

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ALBERTO DE OLIVEIRA

Avaliação do potencial biológico
de piperolídeos naturais de
***Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC.**
e de análogos sintéticos

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/12/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALBERTO DE OLIVEIRA

**Avaliação do potencial biológico
de piperolídeos naturais de
Piper malacophyllum (C. Presl) C. DC.
e de análogos sintéticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

2008

Alberto de Oliveira

Avaliação do potencial biológico de piperolídeos naturais de *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. e de análogos sintéticos.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A Deus.

Aos meus pais, Luiz e Conceição.

À minha irmã, Roberta (in memoriam).

À Denise, pelo amor e por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

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

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

À FAPESP, pelos recursos financeiros.

Ao Prof. Massuo pela oportunidade, apoio, incentivo e orientação no decorrer deste trabalho. Também pela compreensão, pelos conselhos, mas principalmente pela amizade dedicada aos alunos.

À Prof^a. Maria Claudia M. Young e a Maura Casari do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo pela realização do ensaio antifúngico.

À Prof^a. Regina Maria Barretto Cicarelli e a Gabriela Duó Passerini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP pela realização do ensaio tripanocida.

Ao Prof. João Henrique G. Lago pela atenção e sugestões.

À Prof^a. Marina Tavares do Instituto de Química da USP pela disponibilização do equipamento de eletroforese capilar.

À Prof^a. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela classificação das plantas.

Ao técnico Joca pela cooperação e amizade.

Aos funcionários da SPG do IQ-USP, Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo pela atenção e amizade em todo o processo.

Aos amigos e colegas do LQPN, Adalberto, Edgard, Joca, Gi, Nidia, Lydia, Juliana, Lucas, Camila, Anderson, Aline, Karina, Homero, Clécio, Renata, Felipe que no decorrer deste trabalho me ensinaram, apoiaram e incentivaram.

As pessoas que sabem dar o verdadeiro sentido a palavra amizade, Claudinei, Adalberto, Marisi, Renata, Aline e Otávio.

Aos amigos adquiridos por meio dos encontros nos corredores do IQ-USP e dos intervalos para o café, Fernando, Tiago, Mauro, Luiz, Jean, Vanessa, Dani, Luciana e Vitor.

Aos colegas da SUPRANANO Juliano, Ronaldo, Sérgio e Adriana pelo apoio e compreensão.

A Denise, Francisco e Juraci, pelo apoio constante, pela dedicação, pela força e amizade.

Aos meus pais, indescritivelmente por tudo, amor, carinho e incentivo.

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

RESUMO

Oliveira, A. **Avaliação do potencial biológico de piperolídeos naturais de *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. e de análogos sintéticos.** 2008. 252p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em função da potente atividade antifúngica de piperolídeos (**1** e **2**) isolados do extrato das folhas de *Piper malacophyllum* foram sintetizados diversos análogos visando estabelecer indicativos sobre relações estrutura-atividade frente à *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e frente à forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Outros produtos naturais foram investigados nos extratos e foi constatada a predominância dos butenolídeos **1** e **2** no extrato metanólico de folhas. Foram isolados e caracterizados ainda dois sesquiterpenos [acetato de shizuka-acoradienolila (**4**) (inérito) e shizuka-acoradienol (**5**)] e dois compostos alquenilfenílicos [5-[(3*E*)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol (**3**) (inérito) e gibbilimbol B (**6**)]. Esses dois últimos foram observados como compostos predominantes nos extratos das raízes, caules e frutos. O alquenilbenzeno **3** foi também o produto majoritário no óleo essencial das folhas. Foi desenvolvido e validado um método em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para a análise dos butenolídeos em extratos de folhas de *P. malacophyllum*. Os compostos sintéticos foram preparados partir da condensação da 4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (**24**) com diversos benzaldeídos que resultaram na obtenção de butenolídeos **7-20**, **22** e **23**. Os piperolídeos naturais e sintéticos mostraram-se como classes promissoras como modelos para antifúngicos em ensaios contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, mas não foram promissores como tripanocidas.

Palavras-chave: *Piper malacophyllum*, piperolídeos, análogos sintéticos, eletroforese capilar, antifúngico e tripanocida.

ABSTRACT

Oliveira, A. **Evaluation of biological potential of natural piperolídeos of *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. and synthetic analogues.** 2008. 252p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Based on the powerful antifungal activity of piperolides (**1 e 2**) isolated from *Piper malacophyllum* leaves extracts, several analogues were synthesized aiming at establishing preliminary structure-activity relationship against *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* and against epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Phytochemical studies carried out on methanolic extract from leaves indicated butenolides **1 e 2** as major compounds in addition to two sesquiterpenes [shizuka-acoradienol acetate (**4**) (new compound) and shizuka-acoradienol (**5**)] and two alkenylphenyl compounds [5-[(3*E*)-oct-3-en-1-yl]-1,3-benzodioxole (**3**) (new compound) and gibbilimbol B (**6**)]. The last two were detected as major compounds in the root, stem and fruit extracts. The alkenylbenzene **3** was also found as the major product in the essential oil from leaves. One validated method based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was developed to analyse and validated the amount of butenolides the in *P. malacophyllum* leaves extracts. The butenolides **7-20**, **22 e 23** were prepared by condensation of 4-methoxyfuran-2(5*H*)-one (**24**) with several benzaldehydes. The natural and synthetic piperolides were found as a promising antifungal class against *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides*, although no trypanocidal activity was observed.

Keywords: *Piper malacophyllum*, piperolides, synthetic analogues, capillary electrophoresis, antifungal and trypanocidal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inter-relações das ordens e algumas famílias suportadas por freqüências de jackknife ou bootstrap acima de 50% em análises em grande escala de Angiospermas (APG <i>et al.</i> , 2003).	21
Figura 2. Diversidade estrutural dos metabólitos secundários de plantas (Wink, 2003).	24
Figura 3. Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas. Os principais genes clonados e enzimas estão em itálico. <i>TDC</i> , <i>L</i> -triptofano descarboxilase; <i>TyDC</i> , <i>L</i> -tirosina descarboxilase; <i>PAL</i> , <i>L</i> -fenilalanina amônia-liase; <i>C4H</i> , cinamato 4-hidroxilase; <i>4CL</i> , 4-cumarato CoA ligase; <i>CHS</i> , chalcona sintase; <i>CHR</i> , chalcona redutase; <i>CHI</i> , chalcona isomerase; <i>STS</i> , estilbeno sintase; <i>ACC</i> , acetil CoA carboxilase; <i>DXPS</i> , 1-desoxi-xilulose 5-fosfato sintase; <i>HMGR</i> , 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase; <i>SS</i> , sesquiterpeno sintase; <i>SqS</i> , esqualeno sintase; <i>SqE</i> , esqualeno epoxidase; <i>βAS</i> , β-amirina sintase; <i>2-HIS</i> , 2-hidroxiisoflavanona sintase; <i>IOMT</i> , isoflavona 4'- <i>O</i> -metiltransferase; <i>IFR</i> , isoflavona redutase.	26
Figura 4. Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> (Jaramillo e Manos, 2001).	29
Figura 5. Proposta biogenética para a formação do metilendioxipiperolídeo e do piperolídeo.	38
Figura 6. <i>Piper malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	39
Figura 7. Alquilidação de heterocíclicos de cinco membros para a formação dos γ-alquilidenobutenolídeos.	44
Figura 8. Exemplos de sínteses de γ-alquilidenobutenolídeos via alquilidação de compostos heterociclos de cinco membros contendo oxigênio.	45
Figura 9. Exemplos de lactonização via γ-hidroxiácidos e γ-oxoácidos.	46
Figura 10. Exemplos de lactonização via 4-alquenóicos e 4-alquinóicos.	47
Figura 11. Porcentagem de fármacos de produtos naturais (PN), derivados de PN, derivados biológicos e derivados sintéticos no top 35 mundial de vendas de fármacos de 2000, 2001 e 2002 (Butler, 2004).	55
Figura 12. Estruturas de alguns medicamentos mais vendidos recentemente derivados de produtos naturais.	56
Figura 13. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	65
Figura 14. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1 obtida após tratamento com celite do extrato metanólico das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	67
Figura 15. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1/1.	67
Figura 16. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1/3.	68
Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE das frações M1, M2 e M3 obtidas após tratamento com celite do extrato metanólico das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	105
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 1.	109
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de 1.	109
Figura 20. Espectro de massas de 1.	110
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 2.	110

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 2.....	111
Figura 23. Espectro de massas de 2.	111
Figura 24. Fragmentação referente à formação do pico base de 3 no espectro de massas.	113
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 3.....	114
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 3.....	114
Figura 27. Espectro no infravermelho (filme) de 3.	115
Figura 28. Espectro de massas de 3.	115
Figura 29. Fragmentação referente à formação do pico base de 6 no espectro de massas.	118
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 6.....	120
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 6.....	120
Figura 32. Espectro de DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) de 6.	121
Figura 33. Espectro no infravermelho (filme) de 6.	121
Figura 34. Espectro de massas de 6.	122
Figura 35. Estruturas dos gibbilibols A-D.	123
Figura 36. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas do composto 5.	124
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 5.....	126
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 5.....	126
Figura 39. Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de 5.	127
Figura 40. Espectro de massas de 5.	127
Figura 41. Estrutura do 1 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , acora-8(15),9-dien-7 <i>R</i> -ol.....	128
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 4.....	131
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 4.....	131
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 4.....	132
Figura 45. Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de 4.	132
Figura 46. Espectro no infravermelho (solução, CDCl_3) de 4.	133
Figura 47. Espectro de massas de 4.	134
Figura 48. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas do composto 4.	134
Figura 49. Cromatogramas de CG dos extratos de (a) raízes, (b) caules, (c) folhas e (d) frutos de <i>P. malacophyllum</i>	137
Figura 50. Cromatograma resultante da análise qualitativa por CG das parafinas utilizadas como padrão para a determinação do índice de Kovats.	140
Figura 51. Cromatograma resultante da análise por CG do óleo essencial de <i>P. malacophyllum</i>	143
Figura 52. Porcentagem de radiação incorporada ao extrato após administração de acetato de sódio-[1- ^{14}C] e <i>L</i> -fenilalanina-[U- ^{14}C] em função do tempo.	144

Figura 53. A) Cromatograma obtido por CLAE, com detecção a 254 nm e B) Radiocromatograma do extrato de folha de <i>P. malacophyllum</i> referentes ao experimento com acetato de sódio-(1- ¹⁴ C) no tempo de 22 h.....	146
Figura 54. A) Cromatograma obtido por CLAE, com detecção a 254 nm e B) Radiocromatograma do extrato de folha de <i>P. malacophyllum</i> referentes ao experimento com acetato de L-fenilalanina-(U- ¹⁴ C) no tempo de 29 h.....	147
Figura 55. Proposta biossintética para a formação do gibbilimbol B.	148
Figura 56. Análise dos butenolídeos em extrato de <i>P. malacophyllum</i> : A) Solução padrão de 1 e 2 a 30,0 µg mL ⁻¹ ; B) Extrato de <i>P. malacophyllum</i> contendo os butenolídeos. Em (A) e (B), cumarina a 30,0 µg mL ⁻¹ usada como padrão interno. Um capilar com 40,2 cm x 75 µm I.D. (janela de detecção 30 cm). Solução micelar: 20 mmol L ⁻¹ SDS, 20% (v/v) ACN e 10 mmol L ⁻¹ TBS pH 9,2. Injeção: 0,5 psi/5s. Voltagem: +25 kV. Detecção a 308 nm.	151
Figura 57. Curva de calibração. Faixa de concentração de 10,0 a 50,0 µg mL ⁻¹ baseada na área relativa dos picos: (A) butenolídeo 1 e cumarina (30,0 µg mL ⁻¹), (B) butenolídeo 2 e cumarina (30,0 µg mL ⁻¹) Eletrólito: 20 mmol L ⁻¹ SDS, 20 % ACN e 10 mmol L ⁻¹ de TBS, pH 9,2. Tensão: +25 kV, temperatura 22°C, injeção: 0,5 psi/5s e detecção em 308 nm.	154
Figura 58. Análise retrossintética para a síntese de análogos aos piperolídeos.....	159
Figura 59. Reação para a obtenção dos compostos análogos aos piperolídeos.....	160
Figura 60. Proposta de mecanismo para a síntese dos γ-arilidenobutenolídeos.	161
Figura 61. Síntese de γ-arilidenobutenolídeos via β-eliminação.	161
Figura 62. Reação para a preparação do composto 23.....	162
Figura 63. Espectro no IV (KBr) de 21.....	164
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 21.....	165
Figura 65. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de 21.....	165
Figura 66. Espectro de massas de 21.	166
Figura 67. Principais fragmentações de massas referentes ao aldeído 21.	167
Figura 68. Espectro no IV (KBr) de 8.....	169
Figura 69. Espectro no IV (KBr) de 10.....	169
Figura 70. Espectro no IV (KBr) de 11.....	170
Figura 71. Espectro no IV (KBr) de 12.....	170
Figura 72. Espectro no IV (KBr) de 13.....	171
Figura 73. Espectro no IV (KBr) de 14.....	171
Figura 74. Espectro no IV (KBr) de 15.....	172
Figura 75. Espectro no IV (KBr) de 16.....	172
Figura 76. Espectro no IV (KBr) de 17.....	173
Figura 77. Espectro no IV (KBr) de 18.....	173
Figura 78. Espectro no IV (KBr) de 19.....	174
Figura 79. Espectro no IV (KBr) de 20.....	174
Figura 80. Espectro no IV (KBr) de 22.....	175

