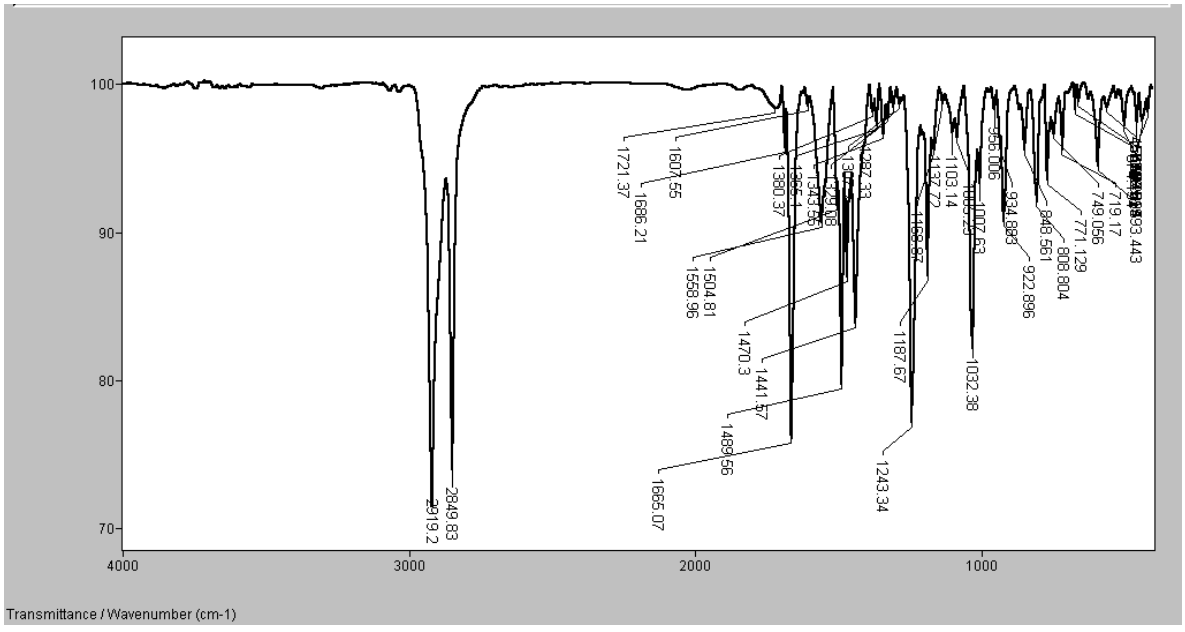


Figura 61: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **3**.

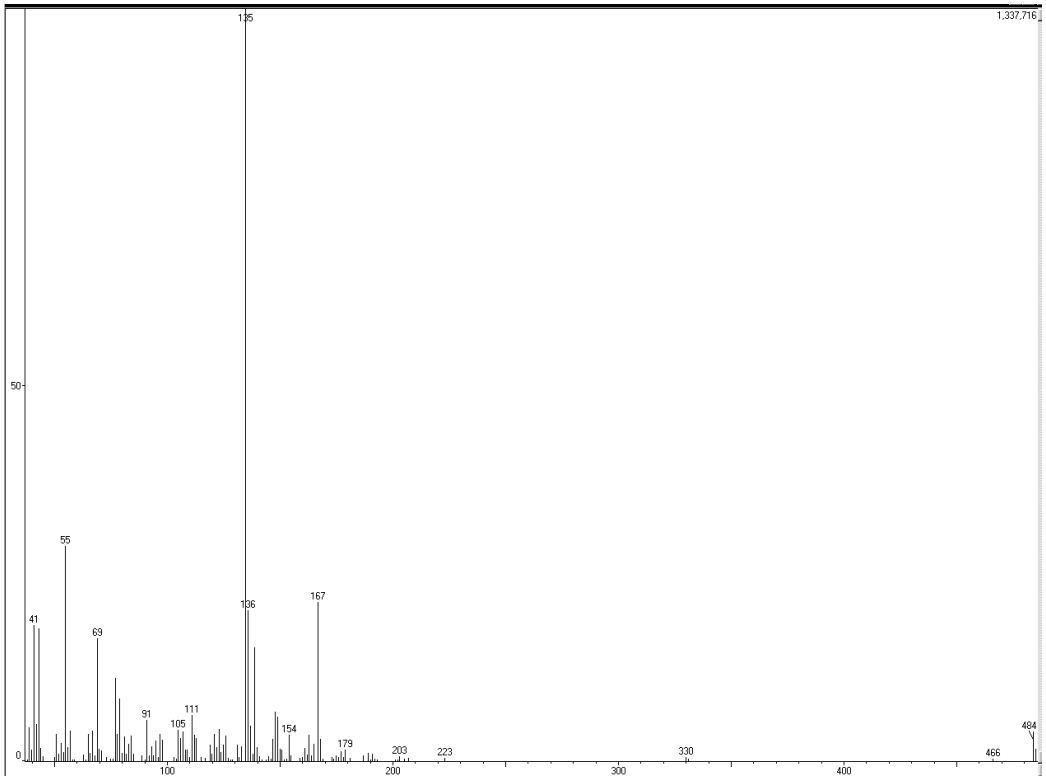


Figura 62: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **3**.

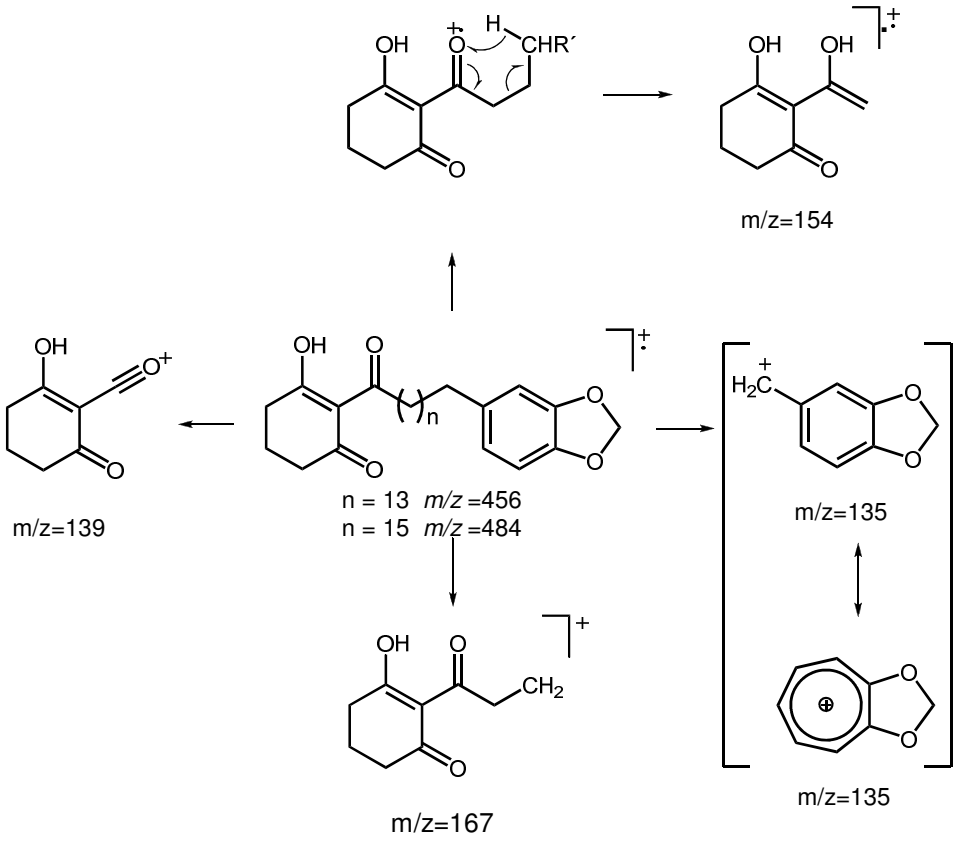


Figura 63: Proposta de fragmentação para os policetídeos **2** e **3**.

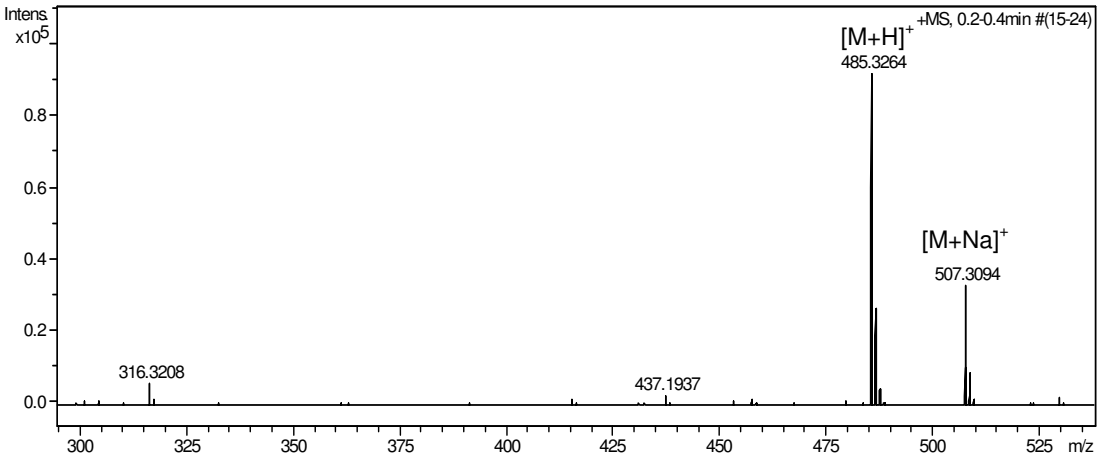


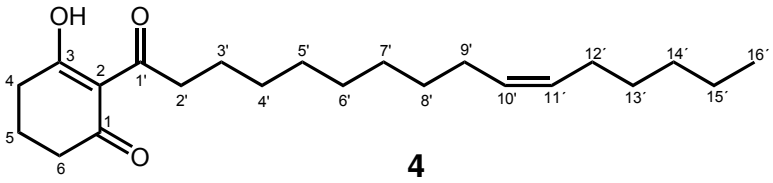
Figura 64: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **3**.

Tabela 11: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **3** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δ_H(multiplicidade, *J*/Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1	-	195,3	-	-
2	-	113,0	-	-
3	-	198,6	-	-
4	2,66 (*t*, 6,5)	33,3	H5	C2,C3, C5, C6
5	1,97 (*m*, 6,5)	19,1	H4, H6	C1,C3,C4, C6
6	2,48 (*t*, 6,5)	38,9	H5	C1, C4, C5
1´	-	206,3	-	-
2´	3,01 (*t*, 7,5)	40,6	H3'	C1', C3', C4'
3´	1,52 - 1,65 (*m*)	24,7	H2'	C1', C2', C4'
4´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
5´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
6´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-

7´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
8´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
9´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
10´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
11´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
12´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
13´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
14´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
15´	1,22 - 1,38 (*m*)	29,2-29,7	-	-
16´	1,52 - 1,65 (*m*)	31,8	H17’	C15’
17´	2,51 (*t*, 7,5)	35,7	H16’	C15’, C16’, C18’, C19’, C23’
18´	-	136,9	-	-
19´	6,67 (*d*, 1,5)	108,9	-	C17’, C20’, C21’, C23’
20´	-	145,3	-	-
21´	-	147,4	-	-
22´	6,71 (*d*, 8,0)	108,0	H23’	C18’, C20’, C21’
23´	6,61 (*dd*, 8,0; 1,5)	121,0	H22’	C17’,C19’,C20’
24´	5,91 (*s*)	100,7	-	C20’, C21’
OH	18,27 (*s*)	-	-	C2, C3, C4, C1’

3-Hidróxi-2-[(10*Z*)-hexadecanoil)-2-cicloexen-1-ona (4)



4

O policetídeo **4** foi isolado como um óleo amarelado, em que sua fórmula molecular, $C_{22}H_{36}O_3$, foi determinada por CG-EM ($[M]^+$, *m/z* 348) (**Figura 77**) e HRESI ($[M+H]^+$, *m/z* 349,2751) (**Figura 79**).

O espectro no infravermelho (**Figura 76**) apresentou bandas em 3004, 1669 e 1560, referentes a um grupo hidroxila quelado, grupo carbonila conjugado e um grupo carbonila quelado conjugado, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^{1}H (**Figura 66** e **67**) e de RMN de ^{13}C (**Figura 68** e **69**) apresentaram os mesmos sinais referentes ao sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona observados nos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos policetídeos anteriores, assim como as correlações nos espectros HMBC (**Figura 72-75**) e COSY (**Figura 70** e **71**) entre H4 e H5; H5 e H4, H6; H6 e H5. As principais correlações no espectro HMBC estão apresentadas na **Figura 65**.

O espectro de RMN de ^{13}C indica a presença de uma longa cadeia carbônica com uma sobreposição de sinais na região de δ 29,2-29,7 e no espectro de RMN de ^{1}H, uma sobreposição de sinais na região de δ 1,22-1,38, com uma insaturação referente ao tripleto localizado em δ 5,35 no espectro de RMN de ^{1}H. A localização desta ligação dupla foi estabelecida com base na análise do espectro de massas de baixa resolução (**Figura 78 b**).

A geometria *cis* foi atribuída com base nos deslocamentos químicos dos carbonos 9' e 12' (δ 27,2 e 26,9) (Haan e Ven, 1973).

No espectro de RMN de ^{1}H em δ 0,90 é possível observar um tripleto que é atribuído a uma metila terminal. A proposta foi confirmada por espectrometria de massas de baixa resolução, onde foi possível identificar a massa dos íons fragmentários propostos na elucidação estrutural (**Figura 78**).

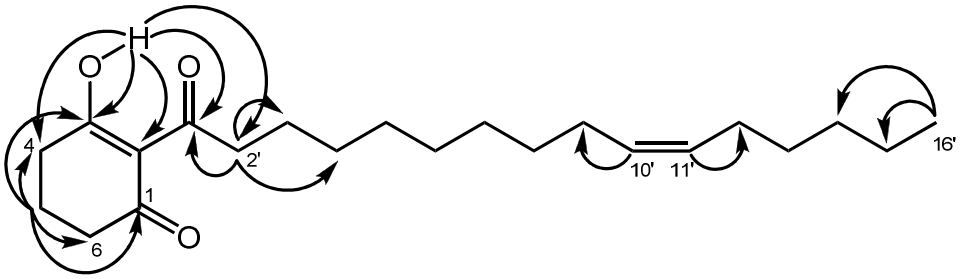


Figura 65: Algumas correlações HMBC do policetídeo **4**.