Figura 81. Espectro no IV (KBr) de 23.....	175
Figura 82. Propostas de fragmentações de massas dos γ -arilidenobutenolídeos relacionadas à obtenção dos picos bases.....	176
Figura 83. Espectro de massas de 8.....	177
Figura 84. Espectro de massas de 10.....	177
Figura 85. Espectro de massas de 11.....	178
Figura 86. Espectro de massas de 12.....	178
Figura 87. Espectro de massas de 13.....	179
Figura 88. Espectro de massas de 14.....	179
Figura 89. Espectro de massas de 15.....	180
Figura 90. Espectro de massas de 16.....	180
Figura 91. Espectro de massas de 17.....	181
Figura 92. Espectro de massas de 18.....	181
Figura 93. Espectro de massas de 19.....	182
Figura 94. Espectro de massas de 20.....	182
Figura 95. Espectro de massas de 22.....	183
Figura 96. Espectro de massas de 23.....	183
Figura 97. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 22.....	186
Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 22.....	186
Figura 99. Correlações ^1H - ^{13}C (J^2 e J^3) a longa distância (HMBC) para o composto 22.....	187
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 8.....	188
Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 8.....	188
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 10.....	189
Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 10.....	189
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 11.....	190
Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 11.....	190
Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 12.....	191
Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 12.....	191
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 13.....	192
Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 13.....	192
Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 14.....	193
Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 14.....	193
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 15.....	194
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 15.....	194
Figura 114. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 16.....	195
Figura 115. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 16.....	195

Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 17.....	196
Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 17.....	196
Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 18.....	197
Figura 119. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 18.....	197
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 19.....	198
Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 19.....	198
Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 20.....	199
Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 20.....	199
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 23.....	200
Figura 125. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 23.....	200
Figura 126. Correlações espaciais sugeridas para 10, 13, 14, 15, 18, 19, 20 e 22 baseadas nos mapas de contornos NOESY.....	202
Figura 127. Possíveis conformações do (5 <i>E</i>)-3-benzil-5-(2,4,6-trimetoxibenzilideno)-furan-2(5 <i>H</i>)-ona.....	203
Figura 128. Conformações do composto 22.	203
Figura 129. Espectro no IV (KBr) de 7.....	204
Figura 130. Espectro no IV (KBr) de 9.....	205
Figura 131. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 7.....	206
Figura 132. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 7.....	207
Figura 133. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 9.....	207
Figura 134. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 9.....	208
Figura 135. Espectro de DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) de 9.....	208
Figura 136. Mapa de contorno HETCOR (50 MHz em f1 e 200 MHz em f2, CDCl_3) de 9.	209
Figura 137. Espectros de massas de 7.....	210
Figura 138. Espectro de massas de 9.	210
Figura 139. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas dos compostos 7 e 9.....	211
Figura 140. Atividade antifúngica (μg) [#] contra <i>C. cladosporioides</i> and <i>C. sphaerospermum</i> . [#] Quantidade mínima requerida para a inibição do crescimento dos fungos por bioautografia. * = atividade fraca, ** = atividade média, *** = atividade forte. ^a (Lago <i>et al.</i> , 2005).	213
Figura 141. Estruturas dos butenolídeos submetidos à avaliação da atividade tripanocida. Benzonidazol ($9,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi usado como controle positivo.	217
Figura 142. Proposta de relações biossintéticas entre os metabólitos secundários isolados de <i>Piper malacophyllum</i> e outras espécies de <i>Piper</i> que produzem compostos similares. PKS III: policetídeo sintase tipo III.....	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de Piperaceae.....	30
Tabela 2. Ocorrência natural de γ -alquilidenobutenólídeos bioativos.	42
Tabela 3. Material vegetal coletado da espécie <i>P. malacophyllum</i>	64
Tabela 4. Gradiente dos solventes para análise das frações M1, M2 e M3.....	69
Tabela 5. Radiação absoluta em cada experimento de incorporação do precursor $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+-[1-^{14}\text{C}]$ in vivo em <i>P. malacophyllum</i>	75
Tabela 6. Radiação absoluta em cada experimento de incorporação do precursor <i>L</i> -fenilalanina-[U- $^{14}\text{C}]$ in vivo em <i>P. malacophyllum</i>	76
Tabela 7. Parâmetros experimentais investigados.	79
Tabela 8. Matriz para os três parâmetros e os dois níveis (fatores na escala de códigos e as variáveis).	79
Tabela 9. Dados referentes ao preparo dos compostos 9 ao 22.	84
Tabela 10. Identificação dos compostos obtidos por CLAE do extrato metanólico das folhas de <i>P.</i> <i>malacophyllum</i>	106
Tabela 11. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz) dos piperolídeos 1 e 2 (δ , CDCl_3).....	108
Tabela 12. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de 3 (300 e 75 MHz, δ , CDCl_3).	113
Tabela 13. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN de 6 (200 e 50 MHz, δ , CDCl_3).	119
Tabela 14. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do 1 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , acora-8(15),9- dien-7 <i>R</i> -ol (175 MHz, δ , CDCl_3) e 5 (200 e 50 MHz, δ , CDCl_3).	125
Tabela 15. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN do 1 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , acora-8(15),9- dien-7 <i>R</i> -ol (175 MHz, δ , CDCl_3) e 4 (500 e 75 MHz, δ , CDCl_3).	130
Tabela 16. Análise dos extratos das raízes, caules, folhas e frutos de <i>P. malacophyllum</i>	136
Tabela 17. Tempos de retenção corrigidos ($t_{R'}$) das parafinas na determinação do índice de Kovats.	139
Tabela 18. Índices de Kovats e percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	142
Tabela 19. Matriz para os três parâmetros e os dois níveis (fatores na escala de códigos e as variáveis).	149
Tabela 20. Método de validação relativo à precisão intra-ensaio.	153
Tabela 21. Método de validação relativo à linearidade e limites de detecção e quantificação para os butenólídeos 1 e 2.	156
Tabela 22. Método de validação relativo à exatidão: teste de recuperação para os butenólídeos em extratos de <i>P. malacophyllum</i>	157

Tabela 23. Variação intra-específica dos butenolídeos 1 e 2 em extratos de folhas de <i>P. malacophyllum</i>	158
Tabela 24. Métodos de purificação, características e rendimentos dos compostos sintetizados.....	163
Tabela 25. Bandas no IV referentes ao estiramento CO de grupos carbonílicos dos γ -arilidenobutenolídeos.....	168
Tabela 26. Principais dados de RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3) para os γ -arilidenobutenolídeos.	185
Tabela 27. Atividade antifúngica (μg) contra <i>C. cladosporioides</i> and <i>C. sphaerospermum</i> . Atividade fraca = *, Atividade média = **, Atividade forte = *** e Inativo = i.	214
Tabela 28. Atividade tripanocida (%) <i>in vivo</i> dos compostos contra a cultura da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y). Benzonidazol ($9,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi usado como controle positivo.	217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCI ₃	clorofórmio deuterado
CE	eletroforese capilar
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	homonuclear correlation spectroscopy
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	diclorometano
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DIPEA	diisopropiletilamina
DMSO	dimetilssulfóxido
DO	densidade ótica
HETCOR	heteronuclear chemical-shift correlation
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
Hz	Hertz
IC ₅₀	concentração necessário para inibir a metade da resposta biológica máxima
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hz
LIT	Liver Infusion Tryptose
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
m/z	razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica em Da
MeOH	metanol
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar

mult	multiplicidade
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
PAR	área relativa do pico
PKS	policetídeo sintase
PMS	fenazina metossulfato
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
Rs	resolução
RSD	desvio padrão relativo
S	slope
SDS	dodecil sulfato de sódio
t.a.	temperatura ambiente
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilil
TBDMSOTf	<i>tert</i> -butildimetilsililtrifluorometanossulfonato
TBS	tetraborato de sódio
t_R	tempo de retenção
Tf	temperatura de fusão
t_m	tempo de migração
δ	deslocamento químico
s	simpleto
sl	simpleto largo
d	dupleto
dl	dupleto largo
t	tripleto
m	multipleto
dd	dupleto duplo
td	tripleto duplo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. A Família Piperaceae e o gênero <i>Piper</i>	28
1.2. A espécie <i>Piper malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	39
1.3. Piperolídeos	39
1.4. Análise cromatográfica de butenolídeos em extratos de plantas.....	48
1.5. Produtos naturais como antifúngicos e tripanocidas	50
1.6. Emprego de produtos naturais e sintéticos no desenvolvimento de fármacos.....	53
2. OBJETIVOS.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1. Generalidades metodológicas.....	61
3.2. Metabólitos secundários de <i>P. malacophyllum</i>	63
3.2.1. Coleta do material vegetal.....	63
3.2.2. Metabólitos secundários das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	64
3.2.2.1. Obtenção do extrato	64
3.2.2.2. Eliminação da clorofila	64
3.2.2.3. Fracionamento cromatográfico.....	65
3.2.2.4. Análise por CLAE.....	68
3.2.2.5. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos compostos identificados em <i>P. malacophyllum</i> (Piperaceae).....	69
3.2.3. Metabólitos secundários das raízes, caules, folhas e frutos de <i>P. malacophyllum</i>	73
3.2.3.1. Preparo das amostras	73
3.2.4. Composição do óleo essencial das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	74
3.2.4.1. Obtenção e análise do óleo essencial	74
3.2.5. Administração de precursores radioativos (acetato-[1- ¹⁴ C] e L-fenilalanina-[U- ¹⁴ C]) em folhas de <i>P. malacophyllum</i>	74
3.3. Desenvolvimento e validação de um método em cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) para a quantificação e determinação de butenolídeos em <i>P. malacophyllum</i>	77
3.3.1. Condicionamento do capilar e procedimento	77
3.3.2. Preparo das soluções padrões	77
3.3.3. Preparo das amostras	78
3.3.4. Ensaio fatorial	78
3.3.5. Preparo do sistema micelar	80
3.3.6. Validação do método	80
3.4. Procedimentos sintéticos	81
3.4.1. Síntese de compostos análogos de piperolídeos	81
3.5. Ensaio biológicos.....	100
3.5.1. Avaliação da atividade antifúngica contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100
3.5.2. Ensaio contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
3.5.2.1. Cultivo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
3.5.2.2. Método colorimétrico utilizando MTT	101

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.1. Metabólitos secundários da <i>Piper malacophyllum</i>	104
4.1.1. Metabólitos secundários das folhas de <i>Piper malacophyllum</i>	104
4.1.1.1. Análise por CLAE.....	104
4.1.1.2. Fracionamento cromatográfico.....	106
4.1.1.3. Elucidação estrutural.....	107
4.1.2. Metabólitos secundários das raízes, caules, folhas e frutos de <i>P. malacophyllum</i>	135
4.1.3. Composição do óleo essencial das folhas de <i>P. malacophyllum</i>	138
4.1.4. Administração de precursores radioativos (acetato-[1- ¹⁴ C] e L-fenilalanina-[U- ¹⁴ C]) em folhas de <i>P. malacophyllum</i>	144
4.2. Desenvolvimento e validação de um método em cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) para a quantificação e determinação de butenólídeos em <i>P. malacophyllum</i>	148
4.2.1. Desenvolvimento do método	148
4.2.2. Validação do método	152
4.2.2.1. Precisão	152
4.2.2.2. Linearidade.....	153
4.2.2.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	155
4.2.2.4. Exatidão.....	156
4.2.2.5. Análise	157
4.3. Síntese de compostos análogos de piperolídeos	158
4.4. Ensaios biológicos.....	211
4.4.1. Avaliação da atividade antifúngica contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	211
4.4.2. Ensaio contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	216
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	219
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224
7. SÚMULA CURRICULAR	248

1. INTRODUÇÃO

As Angiospermas (Angiospermae, Magnoliophyta ou plantas com flores), um dos principais clados das plantas com sementes, é o maior grupo de embriófitas, com pelo menos 300.000 espécies classificadas em 453 famílias (Borsch *et al.*, 2003; Soltis e Soltis, 2004; Sun *et al.*, 2008). O fóssil mais antigo data do início do Cretáceo, 130-136 milhões de anos atrás, seguido pelo rápido domínio ecológico em vários habitats antes do final do Cretáceo. Devido a esse explosivo surgimento, Darwin referiu-se a sua origem como "um mistério abominável", em uma conhecida citação mencionada em uma carta para J. D. Hooker (Labandeira *et al.*, 1994; Crane *et al.*, 1995; Crane *et al.*, 2004).

As Angiospermas são surpreendentemente diversificadas e ocupam todos os nichos da Terra, exceto em extremos de altitude, regiões imediatamente ao redor dos pólos e oceanos mais profundos. Possuem hábito epifítico, são aquáticas flutuantes e enraizadas em habitats de água doce e marinhos e, como plantas terrestres, são bastante variáveis em tamanho, longevidade e forma. Possuem elevada variedade na morfologia, nas características e estratégias reprodutivas. O tamanho do genoma e a organização são de complexidade única no Reino Vegetal (Soltis e Soltis, 2004).

Entre os recentes sistemas de classificação botânica normalmente usados podem ser citados o de Dahlgren (1980), Cronquist (1981) e Takhtajan (1980; 1997) que dividem as Angiospermas em grupos como as dicotiledôneas e monocotiledôneas.

A partir de análises filogenéticas usando-se a seqüência nucleotídica do gene dos cloroplastos para carboxilase/oxigenase ribulose-1,5-bisfosfato (*rbcL*), e

utilizando-se uma grande amostragem de Angiospermas, ficou evidente que a divisão em dicotiledônea e monocotiledônea era artificial, pois somente as monocotiledôneas eram monofiléticas (Chase, 1993). Os resultados indicam que especialmente as subclasses Dilleniidae e Hamamelididae eram polifiléticas. Devido a este fato, o Angiosperm Phylogeny Group (APG) apresentou um sistema novo de classificação das Angiospermas, segundo critérios filogenéticos nas quais famílias e ordens monofiléticas foram enfatizadas (APG *et al.*, 1998) (Figura 1). Análises filogenéticas baseadas em um número cada vez maior de seqüências genéticas têm estabelecido de maneira clara e inequívoca, as primeiras ramificações de uma diversidade de Angiospermas. Muitos estudos têm revelado um forte apoio para o relacionamento da Amborellaceae, seguida por Nymphaeales, e então Austrobaileyales como grupo irmão de todas as outras Angiospermas existentes (Soltis *et al.*, 2005). Das Angiospermas remanescentes, ou Mesangiospermae (Cantino *et al.*, 2007), podem ser citadas as Magnoliides, Chloranthaceae, monocotiledôneas, Ceratophyllaceae, e eudicotiledôneas (Soltis *et al.*, 2008).

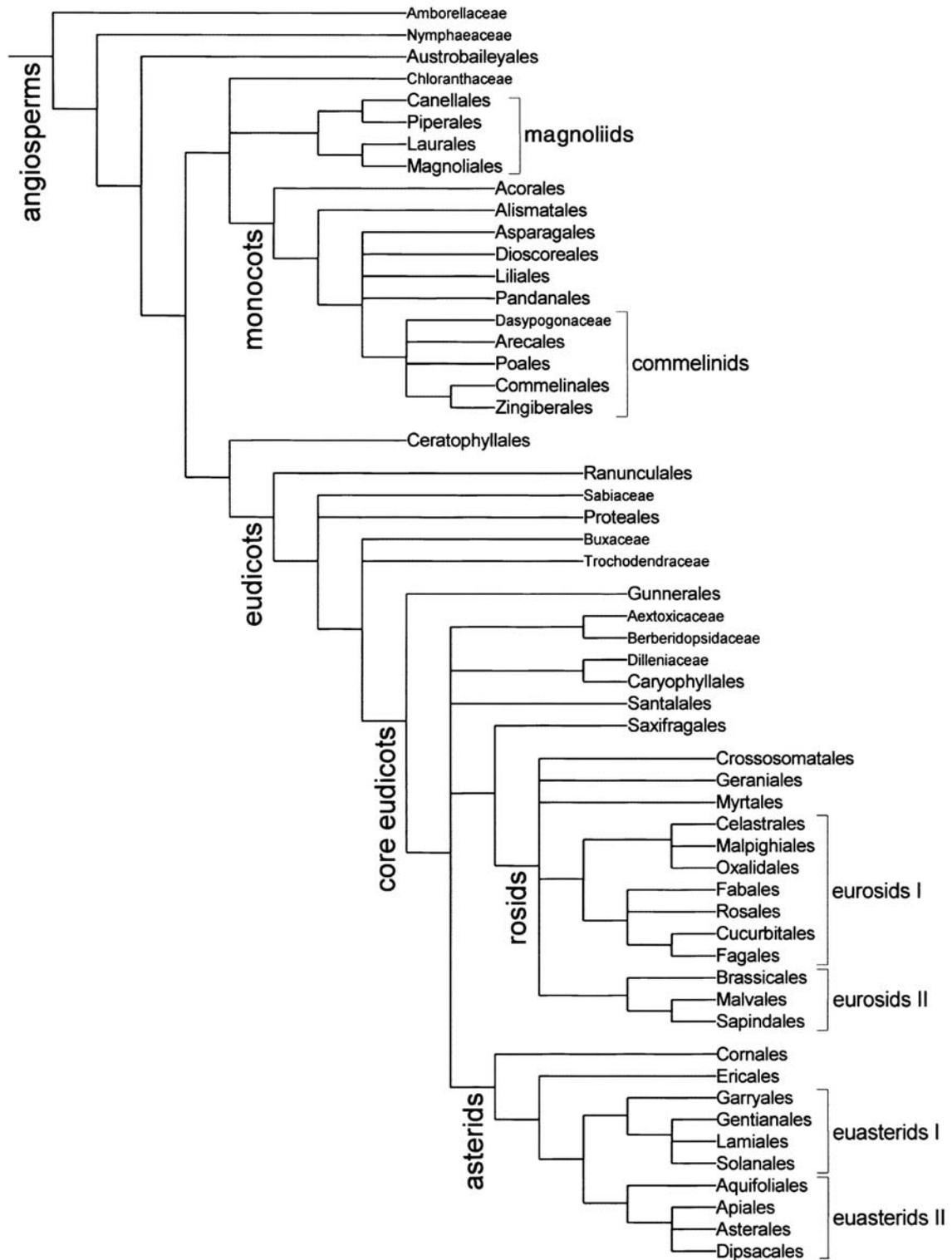


Figura 1. Inter-relações das ordens e algumas famílias suportadas por frequências de jackknife ou bootstrap acima de 50% em análises em grande escala de Angiospermas (APG *et al.*, 2003).

Análises recentes têm melhorado muito a compreensão das relações filogenéticas entre as Angiospermas, confirmando o esboço do sistema adotado pelo APG II (Chase, 1993; Nandi *et al.*, 1998; Savolainen *et al.*, 2000a; Savolainen *et al.*, 2000b; Soltis *et al.*, 2000a).

As Piperales representam a maior ordem das Angiospermas basais e possuem uma distribuição praticamente mundial compreendendo cerca de 4300 espécies, com três grandes gêneros que incluem mais de 500 espécies (Frodin, 2004; Wanke *et al.*, 2007). Mais de 80% de suas espécies são ervas perenes e que produzem flores sem perianto. A proximidade das Piperales com Nymphaeales e sua condição basal entre as Angiospermae é indicada pelo seu posicionamento na região central do sistema APG II (APG *et al.*, 2003). Os membros da ordem Piperales exibem um vasto espectro de especializações na morfologia floral e polinização. Se de um lado as Aristolochiaceae atraem insetos com suas flores altamente especializadas, por outro, as Piperaceae e Saururaceae possuem flores com periantos reduzidos, sendo polinizadas por abelhas e moscas (Semple, 1974; Marquis, 1988; De Figueiredo e Sazima, 2000, 2007).

A estreita relação de todas as quatro ordens, Piperales, Canellales, Magnoliales e Laurales para formar o clado Magnoliides é bem suportada por estudos de anatomia floral e das seqüências de *rbcL*, *atpB* e 18S, que foram realizados visando reconstruir a origem evolutiva dessas ordens. Os dados indicam a divisão em diversos sub-gêneros (Taylor e Hickey, 1992; Kallersjo *et al.*, 1998; Magallon *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 1999; Barkman *et al.*, 2000; Doyle e Endress, 2000; Mathews e Donoghue, 2000; Soltis *et al.*, 2000b; Friedman, 2001; Jaramillo e Manos, 2001; Qiu *et al.*, 2001; Von Balthazar e Endress, 2002; Zanis *et al.*, 2002; Hilu *et al.*,

2003; Sauquet *et al.*, 2003; Zanis *et al.*, 2003; Jaramillo *et al.*, 2004; Borsch *et al.*, 2005; Lohne e Borsch, 2005; Qiu *et al.*, 2005; Soltis *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários estão presentes em todas as plantas superiores e devido à multiplicidade de espécies vegetais possuem estruturas moleculares extremamente diversificadas (Figura 2). Tal multiplicidade de estruturas pode ser associada ao longo processo evolutivo, onde as plantas se diversificaram num meio ambiente repleto de bactérias, vírus, fungos, animais e insetos (Dixon, 2001; Firn e Jones, 2003). Assim sendo, tais produtos têm sido evolutivamente selecionados e assumiram funções específicas na biocenose como importantes mediadores em diversas relações como aleloquímicos (feromôneos, cairomôneos, alelopáticos etc.) (Pinto *et al.*, 2002; Wink, 2003).

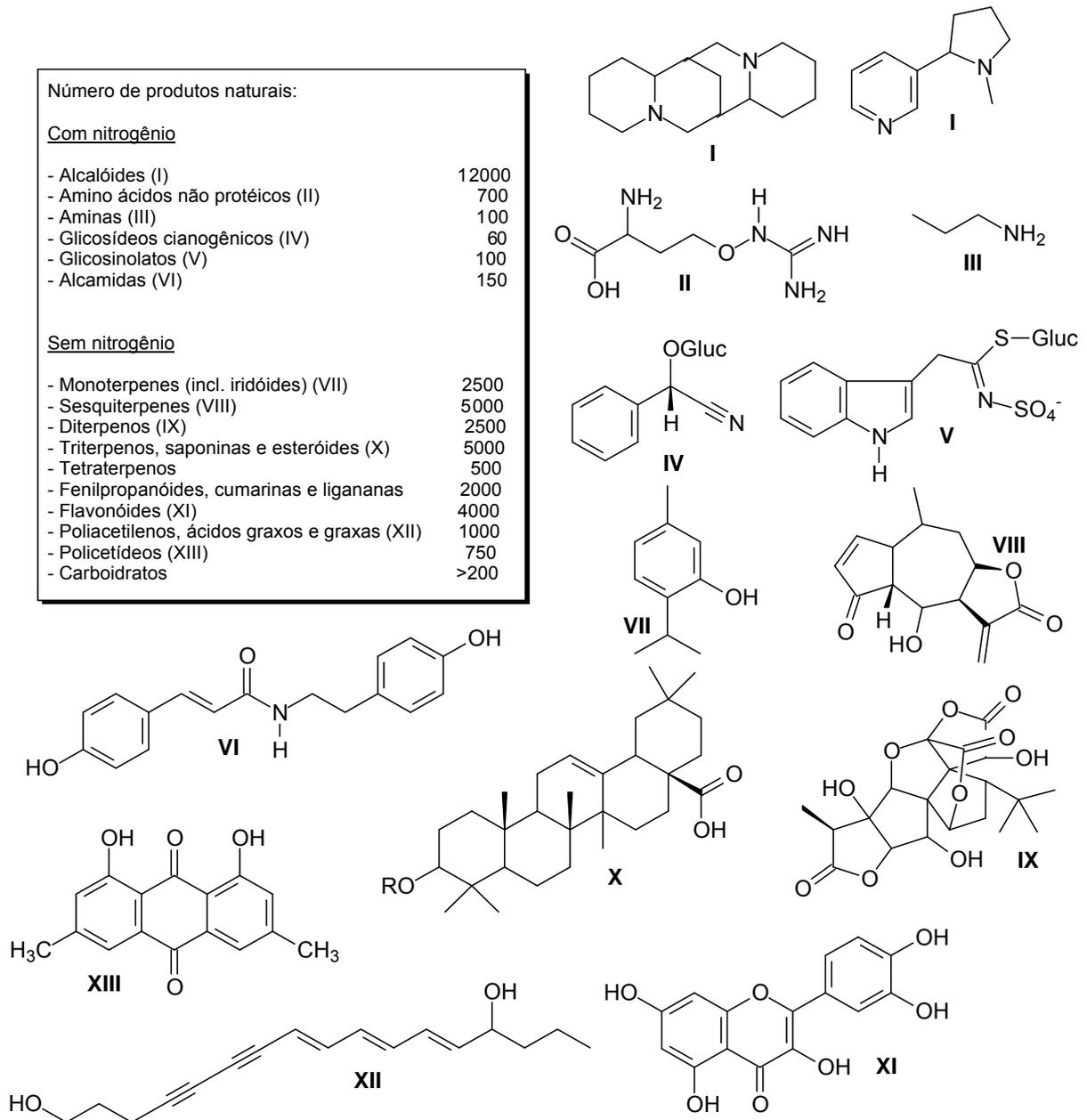


Figura 2. Diversidade estrutural dos metabólitos secundários de plantas (Wink, 2003).