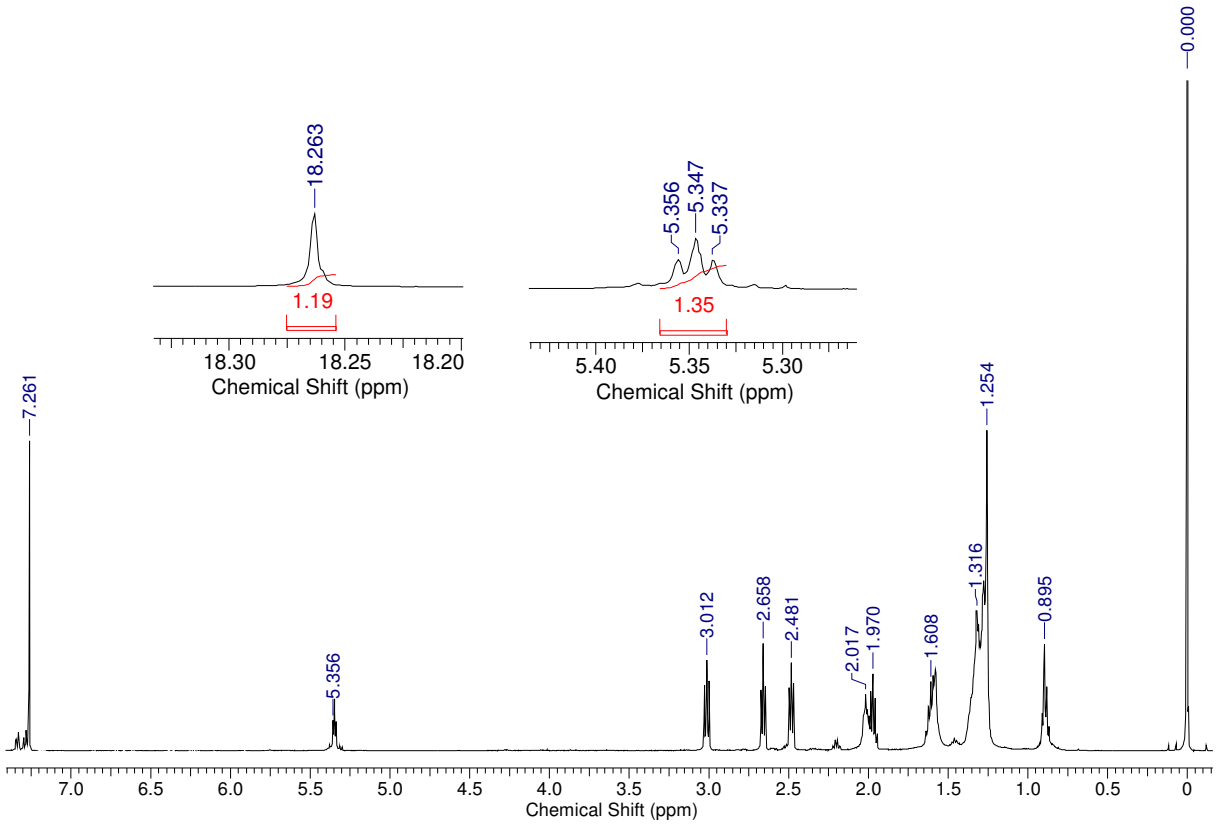


Figura 66: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

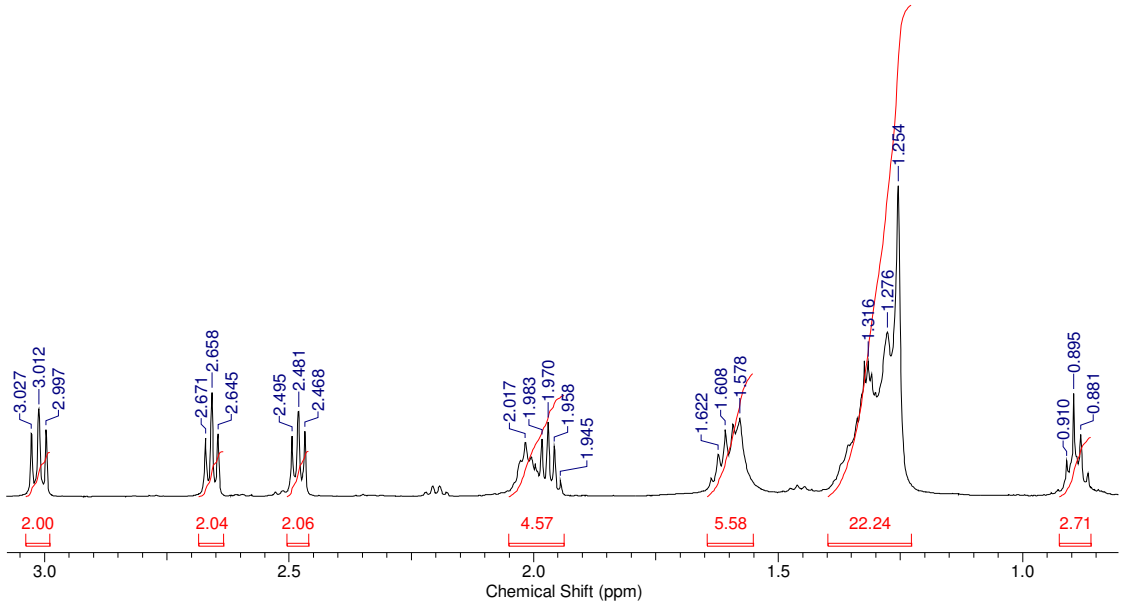


Figura 67: Ampliação da região de δ 0,60 a 3,60 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

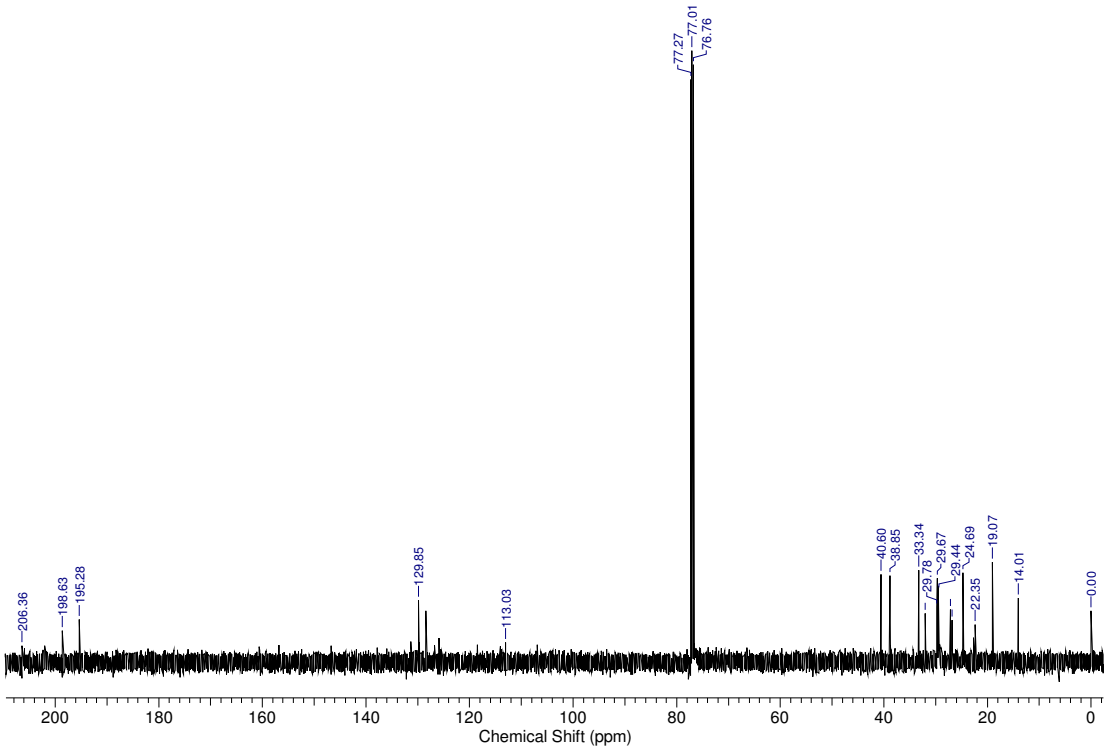


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

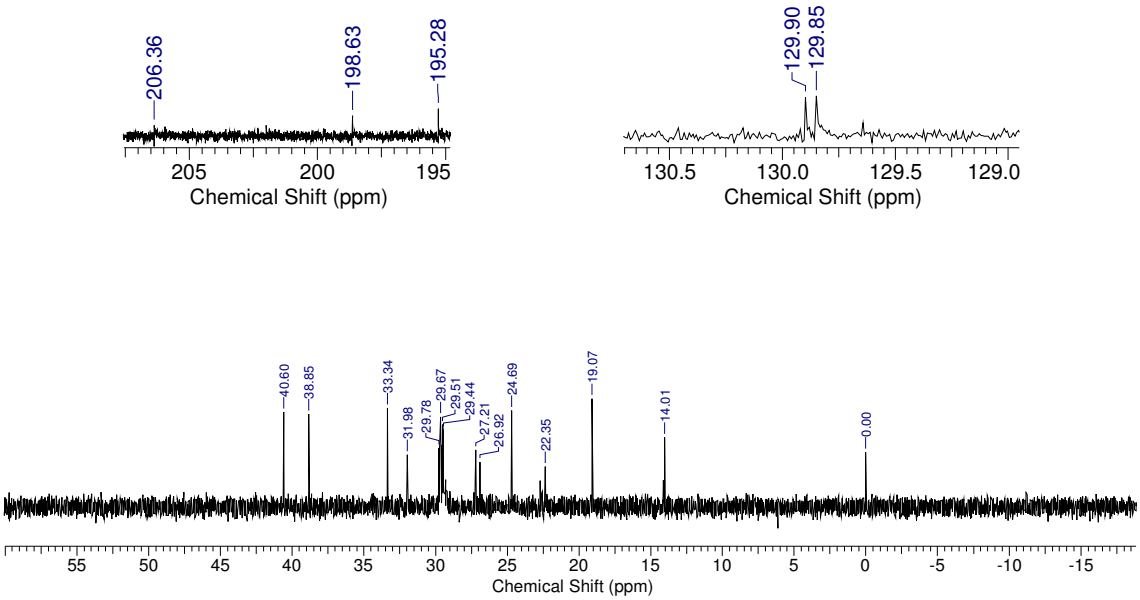


Figura 69: Ampliação da região de δ 0,0 a 60,0; δ 129,0 a 131,0 e δ 194,0 a 207,0 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

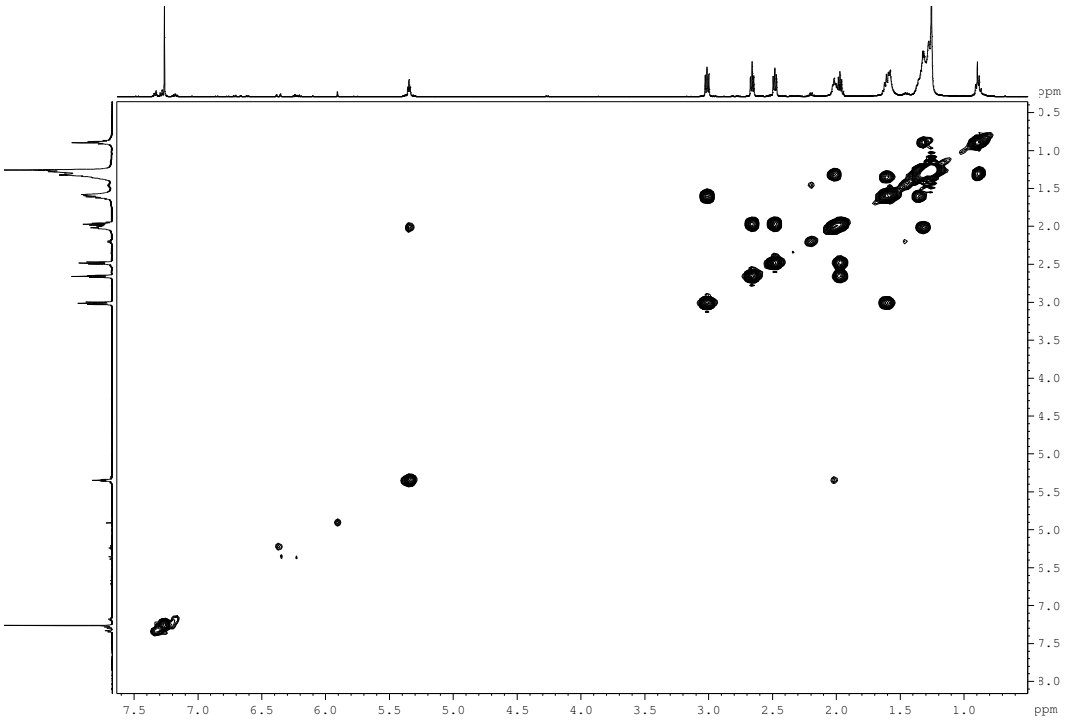


Figura 70: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

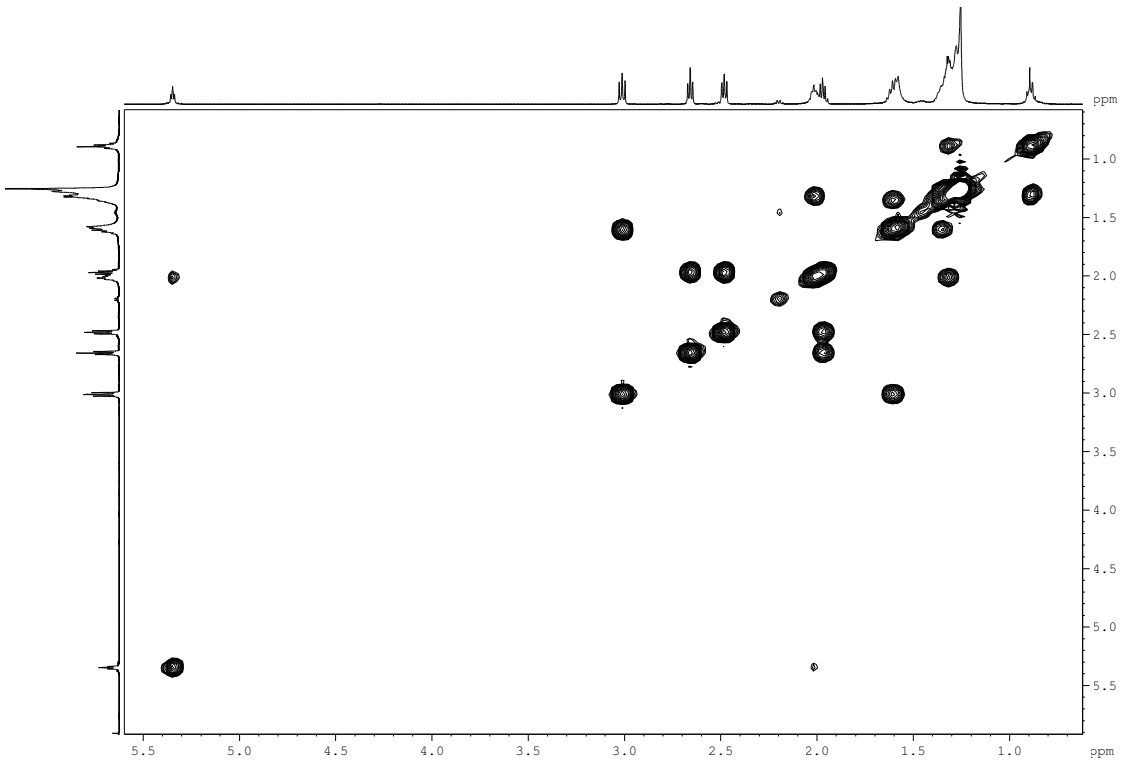


Figura 71: Ampliação da região de δ 0,0 a 5,6 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