Como regra geral, um único grupo de metabólitos secundários é muitas vezes tema dominante dentro de um determinado táxon e são geralmente acompanhados por diversos derivados e componentes minoritários. O padrão de metabólitos secundários nos diferentes órgãos e tecidos em uma determinada planta é quase sempre variável. Além disso, variações quali- e quantitativas nos componentes em

um perfil químico podem ser observadas entre os diferentes estágios de desenvolvimento entre indivíduos e populações. Metabólitos secundários podem estar presentes na planta em um estado ativo ou como uma “pró-droga” que é ativada após algum ferimento, infecção ou ataque por herbívoro (Wink, 2003). A biossíntese de alguns metabólitos secundários também pode ser induzida após algum ferimento ou infecção (fitoalexinas) e por fatores ambientais (Kutchan, 2001).

A biossíntese de produtos naturais é bastante conhecida e a grande maioria pode ser classificada como sendo oriunda da via dos isoprenóides, fenilpropanóides, alcalóides, ácidos graxos/policetídeos e de biossíntese mista (Figura 3) (Mann, 1995; Dixon, 2001; Cseke *et al.*, 2006). A biossíntese de produtos naturais começou a ser conhecida no início da década de sessenta com base em experimentos de administração de precursores isotopicamente marcados em plantas diferenciadas. O sucesso no isolamento e caracterização da fenilalanina-amônia-liase (Koukol e Conn, 1961) e tirosina-amônia-liase (Neish, 1961) foi um grande estímulo nesta área. Somente no início da década de setenta, através do uso da cultura de células como fonte de enzimas, foi possível um avanço considerável na área de biossíntese de produtos naturais com descrições das características enzimológicas envolvidos num grande número de etapas biossintéticas (Zenk, 1991; Kutchan, 1993). Os estudos de biossíntese são baseados em hipóteses onde um determinado caminho metabólico é seguido por um ou mais precursores comuns, sendo convertidas pela ação de enzimas altamente seletivas durante o processo para originar as mais diversas formas estruturais de metabólitos (Cseke *et al.*, 2006).

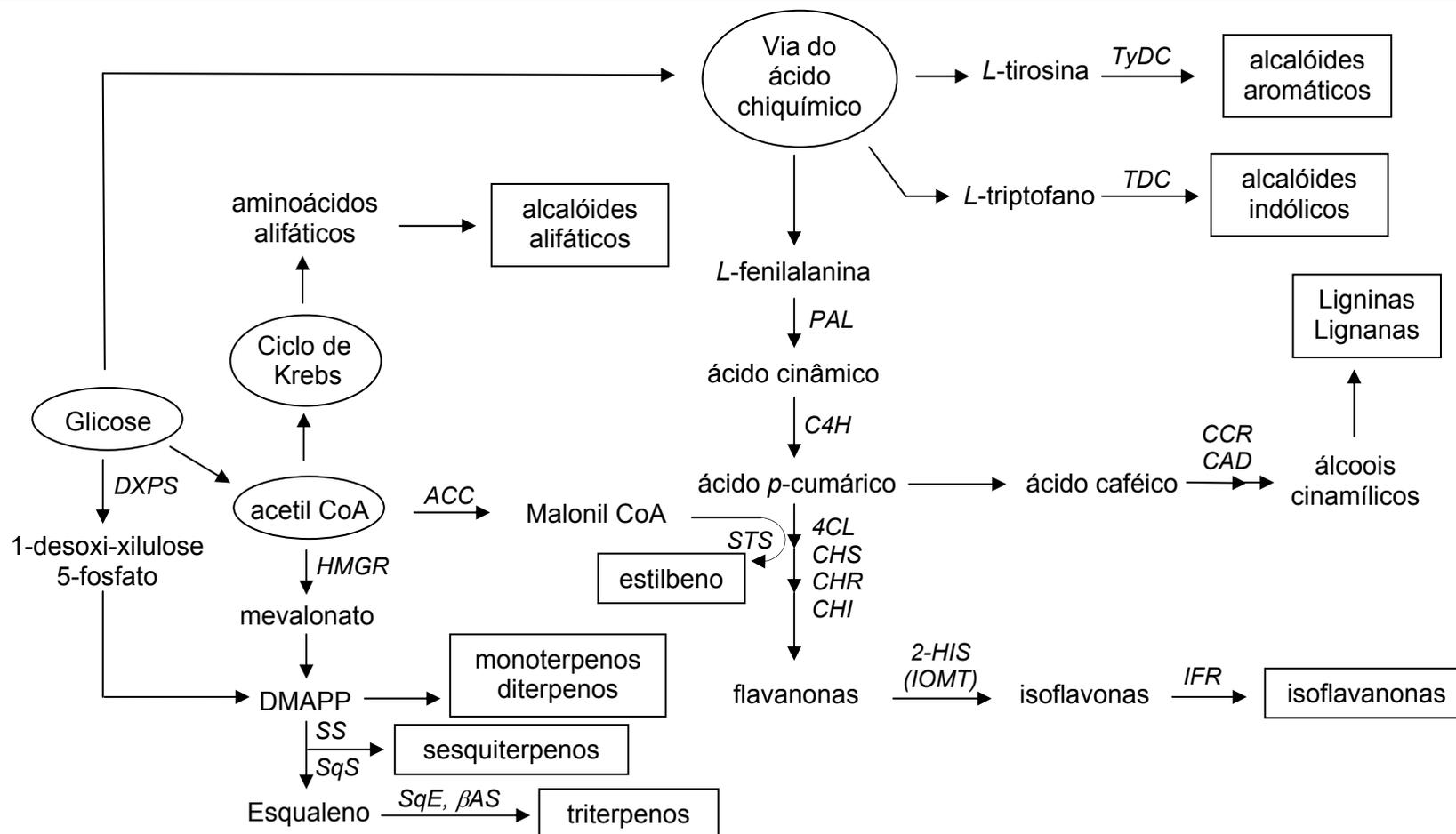


Figura 3. Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas. Os principais genes clonados e enzimas estão em **itálico**. *TDC*, *L*-triptofano descarboxilase; *TyDC*, *L*-tirosina descarboxilase; *PAL*, *L*-fenilalanina amônia-liase; *C4H*, cinamato 4-hidroxilase; *4CL*, 4-cumarato CoA ligase; *CHS*, chalcona sintase; *CHR*, chalcona redutase; *CHI*, chalcona isomerase; *STS*, estilbeno sintase; *ACC*, acetil CoA carboxilase; *DXPS*, 1-desoxi-xilulose 5-fosfato sintase; *HMGR*, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase; *SS*, sesquiterpeno sintase; *SqS*, esqualeno sintase; *SqE*, esqualeno epoxidase; *βAS*, β-amirina sintase; *2-HIS*, 2-hidroxiisoflavanona sintase; *IOMT*, isoflavona 4'-*O*-metiltransferase; *IFR*, isoflavona redutase.

O enfoque moderno para investigar a biossíntese de produtos naturais tem sido baseado cada vez mais no uso das ferramentas de biologia molecular nos quais os estudos sobre a regulação dos genes e do papel dos metabólitos secundários vêm sendo descritos (Petersen, 2007).

Vias metabólicas nas diferentes espécies de plantas muitas vezes possuem várias características conservadas e empregam um conjunto de reações bioquímicas conservadas. O sequenciamento do genoma e estudos de genes envolvidos no metabolismo são ferramentas valiosas para a compreensão da relação dos genes na mesma ou entre diferentes espécies vegetais. A comparação de genes de diferentes espécies mostra que muitos genes envolvidos na biossíntese ocorrem em famílias ou grupos de seqüências relacionadas (Pichersky e Gang, 2000).

Além de detecção, isolamento e caracterização das enzimas e genes envolvidos na formação de produtos naturais, as estruturas das enzimas após a cristalização já estão sendo investigadas. O conhecimento das estruturas das enzimas envolvidas no metabolismo secundário além de nos fornecer informações sobre a arquitetura de sítios ativos, também apresenta dados para compreender os mecanismos de reação, bem como a origem evolutiva dessas enzimas (Noel *et al.*, 2005).

A manipulação na formação de produtos naturais também tem sido realizada pela superexpressão ou supressão dos genes que codificam enzimas biossintéticas ou reguladoras (fatores da transcrição), bem como pela transferência desses genes para outros organismos, incluindo outras plantas, bactérias e leveduras (Wesley *et al.*, 2001; Vom-Endt *et al.*, 2002; Winkel, 2004; Dixon, 2005; Ro *et al.*, 2006).

1.1. A Família Piperaceae e o gênero *Piper*

A família Piperaceae, juntamente com outros membros da ordem Piperales como a Aristolochiaceae, Saururaceae e Lactoridaceae, é considerada como uma das famílias mais primitivas entre as Angiospermas (Taylor e Hickey, 1992). Um conhecimento detalhado dos caracteres relacionados com o metabolismo secundário, da biossíntese e da biologia é necessário para estabelecer a evolução deste grupo, visto que a taxonomia das Piperaceae também é bastante complexa (Kato e Furlan, 2007).

A família Piperaceae é constituída por cinco a oito gêneros ou mais, dependendo do tratamento (Dyer e Palmer, 2004) com um número estimado de mais de 4000 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. A maioria dos exemplares dessa família são arbustos ou trepadeiras, raramente sendo encontradas árvores (Quijano-Abril *et al.*, 2006; Kato e Furlan, 2007). Os dois principais gêneros desta família são *Piper* e *Peperomia* com 2000 (Quijano-Abril *et al.*, 2006) e 1500 espécies (Wanke *et al.*, 2006), respectivamente. Espécies de *Piper* estão localizadas em todos os tipos de vegetações, mas principalmente como componentes de vegetação pioneira (Parmar *et al.*, 1997). As espécies de *Peperomia*, por sua vez, são muito comumente encontradas como epífitas ou como plantas suculentas em florestas úmidas e áreas montanhosas, sendo usadas principalmente como plantas ornamentais (Santos *et al.*, 2001; Kato e Furlan, 2007). Algumas espécies de Piperaceae vêm sendo utilizadas há centenas de anos, seja na alimentação (*Piper nigrum*) ou na medicina tradicional (Singh, 1992; Parmar *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2008). Desta forma, sua importância nas farmacopéias de diversos países tropicais está bem estabelecida (Parmar *et al.*, 1997).

A grande diversidade das espécies de *Piper* localiza-se na região Neotropical (Figura 4), onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontradas. A maioria das espécies de *Piper* habita lugares húmidos, quentes, várzea de florestas tropicais. A diversidade e abundância de *Piper* geralmente diminuem com o aumento da altitude ou com o decréscimo da precipitação (Dyer e Palmer, 2004).

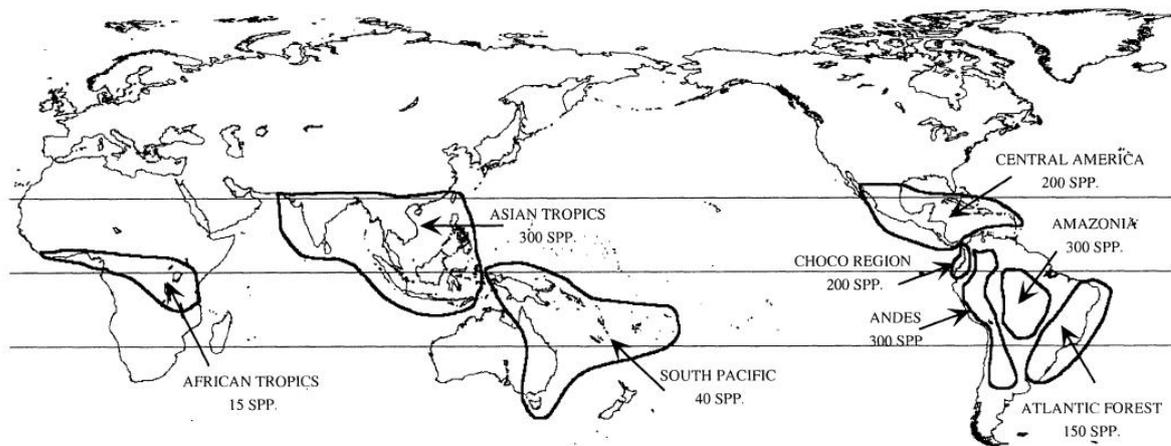


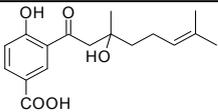
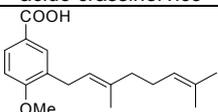
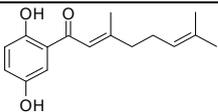
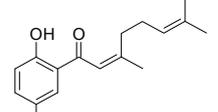
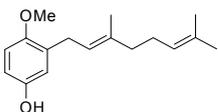
Figura 4. Distribuição geográfica do gênero *Piper* (Jaramillo e Manos, 2001).

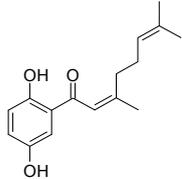
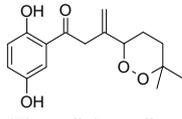
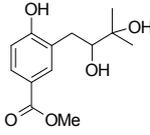
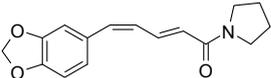
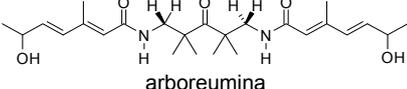
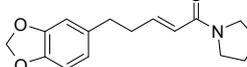
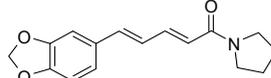
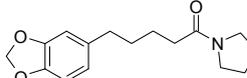
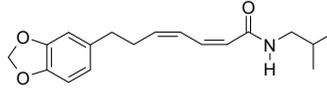
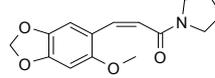
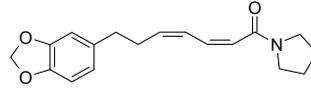
A espécie *Piper nigrum* cujas sementes são utilizadas popularmente como a “pimenta-do-reino”, é uma das mais conhecidas e estudadas quimicamente. A pimenta-do-reino possui alto valor comercial principalmente como condimento devido ao seu sabor picante, que é atribuído a amidas aromáticas, em especial a piperina (Semler e Gross, 1988). Outra espécie de *Piper* de interesse comercial e científico é a *Piper methysticum* da qual se obtém, a partir de seus rizomas, o chá de cava-cava que é um potente ansiolítico difundido principalmente na região da Oceania. Tem-se que os responsáveis por esta atividade são cavapironas, como a metisticina e a cavaína, que Singh (Singh, 1992) descreveu como substâncias com efeitos anestésicos e hipnóticos. Algumas outras espécies (por exemplo, *P. cubeba*,

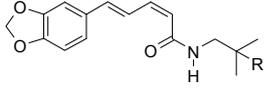
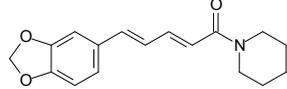
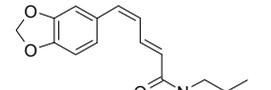
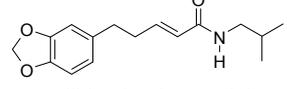
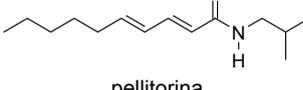
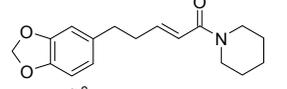
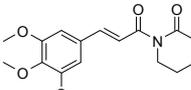
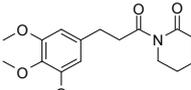
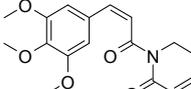
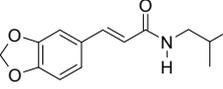
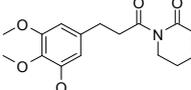
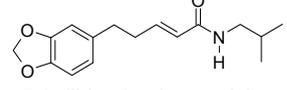
pimenta-cubeba; *P. longum*, pimenta longa; *P. auritum*, hoja santa) são utilizados localmente como condimentos ou medicamentos (Dyer e Palmer, 2004).

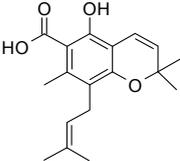
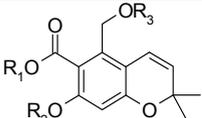
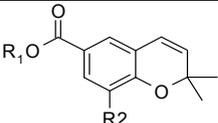
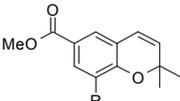
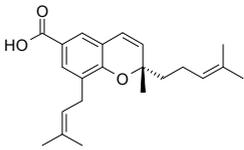
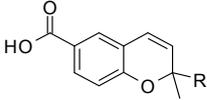
Espécies da família Piperaceae tem sido objeto de inúmeras investigações fitoquímica e muitos metabólitos secundários apresentam atividades biológicas. As principais classes de compostos descritos incluem fenilpropanóides, lignanas/neolignanas, policetídeos, pironas, flavonóides, amidas alifáticas e aromáticas, alcalóides, derivados de ácidos benzóicos e cromenos (Tabela 1).

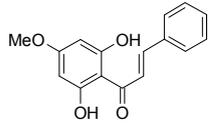
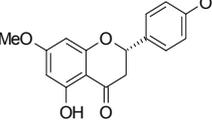
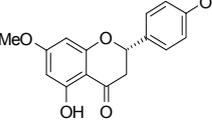
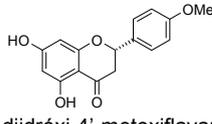
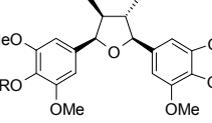
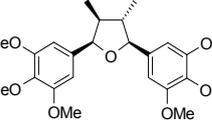
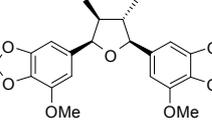
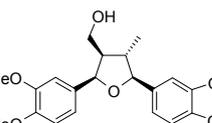
Tabela 1. Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de Piperaceae.

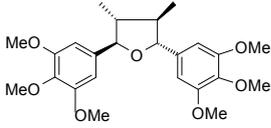
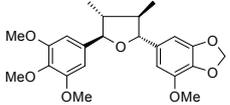
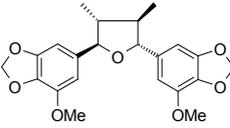
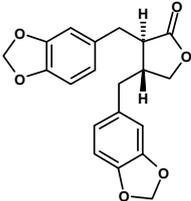
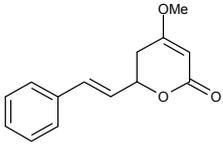
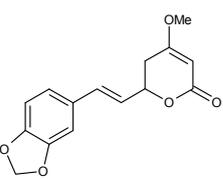
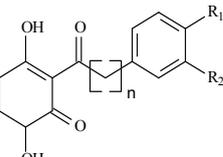
Espécies	Ácidos benzóicos /hidroquinonas preniladas	Atividade biológica	Referências
<i>Piper crassinervium</i>	 ácido crassinérvico	Antifúngica contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2004)
	 ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzóico		
	 1,4-diidróxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-E,6'-octadienil)benzeno	Antioxidante	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006)
	 1,4-diidróxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z,6'-octadienil)benzeno		
	 1-metóxi-4-hidróxi-2(3',7-dimetil)-2E,6'-octadienilbenzene		

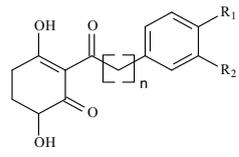
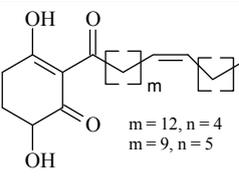
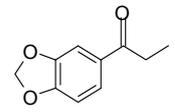
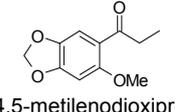
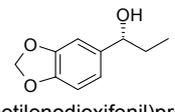
<i>Piper crassinervium</i>	 1,4-diidróxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-E,6'-octadienil)benzeno	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Danelutte <i>et al.</i> , 2003)
	 1,4-diidróxi-2-(7'-metil-3-metileno-1'-oxo-4', 7'-peróxido-octil)benzeno		
<i>Piper hostmannianum</i>	 hostmaniano	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2004)
Espécies	Amidas/alcalóides	Atividade biológica	Referências
<i>Piper arboreum</i>	 <i>N</i> -[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(E),9(Z)-pentadienoil]-pirrolidina	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Silva <i>et al.</i> , 2002)
	 arboreumina		
	 <i>N</i> -[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(E)-pentaenoil]-pirrolidina		
	 <i>N</i> -[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(E),9(E)-pentadienoil]-pirrolidina		
	 <i>N</i> -[10-(13,14-metilenodioxifenil)-pentaenoil]-pirrolidina		
<i>Piper hispidum</i>	 (3Z,5Z)- <i>N</i> -isobutil-8-(3',4'-metilenodioxifenil)-heptadienamida	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Navickiene <i>et al.</i> , 2000)
	 <i>N</i> -[3-(6'-metoxi-3',4'-metilenodioxifenil)-2(Z)-propenoil]pirrolidina		
	 <i>N</i> -[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(Z),4(Z)-heptadienoil]pirrolidina	Antifúngica contra <i>C. sphaerospermum</i>	(Alecio <i>et al.</i> , 1998)

<i>Piper hoffmaseggianum</i>	 <p>R=H, hoffmannseggiamida A R=Ac, hoffmannseggiamida B</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Marques <i>et al.</i> , 2007)
<i>Piper nigrum</i>	 <p>piperina</p>	Inibição do sistema nervoso central, inseticida, antitérmica, analgésica e antiinflamatória.	(Parmar <i>et al.</i> , 1997; Scott <i>et al.</i> , 2008)
<i>Piper scutifolium</i>	 <p>R=H, scutifoliamida A R=Ac, scutifoliamida B</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Marques <i>et al.</i> , 2007)
<i>Piper tuberculatum</i>	 <p>4,5-diidropiperlonguminina</p>	Inseticida contra <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Anticarsia gemmatilis</i>	(Navickiene <i>et al.</i> , 2003)
	 <p>pellitorina</p>	Antifúngica Inseticida contra <i>Apis mellifera</i> e <i>Anticarsia gemmatilis</i>	(Miranda <i>et al.</i> , 2003; Navickiene <i>et al.</i> , 2003; Navickiene <i>et al.</i> , 2007)
	 <p>$\Delta^{\alpha,\beta}$-diidropiperina</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Silva <i>et al.</i> , 2002)
	 <p>piplartina</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Navickiene <i>et al.</i> , 2000; Silva <i>et al.</i> , 2002)
	 <p>diidropiplartina</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Silva <i>et al.</i> , 2002)
	 <p>cis-piplartina</p>		
	 <p>fagaramida</p>		
	 <p>N-(12,13,14-trimetóxiidrocinnamoil)-Δ^3-piridin-2-ona</p>	Antifúngica contra <i>C. sphaerospermum</i>	(Navickiene <i>et al.</i> , 2000)
	 <p>5,6-diidropiperlonguminina</p>		

Espécies	Cromenos	Atividade biológica	Referências
<i>Peperomia serpens</i>	 <p>ácido 5-hidróxi-8-(3'-metil-2'-butenil)-2,2,7-trimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	Antifúngica fraca contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Kitamura <i>et al.</i> , 2006)
<i>Peperomia villipetiola</i>	 <p>R₁ = Me, R₂ = H, R₃ = Ac, 5-acetoximetanol-7-hidróxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p> <p>R₁ = R₃ = H, R₂ = Me, ácido 5-metanol-7-metóxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Salazar <i>et al.</i> , 2005)
<i>Piper aduncum</i>	 <p>R₁ = R₂ = H, ácido 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p> <p>R₁ = Me, R₂ = , 2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p> <p>R₁ = Me, R₂ = H, 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p> <p>R₁ = Me, R₂ = OH, 8-hidróxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p>	Antitumoral fraca contra linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Baldoqui <i>et al.</i> , 1999)
<i>Piper aduncum</i>	 <p>R = OH, 8-hidróxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila</p> <p>R = , 2,2-dimetil-8-(3-metilbut-2-enil)-2H-cromeno-6-carboxilato de metila</p>	Tripanocida	(Batista Jr <i>et al.</i> , 2008)
<i>Piper gaudichaudianum</i>	 <p>ácido (2S)-2-metil-8-(3-metilbut-2-enil)-2-(4-metilpent-3-enil)-2H-cromeno-6-carboxílico</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2004)
<i>Piper Ihotzkyanum</i>	 <p>R = , ácido 2-metil-2-[4'-metil-3'-pentenil]-2H-1-benzopiran-6-carboxílico</p> <p>R = CH₃, ácido 2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2007)