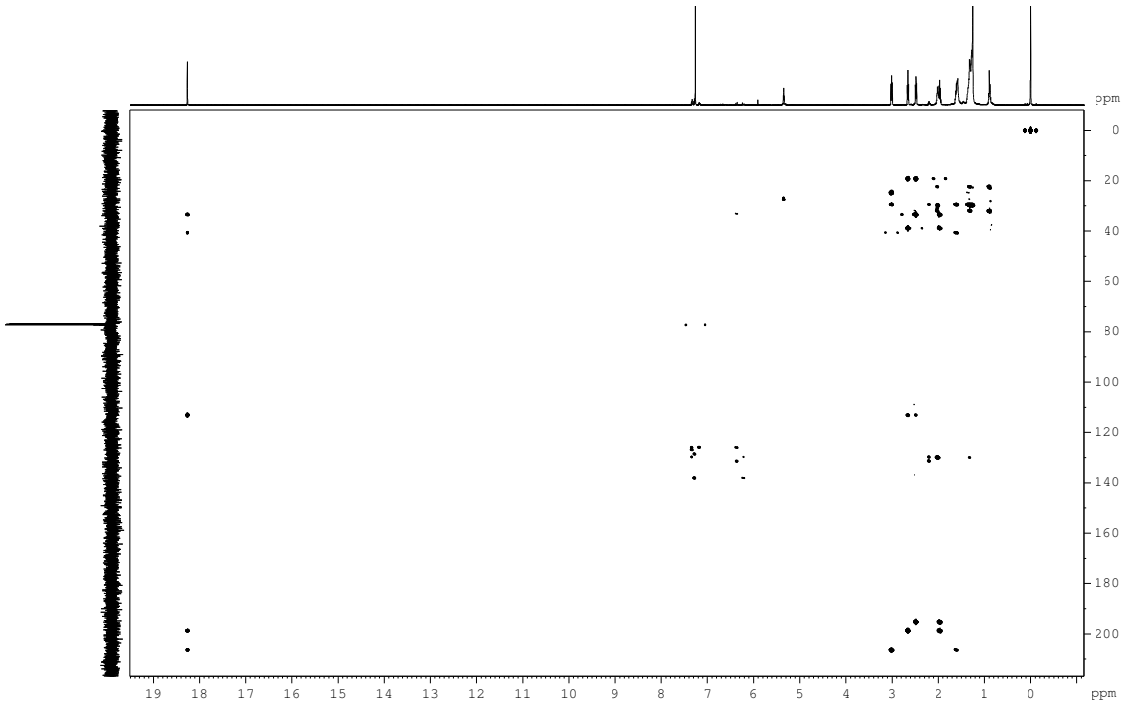


Figura 72: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

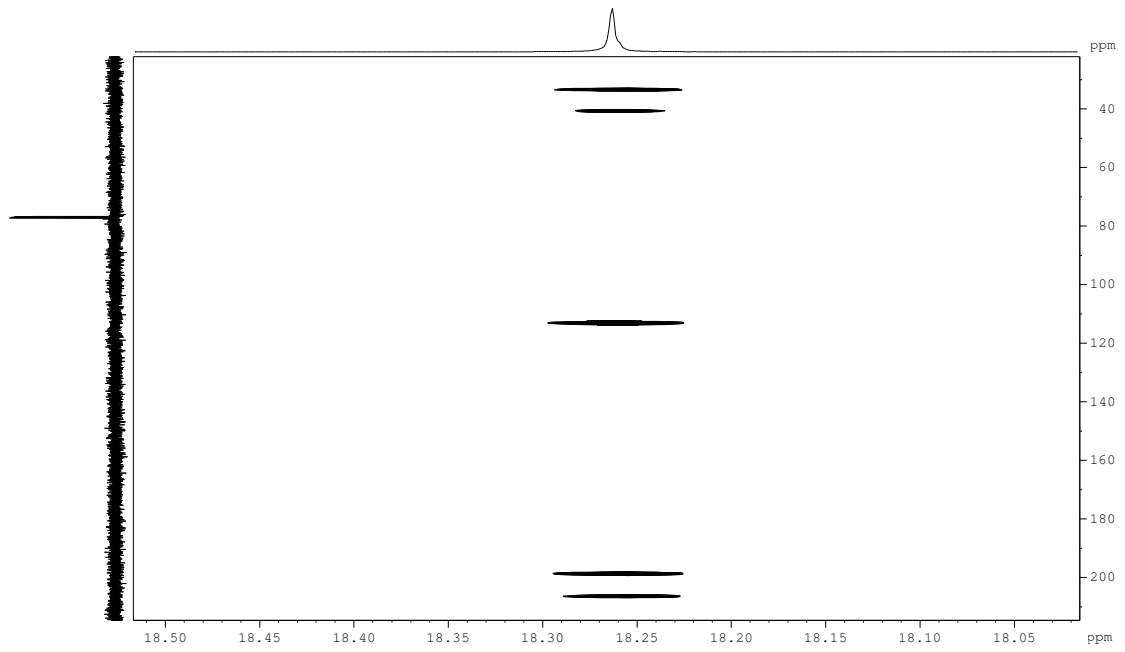


Figura 73: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

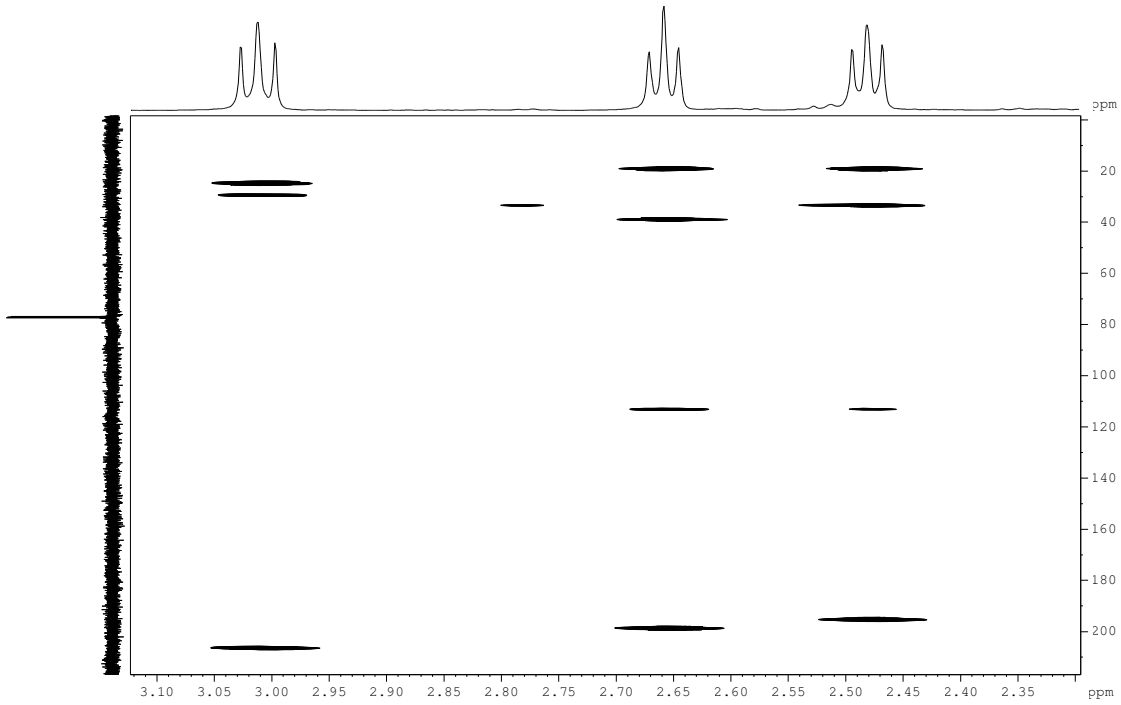


Figura 74: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

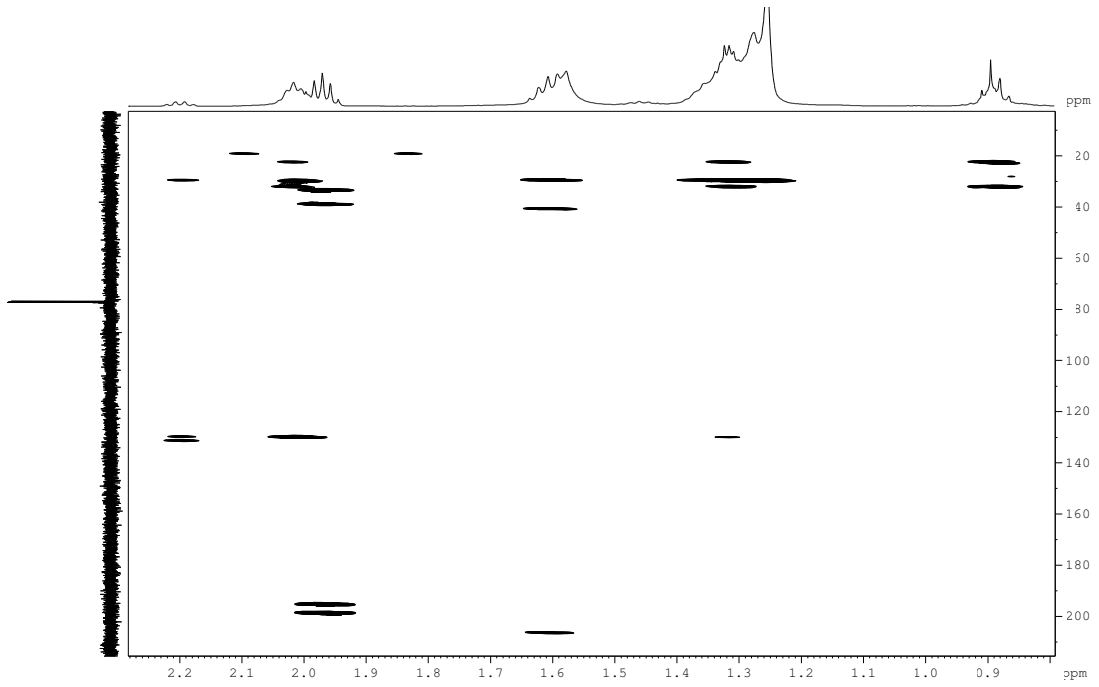


Figura 75: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **4**.

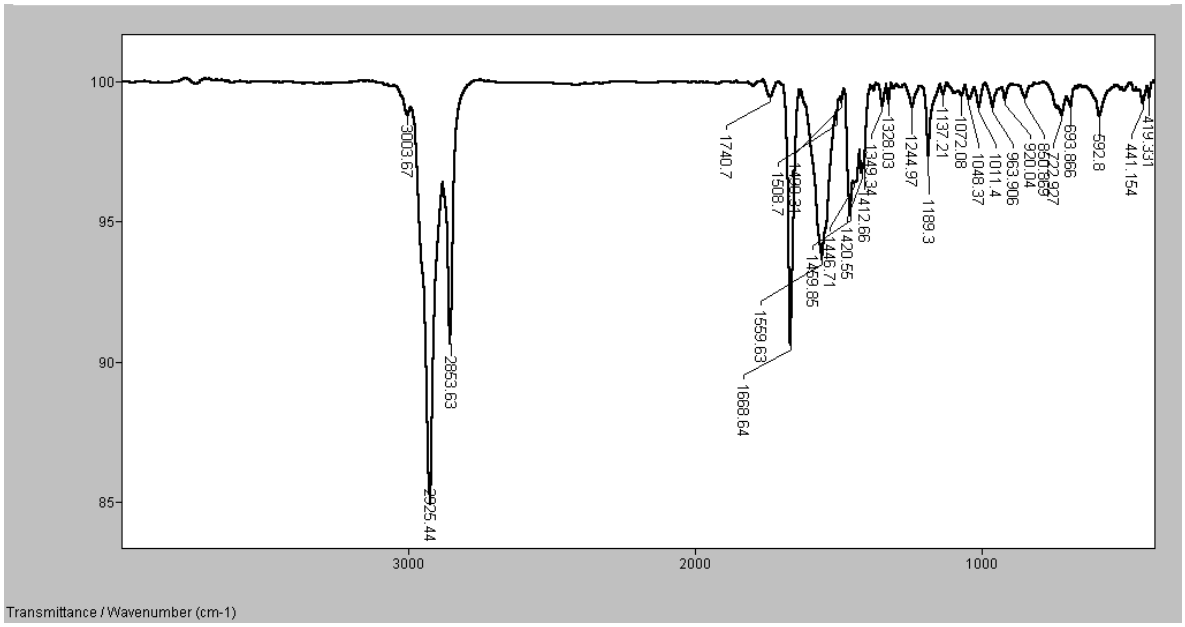


Figura 76: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **4**.

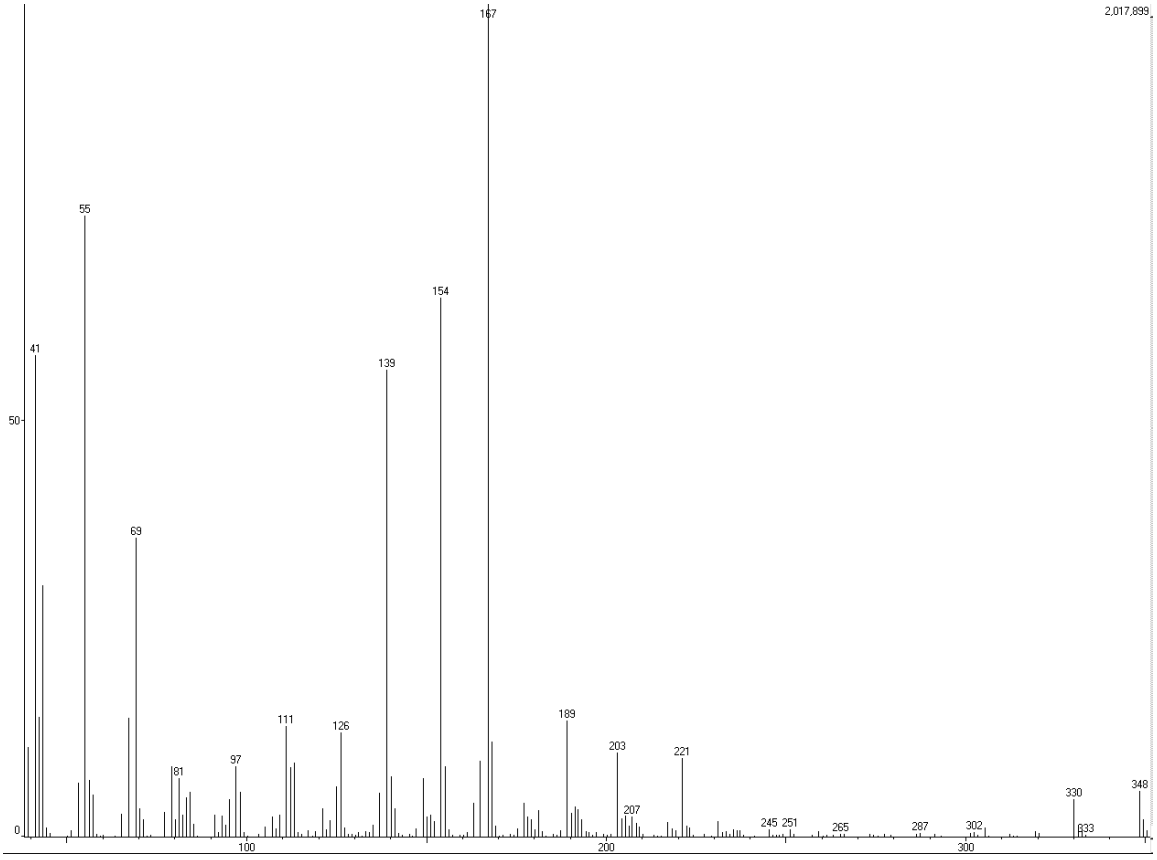


Figura 77: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **4**.

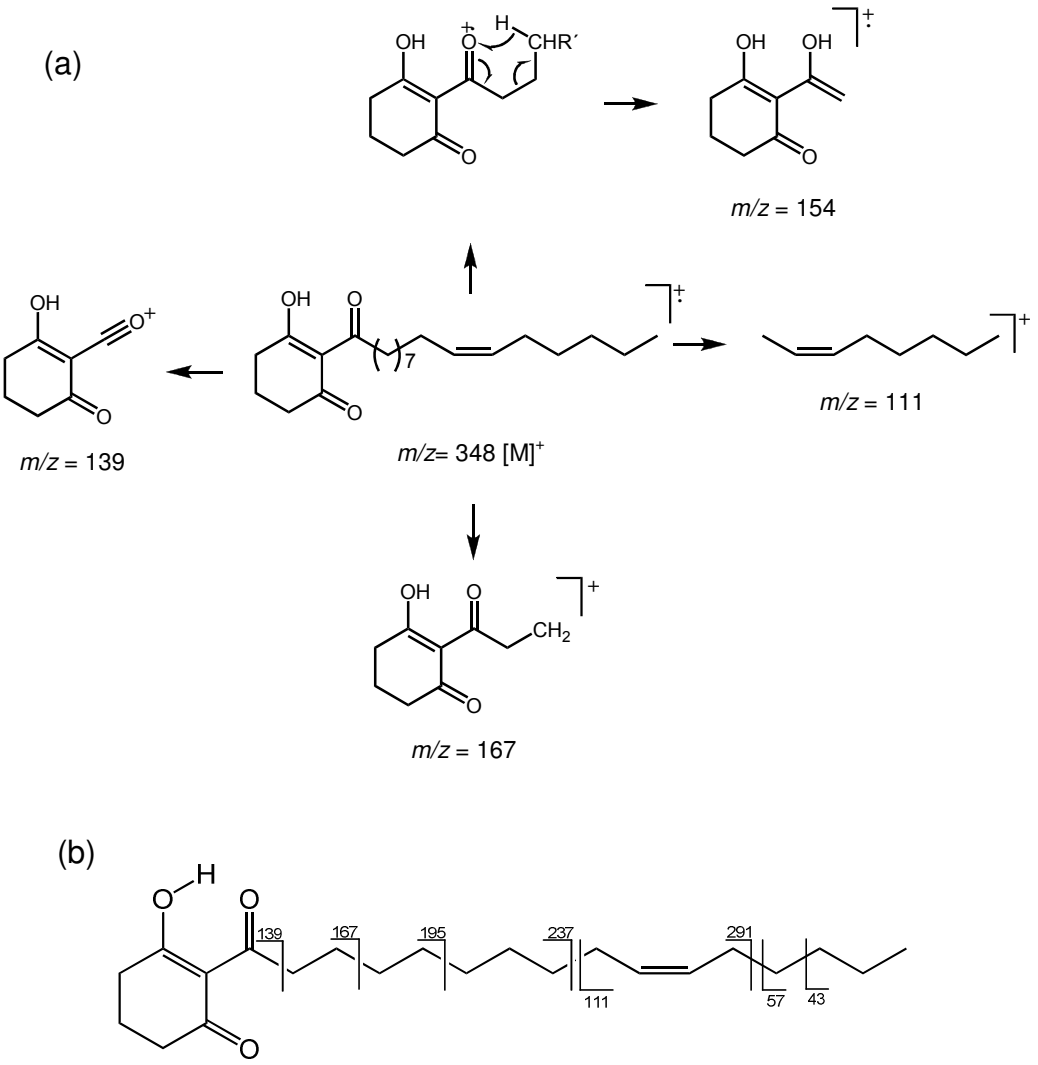


Figura 78: (a) Proposta de fragmentação para o policetídeo **4**. (b) Íons fragmentários que levaram a localização da ligação dupla do policetídeo **4**.

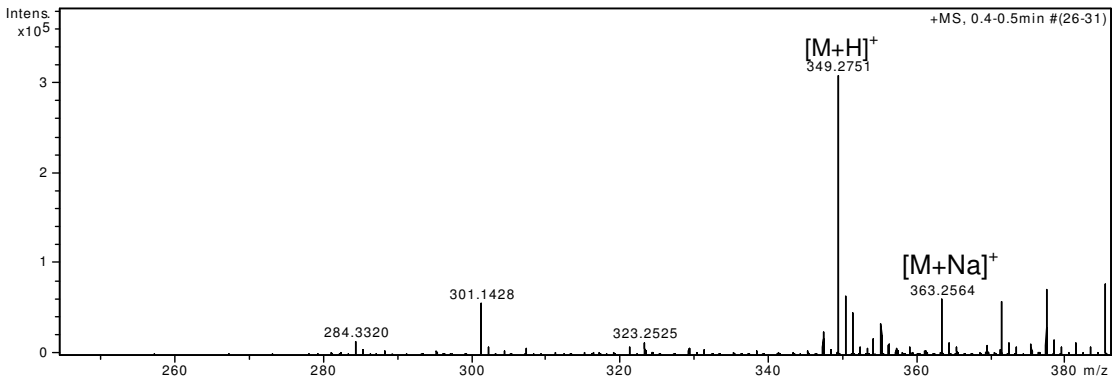
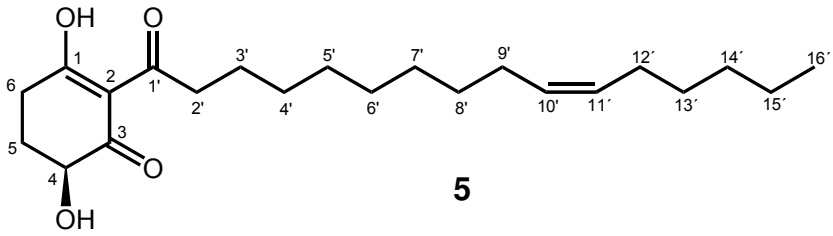


Figura 79: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **4**.

Tabela 12: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **4** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δ_H(multiplicidade, *J*/Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1	-	195,3	-	-
2	-	113,0	-	-
3	-	198,6	-	-
4	2,66 (*t*, 6,5)	38,8	H5	C2, C3, C5, C6
5	1,97 (*m*, 6,5)	19,1	H4, H6	C1, C3, C4, C6
6	2,48 (*t*, 6,5)	33,3	H5	C1, C2, C4, C5
1´	-	206,3	-	-
2´	3,01 (*t*, 7,4)	40,6	H3’	C1’, C3’, C4’
3´	1,61 (*m*, 7,4)	24,7	H2’, H4’	C1’, C2’, C4’
4´	1,36 (*m*)	29,4-29,8	H3’	-
5´	1,25 – 1,33 (*m*)	29,4-29,8	-	-
6´	1,25 – 1,33 (*m*)	29,4-29,8	-	-
7´	1,25 – 1,33 (*m*)	29,4-29,8	-	-
8´	1,32 (*m*)	29,4-29,8	H9’	-
9´	2,02 (*m*)	27,2	H8’, H10’	C10’
10´	5,34 (*t*, 4,6)	129,8	H9’	C9’
11´	5,34(*t*, 4,6)	129,9	H12’	C12’
12´	2,02 (*m*)	26,9	H11’,H13’	C11’
13´	1,32 (*m*)	29,4-29,8	H12’	-
14´	1,25 – 1,33 (*m*)	32,0	-	-
15´	1,30 (*m*)	22,3	H16’	-
16´	0,90 *(t*, 7,5)	14,0	H15’	C14’, C15’
OH	18,26 (*s*)	-	-	C2, C3, C4, C1’, C2’

1,4-Hidróxi-2-[(10*Z*)-hexadecanoil)-2-cicloexen-1-ona (5)



5

O policetídeo **5** foi isolado como um óleo amarelado, em que sua fórmula molecular, $C_{22}H_{36}O_4$, foi determinada por CG-EM ($[M]^+$, *m/z* 364) (**Figura 93**) e HRESI ($[M+H]^+$, *m/z* 365,2687) (**Figura 95**).

O espectro no infravermelho (**Figura 92**) apresentou bandas em 3466, 3004, 1669 e 1560 cm^{-1}, referentes a um grupo hidroxila, grupo hidroxila quelado, grupo carbonila conjugado e grupo carbonila quelado conjugado, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 82-84**) e de RMN de ^{13}C (**Figura 85** e **86**) apresentaram sinais característicos de um sistema 3,6-hidróxi-2-cicloexen-1-ona (Kato *et al.*, 1985), (Li *et al.*, 2007b), com sinais em 197,9 (C1), 110,3 (C2), 195,6 (C3), 71,6 (C4) e 26,9 (C5) e em 32,0 (C6), encontrados no espectro de RMN de ^{13}C. A proposta é sustentada pelos espectros HMBC (**Figura 89-91**) e COSY (**Figura 87** e **88**), onde neste último é possível observar as correlações entre H4 e H5; H5 e H4, H6; H6 e H5. As principais correlações no espectro HMBC estão apresentadas na **Figura 80**.

O espectro de RMN de ^{13}C indica a presença de uma longa cadeia alquílica com uma sobreposição de sinais na região de δ 29,4-29,8 e no espectro de RMN de ^1H, uma sobreposição de sinais na região de δ 1,25-1,38.

Um tripleto localizado em δ 5,34 no espectro de RMN de ^1H é referente a uma insaturação, e a geometria *cis* da ligação dupla foi atribuída com base nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono 9' e 12' (δ 27,2 e 26,9) (Haan e Ven, 1973). A localização desta ligação dupla foi atribuída com base na presença de

íons fragmentários observados no espectro de massas de baixa resolução (**Figura 94 b**).

No espectro de RMN de ^{1}H em δ 0,90 é possível observar um tripleto atribuído a uma metila terminal.

A proposta de estrutura de um policetídeo alquenílico com uma ligação dupla em C10' e metila terminal foi confirmada por espectrometria de massas de baixa resolução, onde foi possível identificar a massa dos íons fragmentários propostos na elucidação estrutural (**Figura 94 a**).

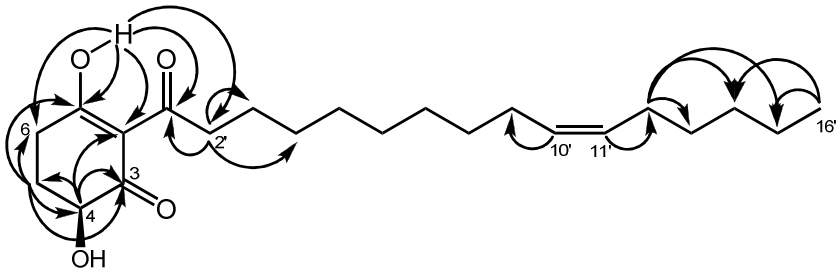


Figura 80: Algumas correlações HMBC do policetídeo **5**.

A conformação do policetídeo com H4 em equatorial foi estabelecida com base na constante de acoplamento (*J* = 13,0 Hz) com H5 axial, indicando que a hidroxila ligada a C4 está na posição axial (**Figura 81**) (Azevedo *et al.*, 1997), (Cheng *et al.*, 2003).

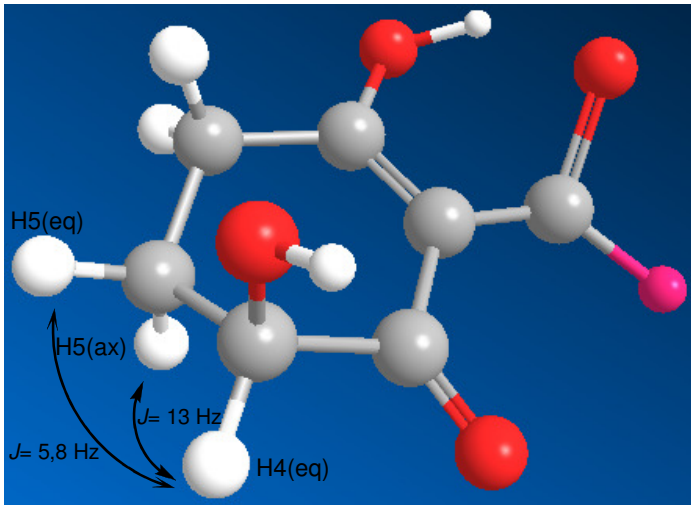


Figura 81: Visão 3D do sistema 3,6-hidróxi-2-cicloexen-1-ona.

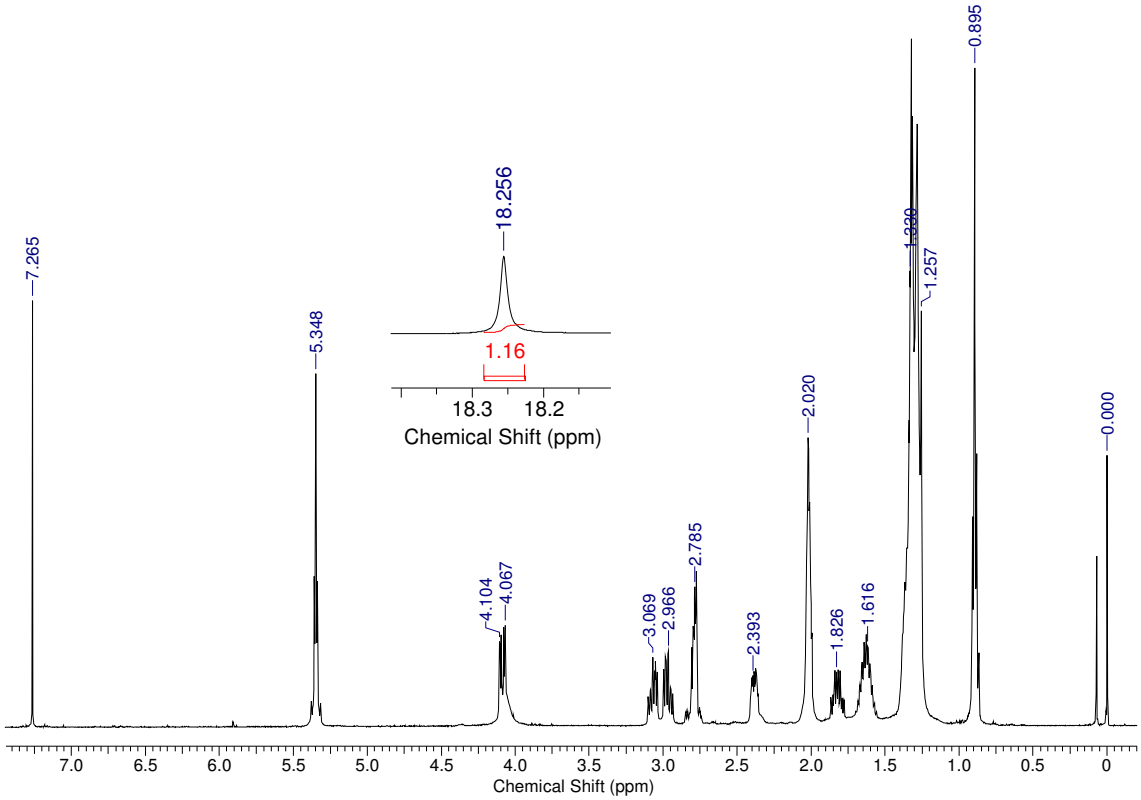


Figura 82: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

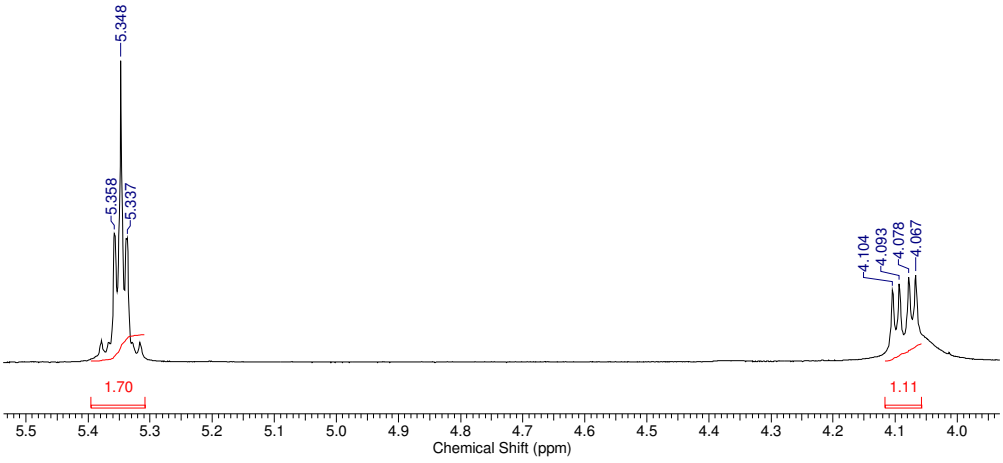


Figura 83: Ampliação da região de δ 3,95 a 5,55 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