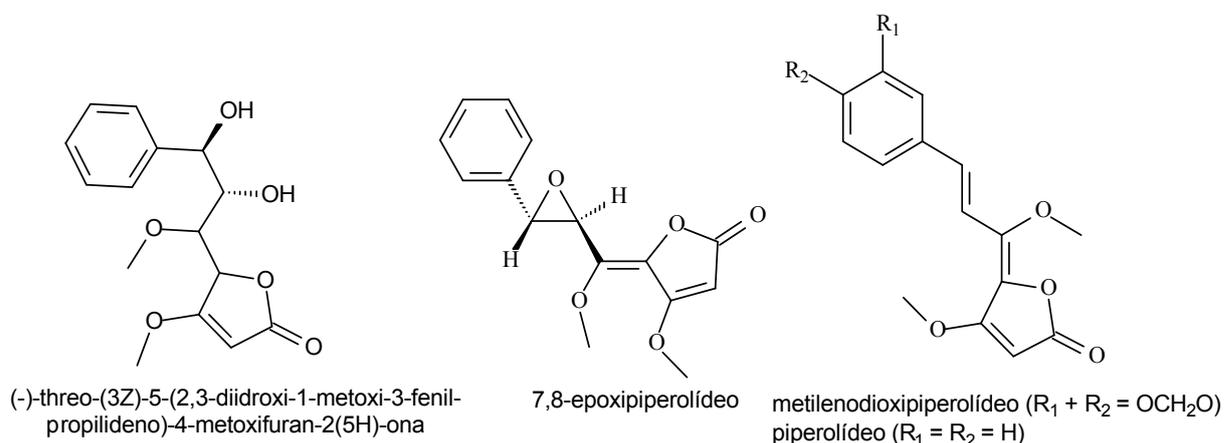
Espécies	Flavonóides/Chalconas	Atividade biológica	Referências
<i>Piper aduncum</i>	 <p>2',6'-diidróxi-4'-metoxichalcona</p>	Contra <i>Leishmania amazonensis</i>	(Torres-Santos et al., 1999)
<i>Piper lhotzkyanum</i>	 <p>7-metóxi-5,4'-diidróxiflavanona</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Lago et al., 2007)
<i>Piper marginatum</i>	 <p>5,4'-diidróxi-7-metoxiflavanona</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Reigada et al., 2007)
	 <p>5,7-diidróxi-4'-metoxiflavanona</p>		
Espécies	Lignanas	Atividade biológica	Referências
<i>Peperomia blanda</i>	 <p>R=H, <i>rel</i> - (7<i>R</i>, 8<i>S</i>, 7'<i>S</i>, 8'<i>S</i>)-4-hidróxi-4',5'-metilenedioxi-3,5,3'-trimetóxi-7,7'-epoxilignana</p> <p>R=CH₃ <i>rel</i>-(7<i>R</i>, 8<i>S</i>, 7'<i>S</i>, 8'<i>S</i>)-4',5'-metileno-dioxi-3,4,5,3'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana</p>	Tripanocida	(Felippe et al., 2008)
	 <p><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>S</i>,7'<i>S</i>,8'<i>S</i>)-4'-hidróxi-3,4,5,3',5'-pentametóxi-7,7'-epoxilignana</p>		
	 <p><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>S</i>,7'<i>S</i>,8'<i>S</i>)-4,5,4',5'-dimetilenedioxi-3,3'-dimetóxi-7,7'-epoxilignana</p>		
	 <p><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>S</i>,7'<i>S</i>,8'<i>S</i>)-9-hidróxi-4',5'-metilenedioxi-3,4,5,3'-tetrametóxi-7,7'-epoxilignana</p>		

<i>Piper solmsianum</i>	 <p>grandisina</p>	Tripanocida	(Martins <i>et al.</i> , 2003)
	 <p><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>R</i>,7'<i>R</i>,8'<i>R</i>)-3',4'-metilendioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana</p>		
	 <p><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>R</i>,7'<i>R</i>,8'<i>R</i>)-3,4,3',4'-dimetilendioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana</p>		
<i>Piper cubeba</i>	 <p>hinokinina</p>	tripanocida	(Souza <i>et al.</i> , 2005)
Espécie	Pironas	Atividade biológica	Referências
<i>P. methysticum</i>	 <p>cavaína</p>	Antitrombótica Atenuação da contratilidade vascular	(Gleitz <i>et al.</i> , 1997; Martin <i>et al.</i> , 2002)
	 <p>metisticina</p>	Antagônica sobre a estricnina	(Kretschmar <i>et al.</i> , 1970)
Espécie	Policetídeos	Atividade biológica	Referências
<i>Peperomia duclouxii</i>	 <p>$R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$, $n = 14$, surinona A $R_1 = R_2 = \text{H}$, $n = 12$, oleiferinona</p>	Citotóxica contra células WI-38, VA-13 e HepG2.	(Li <i>et al.</i> , 2007)

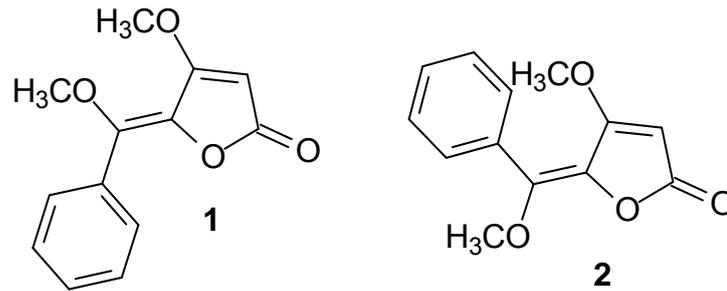
<i>Peperomia sui</i>	 <p>$R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$, $n = 14$, surinona A</p>	Citotóxica contra células cancerígenas HONE-1 e NUGC-3.	(Cheng <i>et al.</i> , 2003)
	 <p>$m = 12, n = 4$ $m = 9, n = 5$</p> <p>$m = 12, n = 4$, surinona C $m = 9, n = 5$, peperomina B</p>		
Espécie	Propiofenonas	Atividade biológica	Referências
<i>Piper marginatum</i>	 <p>3,4-metilenedioxipropiofenona</p>	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Reigada <i>et al.</i> , 2007)
	 <p>2-metoxi-4,5-metilenedioxipropiofenona</p>		
	 <p>1-(3,4-metilenedioxifenil)propan-1-ol</p>		
Espécie	Óleos essenciais	Atividade biológica	Referências
<i>Piper aduncum</i>	folhas	Baixa toxicidade	(Sousa <i>et al.</i> , 2008a)
<i>P. aduncum</i> e <i>P. tuberculatum</i>	frutos	Antifúngica contra <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	(Navickiene <i>et al.</i> , 2006)
<i>Piper callosum</i> , <i>P. marginatum</i> e <i>P. enckea</i>	folhas	Antifúngica contra <i>Crinipellis perniciosa</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> e <i>Phytophthora capsici</i>	(Silva e Bastos, 2007)
<i>P. dilatatum</i>	folhas	Antifúngica contra <i>Crinipellis perniciosa</i>	
<i>Piper gaudichaudianum</i>	frutos	Atraente de morcegos <i>Carollia Perspicillata</i>	(Mikich <i>et al.</i> , 2003)
<i>Piper guineense</i>	frutos	Antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Oyedeji <i>et al.</i> , 2005)

<i>Piper regnellii</i> e <i>P. cernuum</i>	folhas	Antifúngica contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	(Costantin <i>et al.</i> , 2001)
<i>Piper solmsianum</i>	folhas	Depressivo do sistema nervosa central	(Moreira <i>et al.</i> , 2001)

Uma classe de compostos encontrada raramente em algumas espécies de *Piper* são os piperólídeos. Foram isolados quatro deles de *Piper sanctum* (Parmar *et al.*, 1997; Mata *et al.*, 2004): (-)-*threo*-(3*Z*)-5-(2,3-diidroxi-1-metoxi-3-fenilpropilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona, 7,8-epoxipiperólídeo, metilendioxipiperólídeo e o piperólídeo.



Lago *et al.* (2005) isolaram dois metabólitos das folhas de *P. malacophyllum*, os piperólídeos **1** e **2**. Ambos apresentaram atividade antifúngica frente à *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Estes mesmos compostos também foram isolados das raízes (Pelter *et al.*, 1981) e folhas (Nair *et al.*, 1986) de uma espécie de *Piper* da Jamaica, *Piper fadyenii*, sendo que os autores sugerem que estes sejam derivados do ácido cinâmico (C_6C_3) e do acetato (C_2).



Segundo Pelter *et al.* (1987) os compostos metilenodioxipiperolídeo e o piperolídeo poderiam ser derivados da cavaína e metisticina, pironas produzidas por *Piper mesthysticum* (Bilia *et al.*, 2004). Os butenolídeos seriam produzidos por um processo de oxidação e rearranjo (Figura 5). Esta especulação foi reforçada devido ao isolamento e caracterização do provável precursor (+)-(5*S*,6*S*)-5-acetoxi-6-metoxicavaína, isolado de *P. fadyenolii* e *P. sanctum* (Pelter *et al.*, 1987).

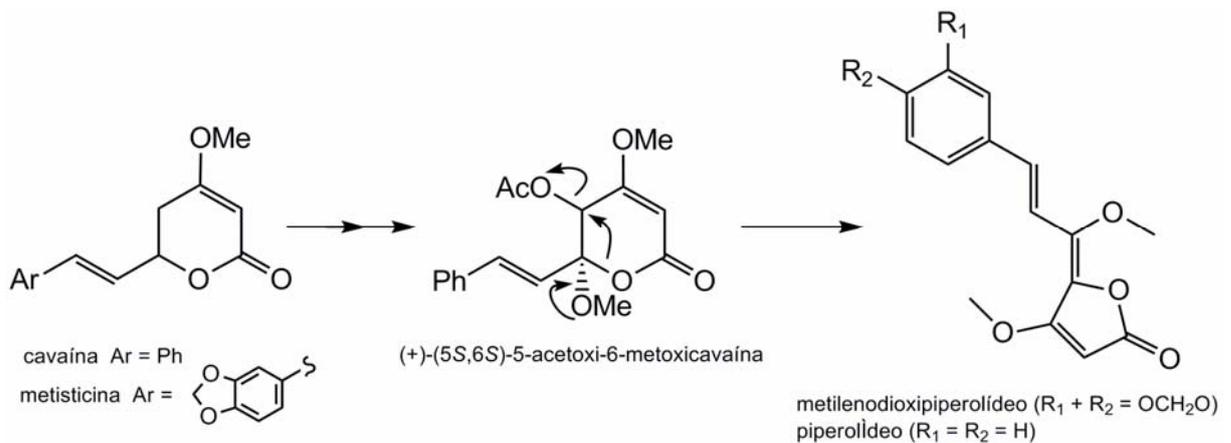


Figura 5. Proposta biogenética para a formação do metilenodioxipiperolídeo e do piperolídeo.

1.2. A espécie *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC.

A classificação da espécie foi publicada por Candolle (Candolle, 1869). Além disso, um único registro publicado refere-se ao estudo biomonitorado do extrato das folhas, no qual foram descritas a ocorrência de piperolídeos (Lago *et al.*, 2005).

A espécie *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. pertence ao gênero *Piper* da família Piperaceae e trata-se de um arbusto (Figura 6). A família Piperace pertence à ordem Piperales que está localizada no grupo Magnoliides.

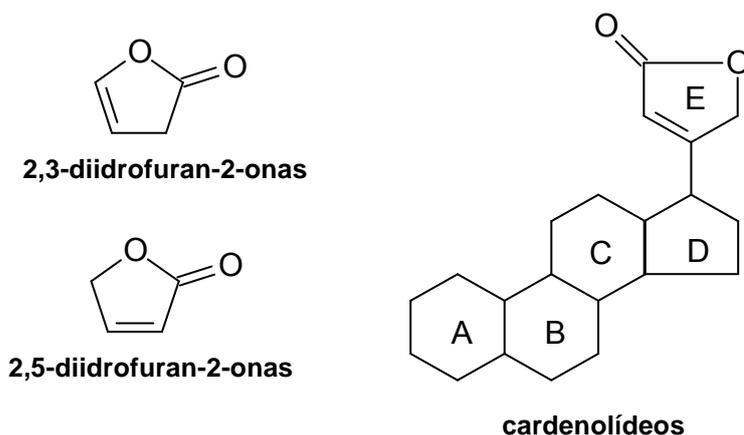


Figura 6. *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC.