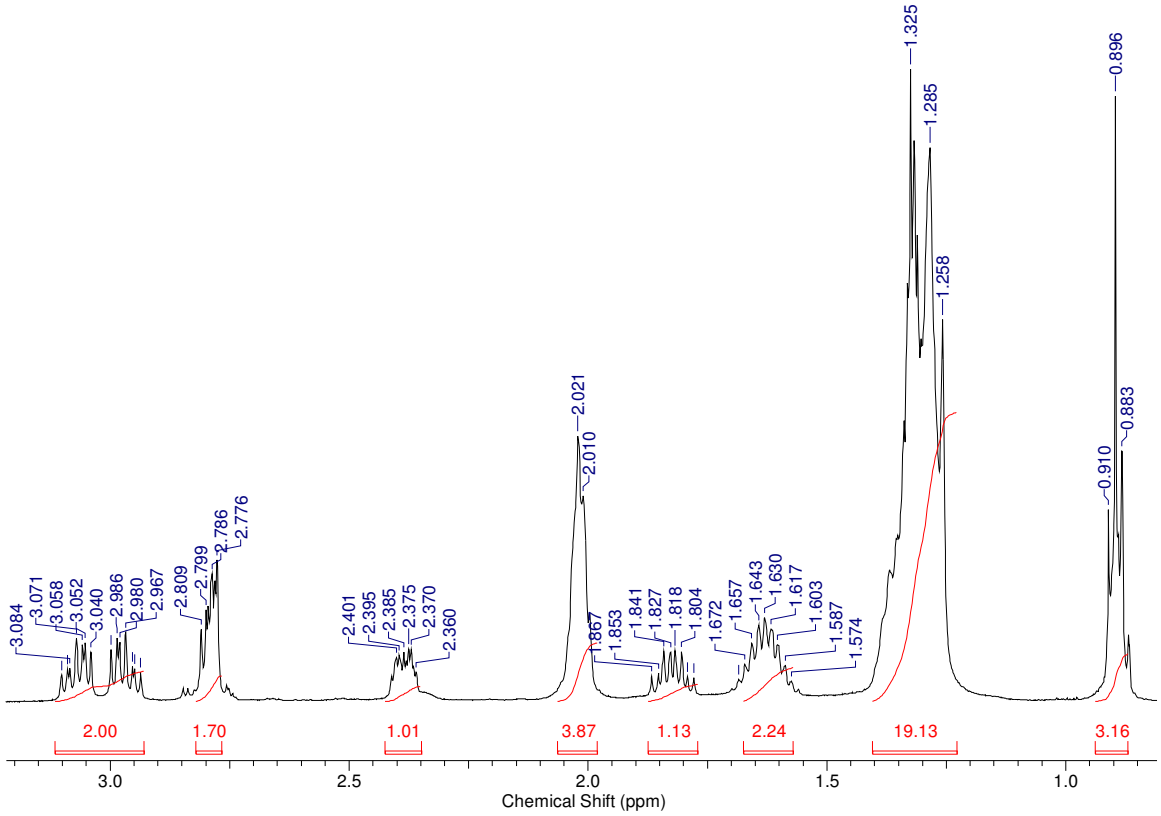


Figura 84: Ampliação da região de δ 0,80 a 3,50 do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

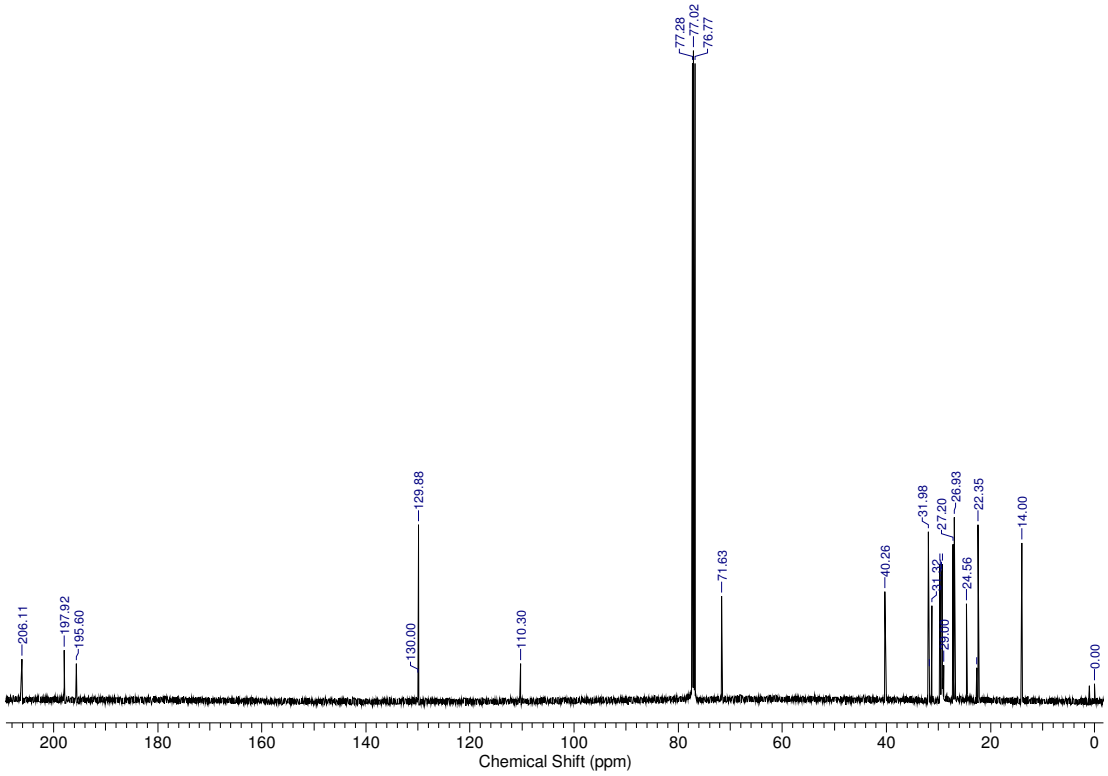


Figura 85: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

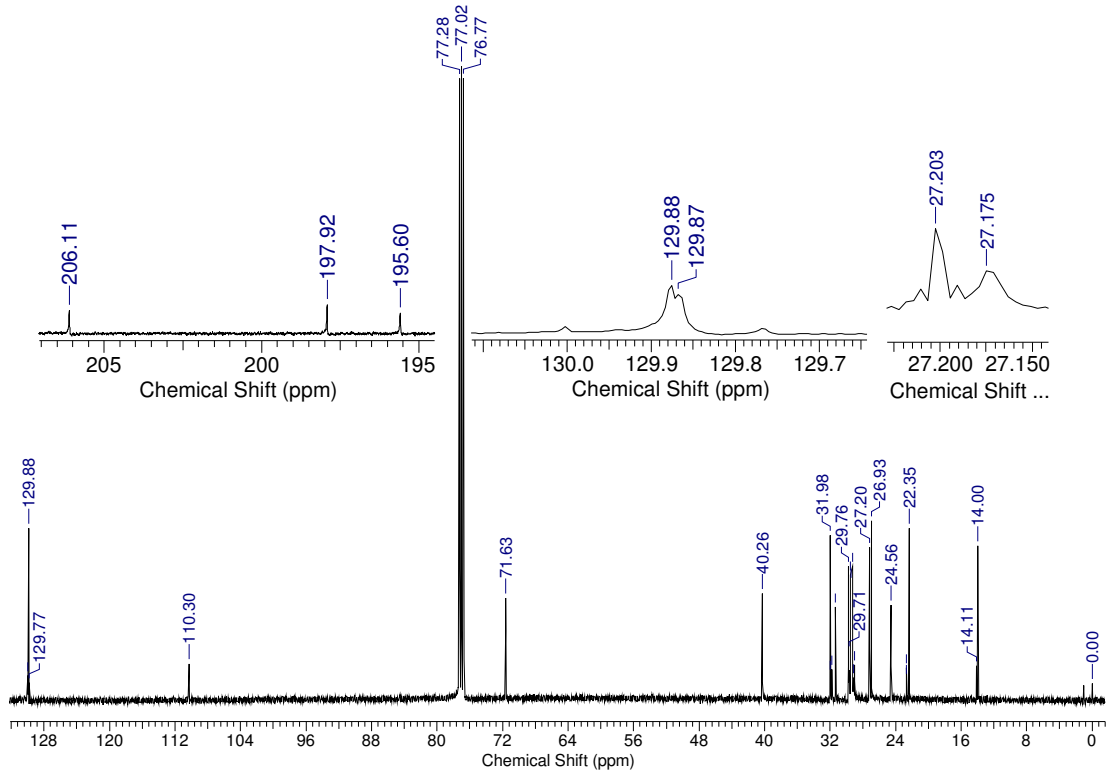


Figura 86: Ampliação da região de δ 0,0 a 130,0; δ 129,6 a 130,2 e δ 195,0 a 206,3 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

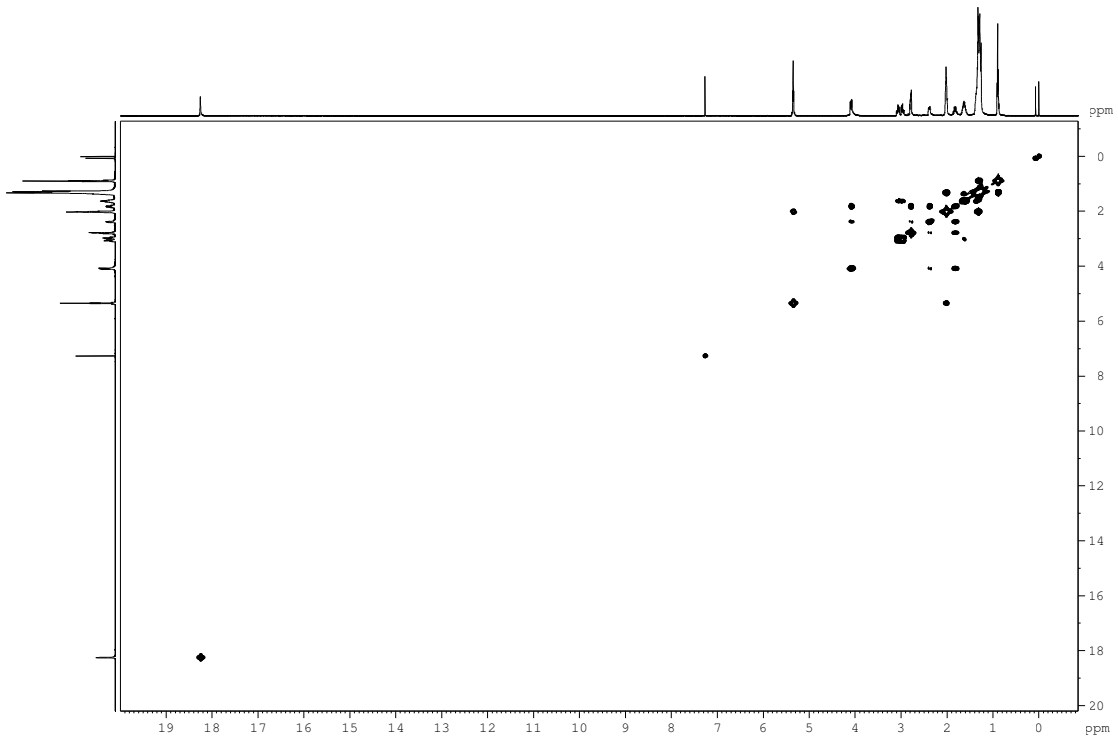


Figura 87: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

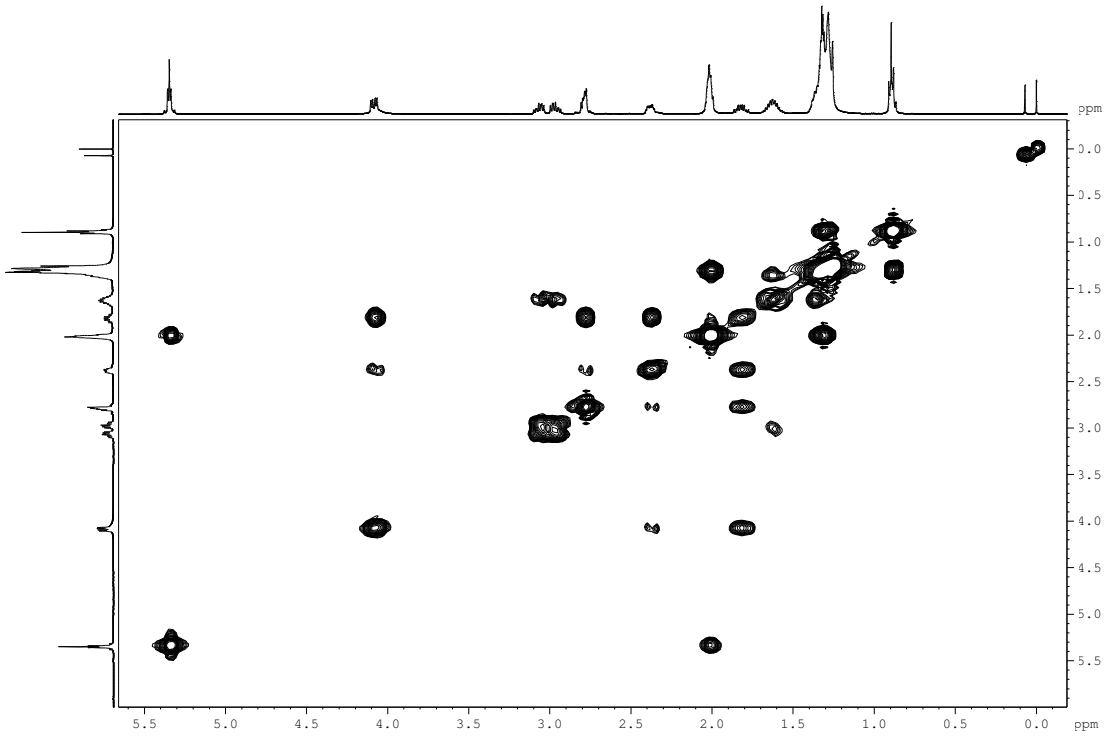


Figura 88: Ampliação da região de δ 0,0 a 5,7 do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H - COSY (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