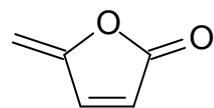
1.3. Piperolídeos

Estruturalmente são γ -alquilidenobutenolídeos, sendo que butenolídeos são γ -lactonas insaturadas que também podem ser considerados como os derivados

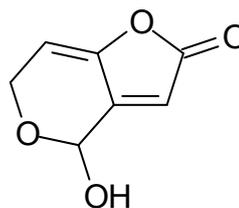
furânicos 2,3- e 2,5-diidrofuran-2-onas. Compostos deste tipo também são conhecidos como crotonolactonas. Muito do conhecimento atual sobre os butenolídeos foi obtido a partir de estudos com moléculas complexas como os cardenolídeos e outras γ -lactonas de ocorrência natural. Os cardenolídeos que são esteróides que possuem o anel "E" lactonizado, constituem-se numa interessante classe de butenolídeos naturais, sendo que muitas destas lactonas esteroidais ocorrem em plantas na forma de glicosídeos. Estes compostos mostram ação específica e eficiente no músculo cardíaco de humanos e de animais, portanto, propriedades que conferem a terminologia como cardenolídeos (Rao, 1964).



Dois dos primeiros γ -alquilidenobutenolídeos encontrados na natureza e que possuem estruturas mais simples foram a protoanemonina, isolado do extrato das folhas de *Anemone pulsatilla* (Baer *et al.*, 1946) e a patulina, isolado da cultura de *Penicillium patulum* (Woodward e Singh, 1949; Woodward e Singh, 1950; Boukouvalas e Maltais, 1995). Tais produtos despertaram interesse por apresentarem atividade antibiótica considerável contra uma variedade microorganismos, apesar do fato de apresentarem toxicidade aguda em mamíferos (Baer *et al.*, 1946; Zechner e Wohlmuth, 1954).



protoanemonina

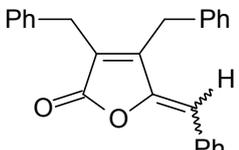
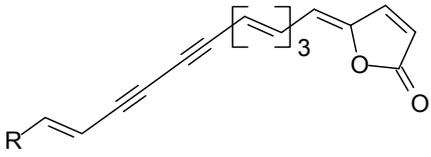
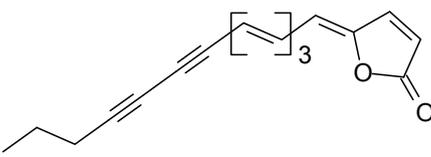
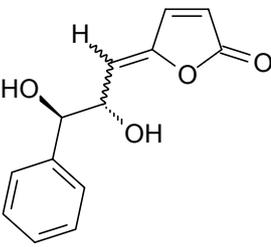
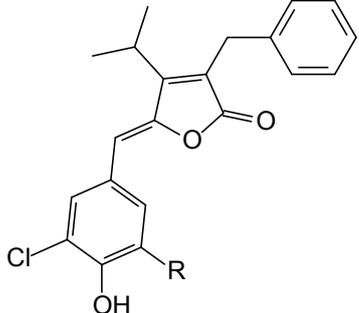


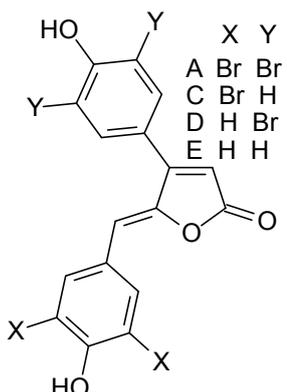
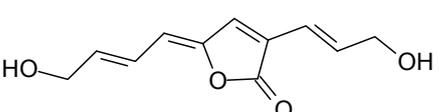
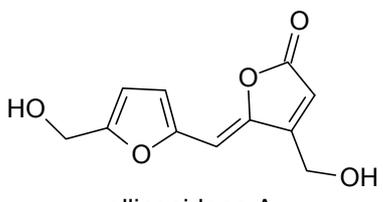
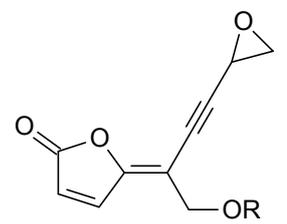
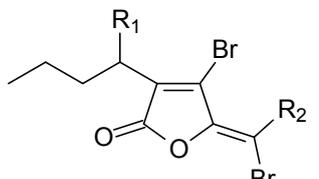
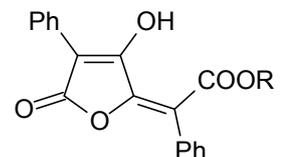
patulina

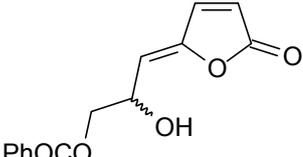
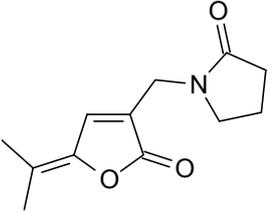
Durante as últimas décadas um número crescente de γ -alquilidenobutenolídeos tem sido isolados de fontes naturais, e muito desses compostos apresentam atividades biológicas (Tabela 2).

Como os γ -alquilidenobutenolídeos apresentam uma grande variabilidade de atividades biológicas, diversas estratégias sintéticas foram desenvolvidas para a síntese dos γ -alquilidenobutenolídeos, revisadas por Rao (1976), Negishi e Kotora (1997); e Bruckner (2001).

Tabela 2. Ocorrência natural de γ -alquilidenobutenolídeos bioativos.

Substâncias	Espécie	Atividade biológica	Referências bibliográficas
 <p>maculalactona B (Z) maculalactona C (E)</p>	<i>Kyrtuthrix maculans</i>	Citotoxicidade contra organismos marinhos	(Tsui <i>et al.</i> , 1996; Lee e Brown, 1998; Brown e Wong, 2004)
 <p>xerulina (R = Me) ácido xerulínico (R = COOH)</p>	<i>Xerula melanotricha</i>	Inibição da biossíntese do colesterol	(Kuhnt <i>et al.</i> , 1990; Siegel e Brückner, 1999; Negishi <i>et al.</i> , 2000; Fiandanese <i>et al.</i> , 2004; Boukouvalas <i>et al.</i> , 2007)
 <p>diidroxerulina</p>			
 <p>goniobutenolídeo A (Z) goniobutenolídeo B (E)</p>	<i>Goniothalamus giganteus</i>	Citotoxicidade contra células cancerígenas humanas	(Fang <i>et al.</i> , 1991; Xu e Sharpless, 1994; Ko e Lerpiniere, 1995; Shing <i>et al.</i> , 1995; Kotora e Negishi, 1996; Mukai <i>et al.</i> , 1996; Surivet e Vatéle, 1996b; Solladie <i>et al.</i> , 1999; Surivet e Vatéle, 1999)
 <p>nostoclídeo I (R = Cl) nostoclídeo I (R = H)</p>	<i>Peltigera canina</i>	Citotoxicidade contra cianobactérias e algas verdes	(Yang <i>et al.</i> , 1993; Boukouvalas <i>et al.</i> , 1994; Bellina e Rossi, 2002; Kar <i>et al.</i> , 2005; Barbosa <i>et al.</i> , 2006; Teixeira <i>et al.</i> , 2007b; Teixeira <i>et al.</i> , 2008)

 <p>rubrolídeos</p>	<p>X Y A Br Br C Br H D H Br E H H</p> <p><i>Ritterella rubra</i></p>	<p>Antibiótica</p>	<p>(Miao e Andersen, 1991; Kotora e Negishi, 1997; Boukouvalas <i>et al.</i>, 1998; Prim <i>et al.</i>, 1999; Ortega <i>et al.</i>, 2000)</p>
 <p>tetrenolina</p>	<p><i>Micropolyspora venezuelensis</i></p>	<p>Antibiótica</p>	<p>(Gallo <i>et al.</i>, 1969; Görth <i>et al.</i>, 1998)</p>
 <p>ellipsoidona A</p>	<p><i>Hemsleya ellipsoidea</i></p>	<p>Citotoxicidade contra sarcoma de Walker-256</p>	<p>(Hano <i>et al.</i>, 1997; Gogoi e Argade, 2006)</p>
 <p>aporpinona B (R = H) 1''-acetilaporpinona B (R = COCH₃)</p>	<p><i>Aporpium caryae</i></p>	<p>Antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i></p>	<p>(Levy <i>et al.</i>, 2003)</p>
 <p>fimbrolídeo (a): R1 = R2 = H fimbrolídeo (b): R1 = H, R2 = Br acetoxifimbrolídeo (c): R1 = OAc, R2 = H hydroxifimbrolídeo (d): R1 = OH, R2 = H</p>	<p><i>Delisea fimbriata</i></p>	<p>Antifúngica e antimicrobiana</p>	<p>(Kazlauskas <i>et al.</i>, 1977; Pettus <i>et al.</i>, 1977; Beechan e Sims, 1979; Caine e Ukachukwu, 1985; D. McCombs <i>et al.</i>, 1988; De March <i>et al.</i>, 1995; Wright <i>et al.</i>, 2006; Goh <i>et al.</i>, 2007; Haval e Argade, 2007; Zhu <i>et al.</i>, 2008)</p>
 <p>ácido pulvínico (R = H) ácido vulpínico (R = CH₃)</p>	<p>Vários líquens e fungos</p>	<p>Antimicrobiana e anti-inflamatória</p>	<p>(Schönberg e Sina, 1946; Zografos e Georgiadis, 2006; Bourdreux <i>et al.</i>, 2008)</p>

 melodorinol	<i>Melodorum fruticosum</i>	Citotoxicidade contra células tumorais humanas	(Jung <i>et al.</i> , 1991; Shen <i>et al.</i> , 1996; Lu <i>et al.</i> , 1997; Pohmakotr <i>et al.</i> , 1999; Ahmed <i>et al.</i> , 2006)
 uncinina	<i>Artabotrys uncinatus</i>	Citotoxicidade contra linhagem de células cancerígenas hepatocarcinoma	(Hsieh <i>et al.</i> , 2001; Fáková <i>et al.</i> , 2005)

Em termos gerais, as estratégias mais empregadas para a síntese destes compostos são baseadas em três rotas:

1) Alquilidação do composto heterocíclico pré-formado de cinco membros contendo oxigênio, como os 2-oxifuranos (Knight e Pattenden, 1975; Asaoka *et al.*, 1981; Boukouvalas *et al.*, 1994; Mukai *et al.*, 1996; Szlosek e Figadère, 2000; Bellina *et al.*, 2002; Velázquez e Olivo, 2002; Bang *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2008), γ -lactonas (Corrie, 1971; Asaoka *et al.*, 1981; Bella *et al.*, 2001; Harrowven *et al.*, 2001; Bellina *et al.*, 2002; Bourdreux *et al.*, 2008), e anidridos maléicos (Gara *et al.*, 1969; Ingham *et al.*, 1975; Begley *et al.*, 1978; Ito *et al.*, 1984; Li *et al.*, 2004) (Figura 7 e Figura 8);

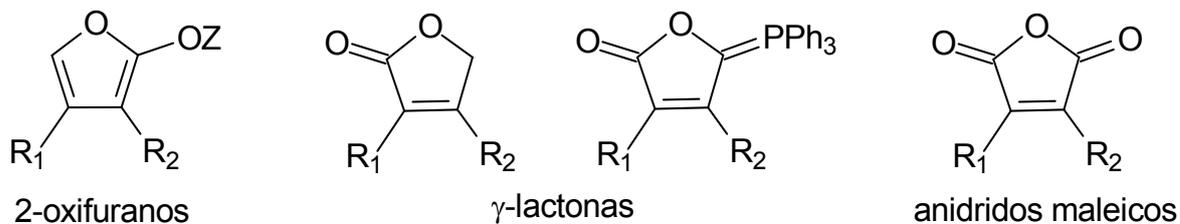


Figura 7. Alquilidação de heterocíclicos de cinco membros para a formação dos γ -alquilidenobutenólídeos.