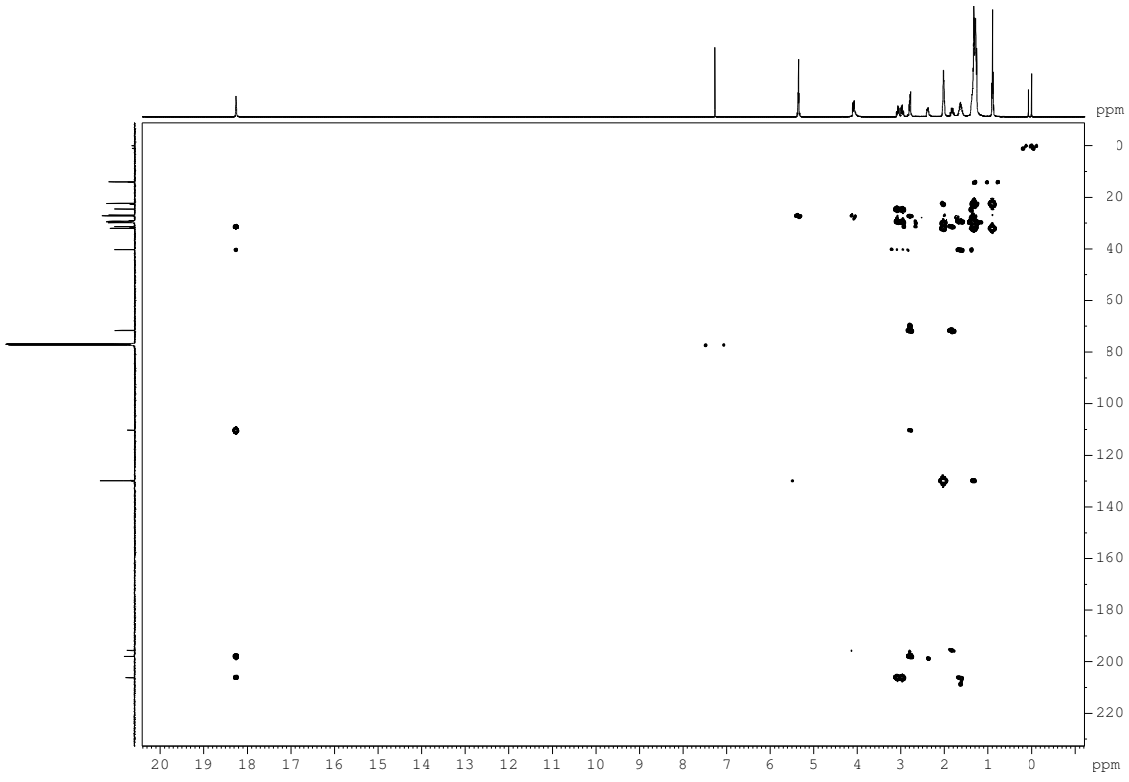


Figura 89: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

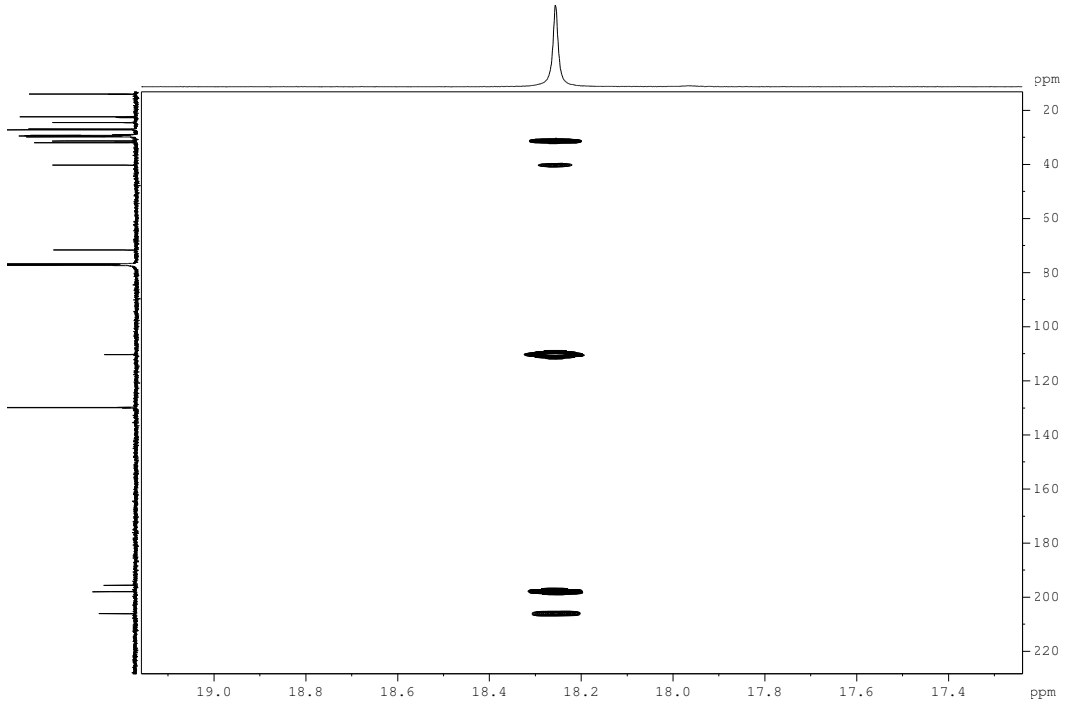


Figura 90: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

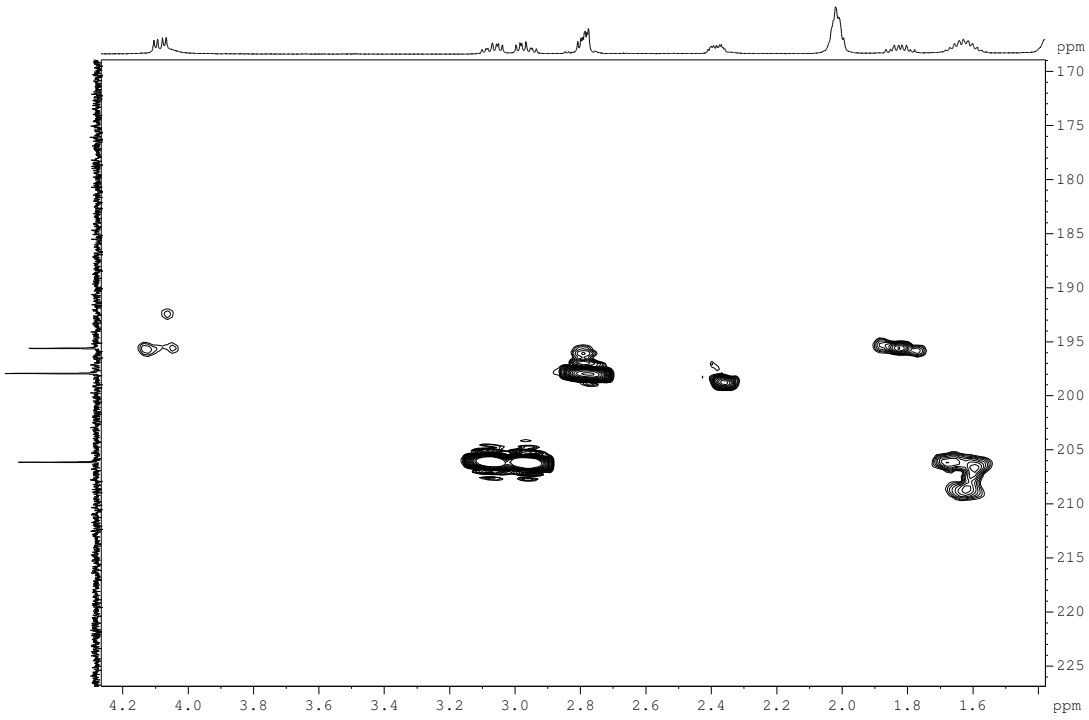


Figura 91: Ampliação de região do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C - HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) do policetídeo **5**.

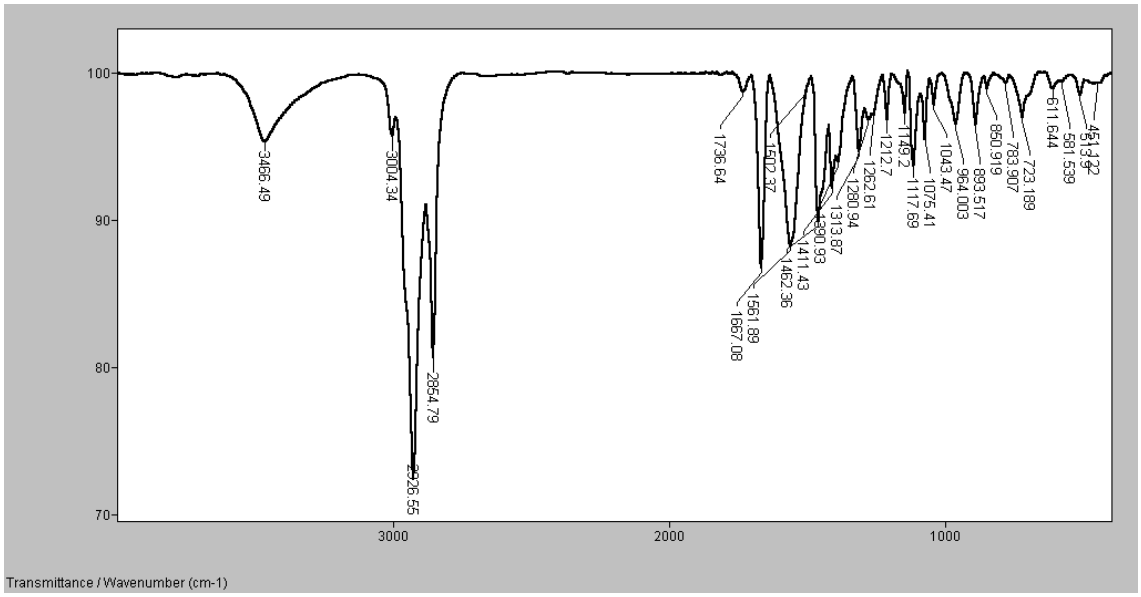


Figura 92: Espectro no infravermelho (KBr) do policetídeo **5**.

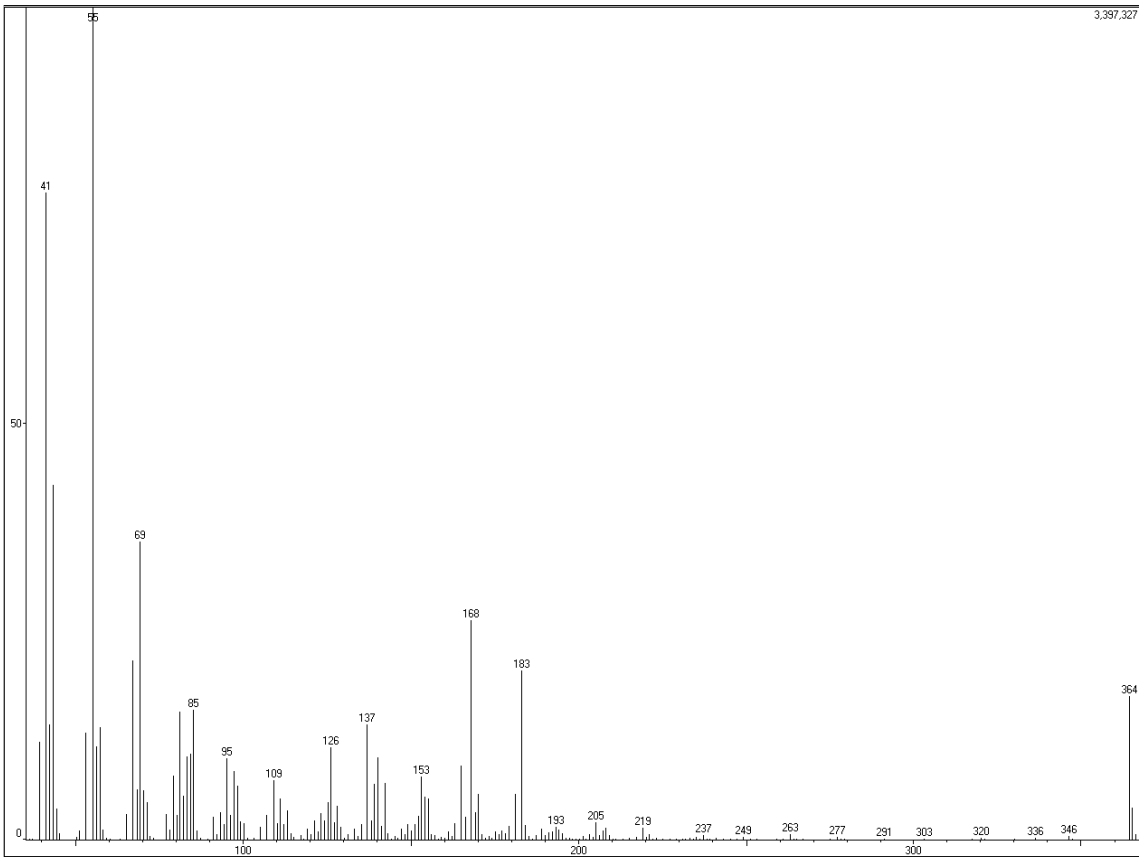


Figura 93: Espectro de massas de baixa resolução (IE) do policetídeo **5**.

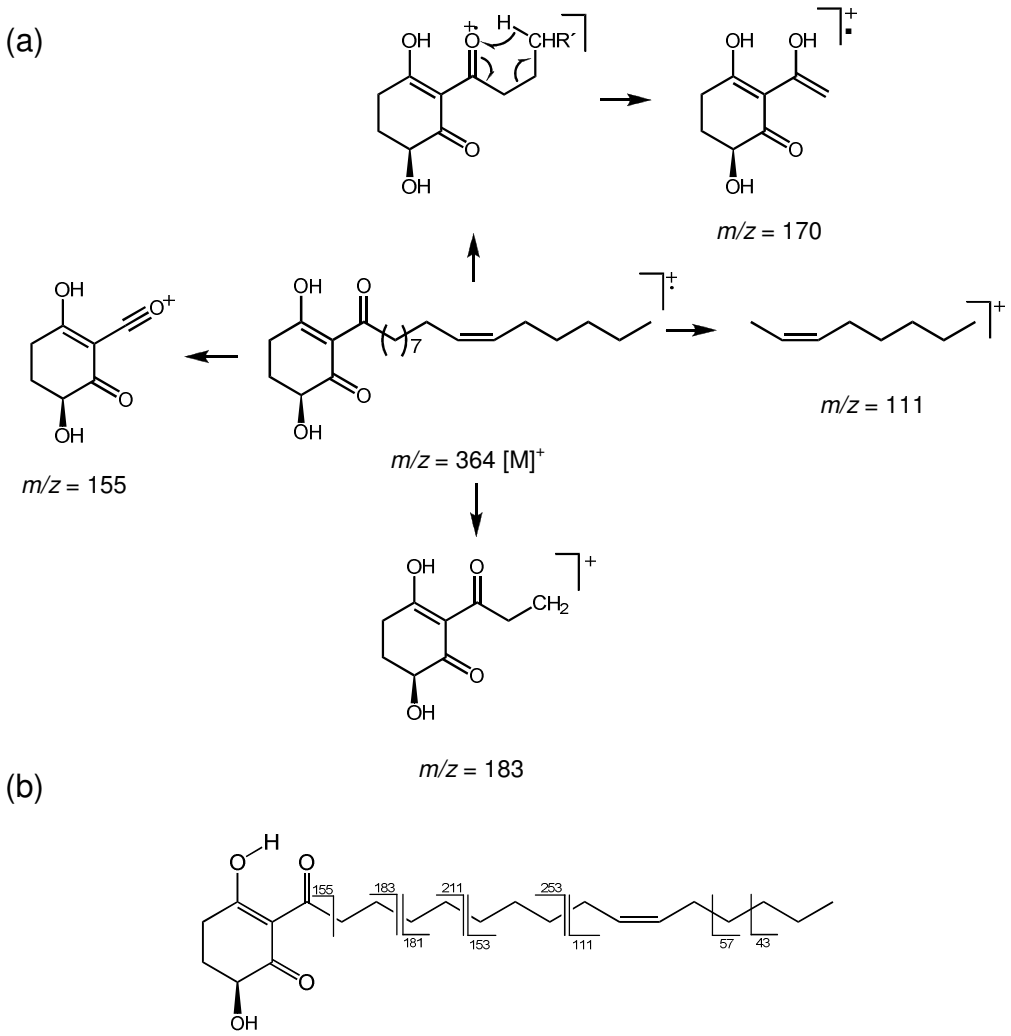


Figura 94: (a) Proposta de fragmentação para o policetídeo **5**. (b) Íons fragmentários que levaram a localização da ligação dupla do policetídeo **5**.

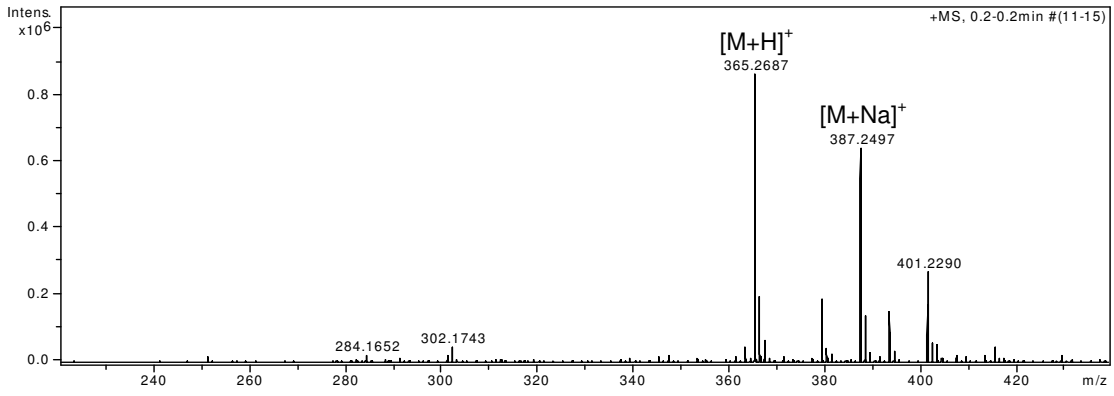


Figura 95: Espectro de massas de alta resolução (HRESI) do policetídeo **5**.

Tabela 13: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do policetídeo **5** (500 e 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δ_H(multiplicidade, *J*/Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1	-	197,9	-	-
2	-	110,3	-	-
3	-	195,6	-	-
4	4,08 (*dd*, 5,5; 13,0)	71,6	H5(ax, eq)	C3, C5
5	1,82 (1 Hax, ddt, 11,0; 13,0; 15,6) 2,38 (1H eq. *m*)	26,9	H4 H4	C1, C3, C4, C6
6	2,76 (*m*)	32,0	H5(ax, eq)	C1, C2, C3,C4, C6
1´	-	206,1	-	-
2´	3,07 (*ddd*, 6,5; 8,5; 15,5) 2,97 (*ddd*, 6,5; 8,5; 15,5)	40,3	H3' H3'	C1', C2', C4'
3´	1,63(*m*)	24,6	H4'	C1', C2', C4'
4´	1,32 (*m*)	29,3-29,7	H3'	-
5´	1,25 – 1,40 (*m*)	29,3-29,7	-	-
6´	1,25 – 1,40 (*m*)	29,3-29,7	-	-
7´	1,25 – 1,40 (*m*)	29,3-29,7	-	-
8´	1,30 (*m*)	29,3-29,7	H9'	-
9´	2,02 (*m*)	27,2	H8'	-
10´	5,35 (*t*, 5,0)	129,8	H9', H11'	C9', C11'
11´	5,35 (*t*, 5,0)	129,9	H10', H12'	C10', C12'
12´	2,02 (*m*)	27,2	H13'	C13', C14', C15'
13´	1,30 (*m*)	29,8	H12'	-
14´	1,25 – 1,40 (*m*)	31,3	-	-
15´	1,36 (*m*)	22,3	H16'	-
16´	0,90 (*t*, 7,5)	14,0	H15'	C14', C15'
OH	18,26	-	-	C1, C2, C6, C1', C2'

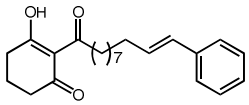
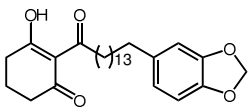
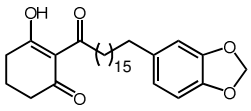
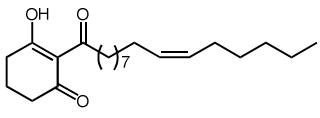
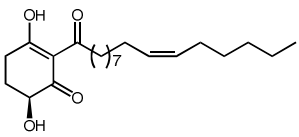
4.1. Avaliação da atividade biológica

4.1.1. Avaliação da atividade antifúngica

O método utilizado para a realização do ensaio para testar a atividade antifúngica das substâncias isoladas frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foi a autobiografia. O método é simples, rápido e consiste na ação inibitória das substâncias antifúngicas frente aos esporos dos fungos que atuam como reveladores das cromatoplacas.

A **Tabela 14** apresenta as atividades para os policetídeos isolados.

Tabela 14: Atividade antifúngica dos policetídeos isolados de *Peperomia trineura* frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Policetídeo	Estrutura	*C. cladosporioides*						*C. phaerospermum*					
		100 ug	50 ug	25 ug	10 ug	5ug	1ug	100 ug	50 ug	25 ug	10 ug	5ug	1ug
1		**	**	**	**	**	*	**	**	**	*	*	*
2		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4		**	**	**	**	*	*	**	**	**	*	*	*
5		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	*

inativo(i), fraco (*), médio (**), forte (***)

4.1.2. Avaliação da viabilidade celular de células K562 e Nalm 6

As frações coletadas da coluna cromatográfica do extrato bruto foram enviadas para a realização do ensaio antitumoral em células leucêmicas K562 e Nalm 6, utilizando o método MTT. Este é um método colorimétrico em que o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) apresenta cor amarela e é reduzido por desidrogenases de células vivas gerando um produto de coloração violácea apenas nas células vivas. A atividade das frações estão apresentadas na **Figura 96**.

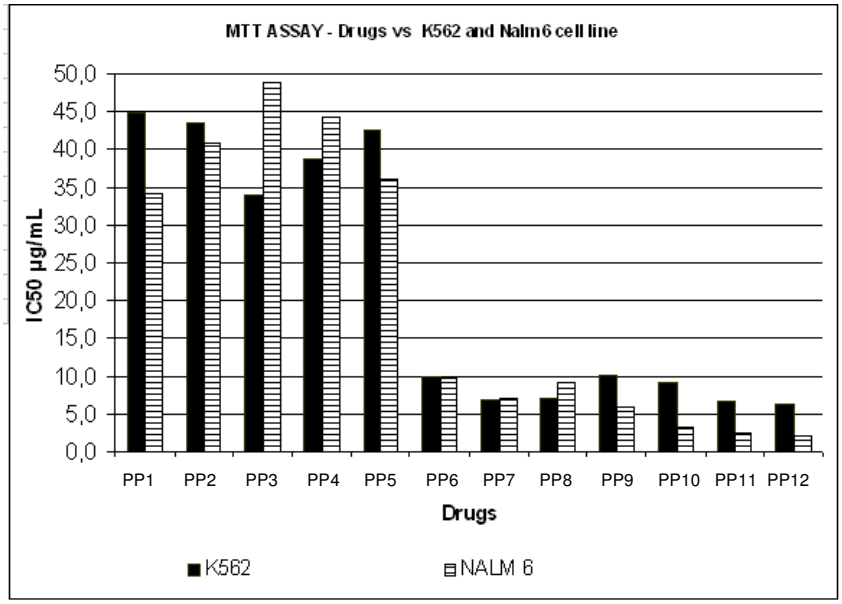


Figura 96: Atividade das frações do extrato bruto contra células K562 e Nalm 6.

Os policetídeos **1**, **2**, **3** e **4** encontram-se na fração PP5, enquanto que o policetídeo **5** encontra-se na fração PP10.

4.2. Proposta biossintética para policetídeos isolados

Os policetídeos isolados **1**, **2** e **3** de *Peperomia trineura* que possuem em suas estruturas um anel aromático devem ser formados a partir de uma rota biossintética mista envolvendo o aminoácido *L*-fenilalanina ou *L*-tirosina, que conferiria a porção fenilpropanoídica, enquanto que os demais carbonos seriam oriundos da via do acetato. Nesse processo, o cinamoil-SCoA sofreria uma série de reações de condensação de Claisen (Dewick, 2002) por unidades de malonil-SCoA e somente os grupos carbonílicos terminais não seriam reduzidos (**Figura 97**).

Já os outros dois policetídeos 4 e 5 sem o anel aromático devem ser formados somente pela via do acetato, em que unidades de malonil-SCoA contribuiriam para o alongamento da cadeia alquílica, através de reações de condensação de Claisen (**Figura 98**).

4.2.1. Proposta biossintética para policetídeo **1**

O policetídeo **1**, como descrito no item anterior, provém de uma via mista (chiquimato e acetato). Devido a ausência da hidroxila na posição 4 do anel aromático, pode-se supor que o aminoácido envolvido na biossíntese do policetídeo **1** seja a *L*-fenilalanina. Esse aminoácido sofre desaminação pela enzima PAL e, posteriormente sete unidades de malonil-CoA seriam adicionados à estrutura através de um ciclo de reações para o alongamento da cadeia, seguidas de etapas de condensação, redução, desidratação e hidrogenação.

Para a ciclização do anel referente ao sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona ocorreriam reações de condensação de Claisen intramolecular, seguido de enolização.

4.2.2. Proposta biossintética para policetídeos **2** e **3**

As diferenças entre a biossíntese do policetídeo **1** e dos policetídeos **2** e **3** referem-se ao comprimento menor da cadeia alquílica. Além disso, o primeiro apresenta dupla ligação conjugada com o anel aromático, enquanto que os dois últimos possuem o grupo metilenodioxila (-OCH_2O-).

Para que ocorra a existência do grupo metilenodioxila seria necessária a presença da hidroxila nas posições 3 e 4 do anel aromático, seguido da metilação de um desses dois grupos por uma metiltransferase/SAM (S-adenosilmetionina). Nessa proposta, tem-se como intermediário o ácido-4-cumárico, que pode ser formado a partir da *L*-fenilalanina, com sua desaminação e hidroxilação na posição 4 do anel aromático; ou pela *L*-tirosina somente com sua desaminação. A partir deste intermediário, ocorre a uma hidroxilação na posição 3 do anel aromático, formando o ácido cafeíco e, por metilação, o ácido ferúlico. O sistema guaiacilico deve ser o precursor do grupo metilenodioxila.

Para o alongamento da cadeia do policetídeo **2** são necessárias nove unidades de malonil-CoA e para o policetídeo **3** são necessárias dez unidades. E, como no policetídeo **1**, ocorrem etapas de condensação para o alongamento da cadeia, seguidos de redução, desidratação e hidrogenação.

A etapa de ciclização do sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona ocorre como descrito para o policetídeo **1**.

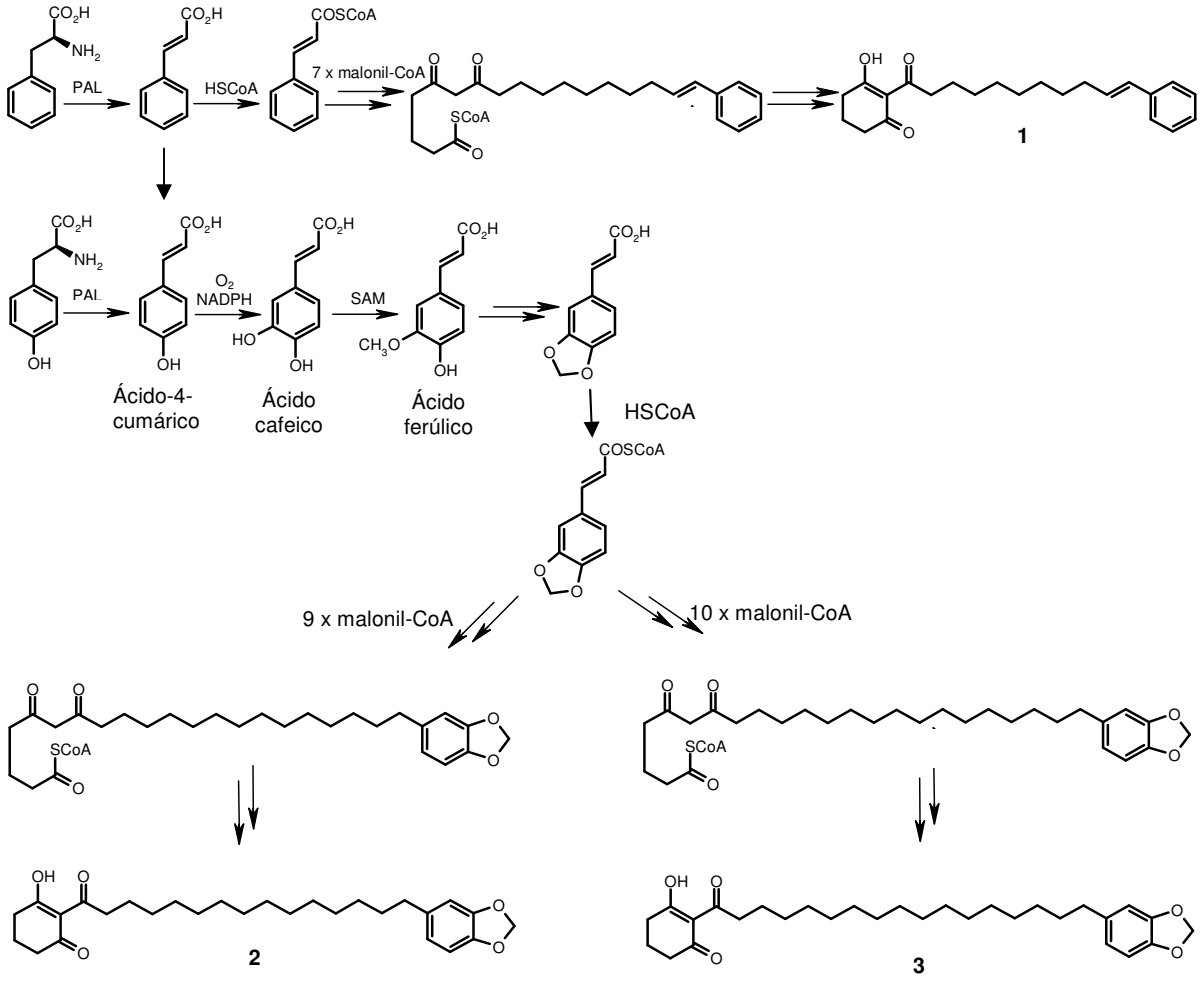


Figura 97: Proposta biossintética para policetídeos **1**, **2** e **3**.

4.2.3. Proposta biossintética para policetídeos **4** e **5**.

Diferentemente dos policetídeos **1**, **2** e **3**, que são originados a partir de uma rota mista, que se iniciaria a partir de um aminoácido e seguiria pela via do acetato para o alongamento da cadeia, a rota biossintética para a formação dos policetídeos **4** e **5** envolveria somente a via do acetato, considerando a ausência do anel aromático em uma das extremidades da molécula.

Assim como ocorreu para o alongamento da cadeia alquílica dos policetídeos descritos anteriormente, as etapas de alongamento devem envolver etapas de redução, desidratação e hidrogenação.

Para a formação, tanto do policetídeo **4** como para a formação do policetídeo **5**, são necessárias dez unidades de malonil-SCoA.

No policetídeo **5**, ocorre a presença de uma hidroxila na posição 4 que, biossinteticamente, não seria compatível com a via do acetato, na qual as posições oxigenadas encontrariam-se em carbonos alternados. Este fato já foi também observado em outros policetídeos mas, até o momento, nenhuma hipótese acerca deste fato foi proposta.

A etapa de ciclização do sistema 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona deve ocorrer como descrita para o policetídeo **1**.

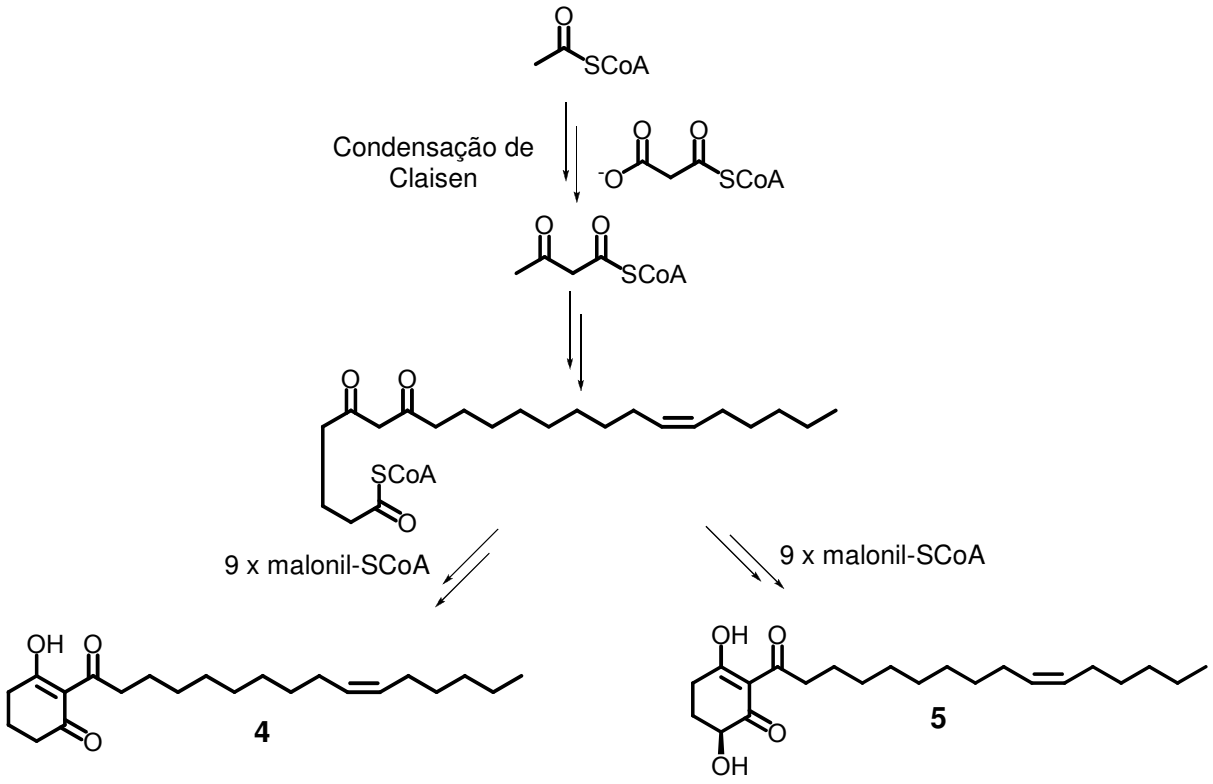


Figura 98: Proposta biossintética dos policetídeos **4** e **5**.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico da espécie *Peperomia trineura* resultou na caracterização de cinco policetídeos, denominados de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas, todos inéditos na literatura, em função do comprimento ou insaturação presente na cadeia alquílica. Tais produtos naturais são de ocorrência restrita, tendo sido isolados somente de espécies de *Peperomia*, *Virola* e algumas espécies de larvas de insetos. A principal diferença entre as 2-acil-cicloexano-1,3-dionas isoladas, é a ocorrência de anel aromático terminal nas plantas, enquanto que, em insetos, foram constatadas metilas terminais.

O potencial antifúngico dos policetídeos de *Peperomia trineura* foi avaliado frente à duas espécies de fungos fitopatogênicos, *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Este ensaio mostrou que os policetídeos que contêm o anel aromático livre de substituintes (**1**) ou sem o anel aromático em sua estrutura (**4** e **5**) foram os mais ativos. Até o momento, nenhuma descrição da atividade antifúngica de 2-acil-cicloexano-1,3-dionas foi relatada na literatura.

O potencial biológico das frações da coluna cromatográfica do extrato bruto frente a duas linhagens de células antitumorais (K562 e Nalm 6) foram consideráveis. Além disso, outros estudos de atividade biológica indicam que as 2-acil-cicloexano-1,3-dionas de espécies de *Peperomia* e *Virola* mostraram potencial atividade antitumoral à diferentes linhagens de células. Em termos de possíveis funções biológicas, as 2-acil-cicloexano-1,2-dionas descritas de insetos apresentaram atividade cairomonal, porém nada se sabe sobre seus papéis em espécies de *Peperomias*.

Em função da carência de uma investigação sistemática, este tipo de policetídeo necessita de estudos mais aprofundados com relação a sua atividade biológica, já que estes se demonstram como promissores agentes tumorais.

O estudo envolvendo mais espécies do gênero *Peperomia* também se faz necessário, pois apesar de sua grande diversidade, poucos foram os trabalhos fitoquímicos realizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B., KUNNUMAKKARA, A. B., HARIKUMAR, K. B., THARAKAN, S. T., SUNG, B., ANAND, P. (2008). Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica* **74**, 1560-1569.

AUSTIN, M. B., NOEL, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural product Reports* **20**, 79-110.

AZEVEDO, N. R., SANTOS, S. C., DE MIRANDA, E. G., FERRI, P. H. (1997). A 2-Acylcyclohexane-1,3-dione from *virola oleifera*. *Phytochemistry* **46**, 1375-1377.

AZIBA, P. I., ADEDEJI, A., EKOR, M., ADEYEMI, O. (2001). Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. *Fitoterapia* **72**, 57-58.

BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **51**, 899-902.

BARRETT, D. (2002). From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1587**, 224-233.

BAYMA, J. D. C., ARRUDA, M. S. P., MÜLLER, A. H., ARRUDA, A. C., CANTO, W. C. (2000). A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. *Phytochemistry* **55**, 779-782.

BLUMENTHAL, E. E. D. A., DA SILVA, M. S., YOSHIDA, M. (1997). Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry* **46**, 745-749.

CHENG, M.-J., LEE, S.-J., CHANG, Y.-Y., WU, S.-H., TSAI, I.-L., JAYAPRAKASAM, B., CHEN, I.-S. (2003). Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. *Phytochemistry* **63**, 603-608.

COSSY, J. (2008). Une source potentielle d'anticancéreux : Les produits naturels et leurs analogues. Extraction, caractérisation, activité biologique et synthèse. *Comptes Rendus Chimie* **11**, 1303-1305.

CROUS, P. W., BRAUN, U., SCHUBERT, K., GROENEWALD, J. Z. (2007). Delimiting Cladosporium from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* **58**, 33-56.

DANELUTTE, A. P., LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **64**, 555-559.

DENNY, C., ZACHARIAS, M. E., RUIZ, A. L. T. G., AMARAL, M. D. C. E. D., BITTRICH, V., KOHN, L. K., SOUSA, I. M. D. O., RODRIGUES, R. A. F., CARVALHO, J. E. D., FOGLIO, M. A. (2008). Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. *Phytotherapy Research* **22**, 127-130.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products. A biosynthetic approch**. 2nd ed. West Sussex: Jonh Wiley & Sons Ltd. 2002. 507 p.

DIXON, R. A. (1999). Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 192-197.

FELIPPE, L. G., BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., GUIMARÃES, E. F., CICARELLI, R. M. B., FURLAN, M. (2008). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* **69**, 445-450.

FENNER, R., BETTI, A. H., MENTZ, L. A., RATES, S. M. K. (2006). Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **42**, 369-394.

FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. (2000). Pollination biology of Piperaceae species in southeastem Brazil. *Annals of Botany* **85**.

GANESAN, A. (2008). The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 306-317.

GLEITZ, J., BEILE, A., WILKINS, P., AMERI, A., PETERS, T. (1997). Antithrombotic action of the kava pyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets*. *Planta Medica* **63**, 27-30.

GORDALIZA, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* **9**, 767-776.

GOVINDACHARI, T. R., KRISHNA KUMARI, G. N., PARTHO, P. D. (1998). Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. *Phytochemistry* **49**, 2129-2131.

HAAN, J. W. D., VEN, L. J. M. V. D. (1973). Configurations and conformations in acyclic, unsaturated hydrocarbons. A C NMR study. *Organic Magnetic Resonance* **5**, 147-153.

HADACEK, F., GREGER, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* **11**, 137-147.

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874.

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 1° ed. São Carlos: EduFSCar. 2003. 152 p.

JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S., ZIMMER, E. A. (2004). Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: Reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Sciences* **165**, 403-416.

KATO, M. J., FURLAN, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 9.

KATO, M. J., LOPES, L. M. X., PAULINO FO, H. F., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. (1985). Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*. *Phytochemistry* **24**, 533-536.

KITAMURA, R. O. S., ROMOFF, P., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., LAGO, J. H. G. (2006). Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* **67**, 2398-2402.

KRETZSCHMAR, R., MEYER, H. J., TESCHENDORF, H. J. (1970). Strychnine antagonistic potency of pyrone compounds of the kavaroot (*Piper methysticum* Forst.). *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **26**, 283-284.

KUWAHARA, Y., NEMOTO, T., SHIBUYA, M., MATSURA, H., SHIRAIWA, Y. (1983). 2-Palmitoyl- and 2-oleoyl-cyclo-hexane-1,3-dione from feces of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: Kairomone components against a parasitic wasp, *Venturia canescens*. *Agricutural and Biological Chemistry* **47**, 1929-1931.

LI, N., WU, J. L., HASEGAWA, T., SAKAI, J., BAI, L. M., WANG, L. Y., KAKUTA, S., FURUYA, Y., OGURA, H., KATAOKA, T., TOMIDA, A., TSURUO, T., ANDO, M. (2007a). Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products* **70**, 544-548.

LI, N., WU, J. L., HASEGAWA, T., SAKAI, J., BAI, L. M., WANG, L. Y., KAKUTA, S., FURUYA, Y., OGURA, H., KATAOKA, T., TOMIDA, A., TSURUO, T., ANDO, M. (2007b). Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products* **70**, 998-1001.

LI, Y.-Z., HUANG, J., GONG, Z., TIAN, X.-Q. (2007c). A novel norlignan and a novel phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. *Helvetica Chimica Acta* **90**, 2222-2226.

MAHIOU, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., ROJAS DE ARIAS, A., INCHAUSTI, A., YALUFF, G., FOURNET, A. (1996). New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products* **59**, 694-697.

MARQUI, S. R. D., LEMOS, R. B., SANTOS, L. Á., CASTRO-GAMBOA, I., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D. S., SILVA, D. H. S., SCORZONI, L., FUSCO-ALMEIDA, A. M., MENDES-GIANNINI, M. J. S., YOUNG, M. C. M., TORRES, L. M. B. (2008). Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Quimica Nova* **31**, 828-831.

MARTINEZ, R. (2006). Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **32**, 449-460.

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

Mathieu G., the Internet Peperomia Reference, www.peperomia.net, 2001-2009.

MBAH, J. A., TCHUENDEM, M. H. K., TANE, P., STERNER, O. (2002). Two chromones from *Peperomia vulcanica*. *Phytochemistry* **60**, 799-801.

MONACHE, F. D., COMPAGNONE, R. S. (1996). A secolignan from *Peperomia glabella*. *Phytochemistry* **43**, 1097-1098.

MONTEIRO, D., GUIMARÃES, E. F. (2008). Flora do Parque Nacional do Itatiaia - Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). *Rodriguésia* **59**, 161-195.

MOTA, J. D. S., LEITE, A. C., JUNIOR, J. M. B., LÓPEZ, S. N., AMBRÓSIO, D. L., PASSERINI, G. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., CICARELLI, R. M. B., FURLAN, M. (2009). *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. *Planta Medica* **75**, 620-624.

MUDD, A. (1983). Further novel 2-acylcyclohexane-1,3-diones from lepidopteran larvae. *Journal of Chemical Society* **1**, 2161-2164.

NEMOTO, T. S., MASAO; KUWAHARA, YASUMASA AND SUZUKI, TAKAHISA (1987). New 2-acylcyclohexane-1,3-diones: Kairomones componentes against a parasitic wasp, *Venturia canescens*, from feces of the almond moth, *Cadra cautella*, and the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Agricutural and Biological Chemistry* **51**, 1805-1810.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70**, 461-477.

REIGADA, J. B., TCACENCO, C. M., ANDRADE, L. H., KATO, M. J., PORTO, A. L. M., LAGO, J. H. G. (2007). Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)-antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by Candida antarctica lipase (Novozym 435). *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 1054-1058.

SALAZAR, K. J. S., DELGADO PAREDES, G. E., LLUNCOR, L. R., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. (2005). Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry* **66**, 573-579.

SBARBATI, A., OSCULATI, F. (2006). Allelochemical communication in vertebrates: Kairomones, allomones and synomones. *Cells Tissues Organs* **183**, 206-219.

SCOTT, I. M., PUNIANI, E., JENSEN, H., LIVESEY, J. F., POVEDA, L., SANCHEZ-VINDAS, P., DURST, T., ARNASON, J. T. (2005). Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1907-1913.

SEERAM, N. P., JACOBS, H., MCLEAN, S., REYNOLDS, W. F. (1998). A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. *Phytochemistry* **49**, 1389-1391.

SEERAM, N. P., LEWIS, A. W., JACOBS, H., NAIR, M. G., MCLEAN, S., REYNOLDS, W. F. (2000). Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. *Journal of Natural Products* **63**, 399-402.

SILVA, R. V. D., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., MÉDA, C. I., M.YOUNG, M. C., R., A., FURLAN, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**, 521-527.

SOEJARTO, D. D. (1996). Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology* **51**, 1-15.

STAUNTON, J., WEISSMAN, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product Reports* **18**, 380-416.

TANAKA, T., ASAI, F., IINUMA, M. (1998). Phenolic compounds from *peperomia obtusifolia*. *Phytochemistry* **49**, 229-232.

VELOZO, L. S. M., FERREIRA, M. J. P., SANTOS, M. I. S., MOREIRA, D. L., EMERENCIANO, V. P., KAPLAN, M. A. C. (2006). Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* **67**, 492-496.

VELOZO, L. S. M., FERREIRA, M. J. P., SANTOS, M. I. S., MOREIRA, D. L., GUIMARÃES, E. F., EMERENCIANO, V. P., KAPLAN, M. A. C. (2009). C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia* **80**, 119-122.

VIEIRA, D. G., SILVA, R. M. D., SOARES, A. G., FONSECA, M. J. D. O., SILVA, O. F., CUNHA, F. Q. D., COSTA, R. A., GUIMARÃES, H. T. B. (2005). Desenvolvimento de *Cladosporium cladosporioides*, isolado de mamão, sob atmosfera controlada. *Papaya Brasil*, 413-415.

WANKE, S., JARAMILLO, M. A., BORSCH, T., SAMAIN, M.-S., QUANDT, D., NEINHUIS, C. (2007). Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 477-497.

WANKE, S., SAMAIN, M. S., VANDERSCHAEVE, L., MATHIEU, G., GOETGHEBEUR, P., NEINHUIS, C. (2006). Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). *Plant Biology* **8**, 93-102.

WINK, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.

WU, J., LI, N., HASEGAWA, T., SAKAI, J., KAKUTA, S., TANG, W., OKA, S., KIUCHI, M., OGURA, H., KATAOKA, T., TOMIDA, A., TSURUO, T., ANDO, M. (2005). Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. *Journal of Natural Products* **68**, 1656-1660.

XU, S., LI, N., NING, M. M., ZHOU, C. H., YANG, Q. R., WANG, M. W. (2006). Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. *Journal of Natural Products* **69**, 247-250.

ZHANG, G. L., LI, N., WANG, Y. H., ZHENG, Y. T., ZHANG, Z., WANG, M. W. (2007). Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. *Journal of Natural Products* **70**, 662-664.

7. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Edgard Antonio Ferreira

Nacionalidade: Brasileiro

Local de Nascimento: São Paulo/SP

Data de nascimento: 22/02/1979

FORMAÇÃO

Universidade Presbiteriana Mackenzie, Mackenzie, São Paulo, Brasil

Licenciatura e Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas, 2002-2006

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2003 Estrutura e propriedade de produtos naturais bioativos
Universidade Presbiteriana Mackenzie, Mackenzie, São Paulo, Brasil

2008 Extensão Universitária em Atualização: Proteção Radiológica
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2008 Fundamentals in Drug Discovery
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, São Paulo, Brasil

2008 Workshop Química de Produtos naturais no Brasil: planejamento estratégico para o futuro.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, São Paulo, Brasil

OCUPAÇÃO

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Mestrado em química orgânica, 2007- atual

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Belmay do Brasil Industria e Comércio Ltda.
Estágio: Controle de qualidade de fragrâncias
(11/2003 -12/2005)

Belmay do Brasil Industria e Comércio Ltda.
Assistente de laboratório de Desenvolvimento e Aplicação de fragrâncias
(01/2006 - 04/2007)

Participação do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, como estagiário/bolsista na disciplina QFL-3301-Reatividade de Compostos Orgânicos, no 2º semestre de 2008.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. Ferreira, E.F., Santi D., Gauber I., Guekezian M. Desenvolvmento de metodologia para determinação espectrofotométrica de S(IV) em diferentes amostras In: IV Encontro de Iniciação Científica da Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2003, São Paulo.

2. Ferreira, E.F., Kato M. J. Três novos policetídeos de *Peperomia* sp. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. 2008.