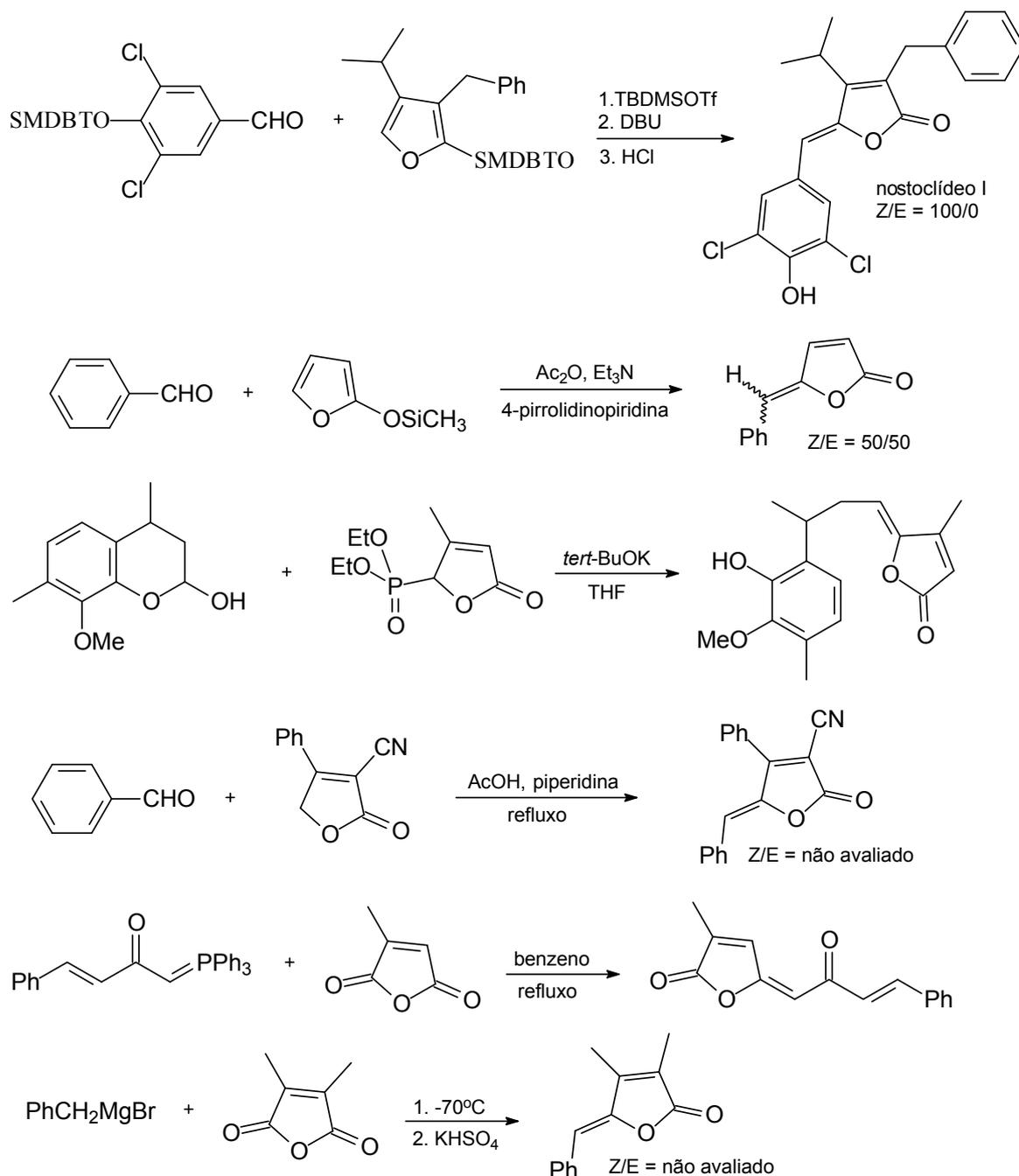


Figura 8. Exemplos de sínteses de γ -alquilidenobutenólídeos via alquilidação de compostos heterociclos de cinco membros contendo oxigênio.

2) Ciclização dos γ -hidroxiácidos (Mallaby e Ryback, 1972; Ito *et al.*, 1990; Ito, 1991; Llebaria *et al.*, 1993; Shing *et al.*, 1995; Negishi *et al.*, 1996a; Surivet e Vatèle, 1996a) e γ -oxoácidos (Shaw, 1946; Woodward e Singh, 1949; Woodward e Singh, 1950; Saalfrank *et al.*, 1983) ou seus equivalentes, como os complexos γ -

oxoacilpaládios (Uozumi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991; Ciattini *et al.*, 1993; Sugihara *et al.*, 1994; Coperet *et al.*, 1995; Negishi *et al.*, 1996b; Fáková *et al.*, 2005) (Figura 9);

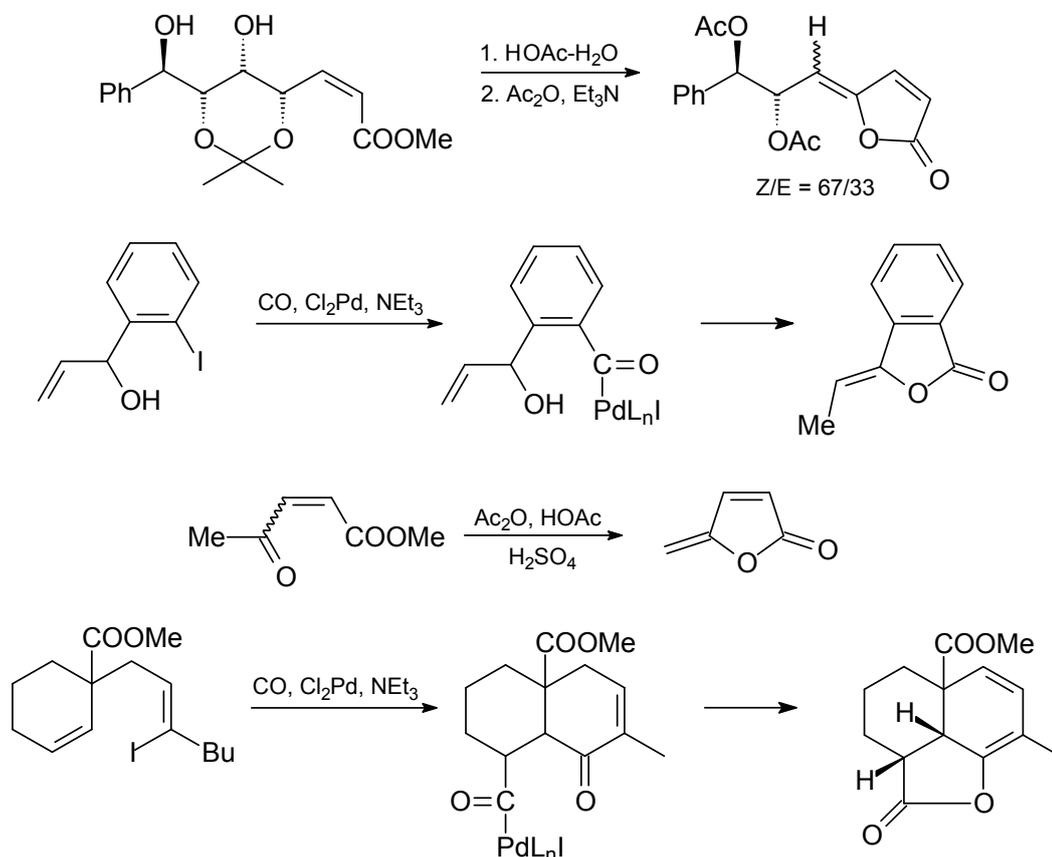


Figura 9. Exemplos de lactonização via γ -hidroxiácidos e γ -oxoácidos.

3) Lactonização via ácidos 4-alquenóicos (Larock e Hightower, 1993; Rousset *et al.*, 2000) e 4-alquinóicos (Bell *et al.*, 1958; Castañer e Pascual, 1958; Pale e Chuche, 1987; Rossi *et al.*, 1998a, b; Rossi *et al.*, 1998c; Rousset *et al.*, 1999; Negishi *et al.*, 2000; Bellina *et al.*, 2001b; Anastasia *et al.*, 2002; Rousset *et al.*, 2003; Duchêne *et al.*, 2007) (Figura 10).

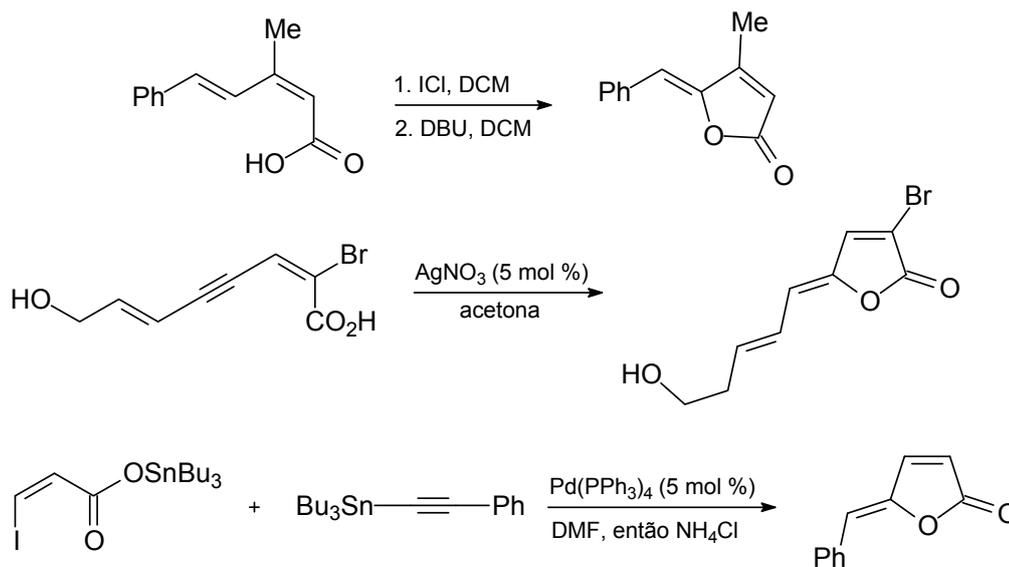


Figura 10. Exemplos de lactonização via 4-alquenóicos e 4-alquinóicos.

Nas duas primeiras estratégias, as reações de alquilidação não são estereosseletivas, produzindo misturas dos estereoisômeros E e Z na ausência de qualquer fator que anule a formação de um ou outro. Isto pode severamente limitar os rendimentos dos produtos e acarretar dificuldades nas suas separações (Sorg e Brückner, 2004; Sorg *et al.*, 2004; Fáková *et al.*, 2005). Um controle de seletividade tem sido obtido (Mukai *et al.*, 1996; Bruckner, 2001), através da preparação de butenolídeos γ -(1-heteroalquil)-substituídos diastereopuros, e subsequente eliminação *anti* estereoespecífica do grupo de partida localizado no C(1) do agrupamento alquila. Por outro lado, a terceira estratégia vem tornando-se popular nos últimos anos (Liu e Negishi, 1997; Rousset *et al.*, 1999; Negishi *et al.*, 2000; Vaz *et al.*, 2005) devido a sua estereosseletividade, bem como em função da disponibilidade comercial dos ácidos alquinóicos de partida.

1.4. Análise cromatográfica de butenolídeos em extratos de plantas

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica usada para a análise dos butenolídeos em plantas. Uma mistura de γ -hidroxibutenolídeos em extrato da casca do tronco de *Trichilia stipulata* (Cortez *et al.*, 2001) e alquilbutenolides de ocorrência em apiciae foram analisados e separados por CLAE (Werner e Hadacek, 1995).

A CLAE é considerada uma técnica bem estabelecida nos estudos fitoquímicos, devido à alta sensibilidade e variedade de métodos de detecção. Contudo, a CLAE tem como desvantagem principal o elevado custo dos consumíveis, incluindo colunas e o uso de grandes volumes de solventes, elevando os custos para eliminação (Marston, 2007).

A eletroforese capilar (CE) surgiu como uma ferramenta analítica alternativa e poderosa para a separação rápida da variedade de analitos. Esta técnica supera alguns dos inconvenientes da CLAE e tem como vantagens a alta eficiência da coluna, requerendo pequena quantidade de amostra e volumes de solventes com baixo custo de operação e consumíveis. Em quase todas as operações em CE soluções aquosas simples ou micelar são usadas como eletrólito de corrida (Tavares, 1997). O uso de micelas iônicas para a modificação do eletrólito em CE foi chamado de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) (Terabe *et al.*, 1984; Seifar *et al.*, 1997).

Na MEKC, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que

as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, que transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre estas duas fases é responsável pela seletividade da separação (Tavares, 1997).

Esta modificação provou ser eficaz na manipulação da seletividade da técnica. A maioria dos estudos em MEKC usa o dodecil sulfato de sódio (SDS) como formador de micela. Para se obter uma melhor performance utiliza-se a adição de outras substâncias ao tampão de análise como a ciclodextrina, sais de bile e solventes orgânicos (Ji *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1997). Os solventes orgânicos são capazes de influenciar o fluxo eletrosmótico (Ahuja e Foley, 1994; Sarmini e Kenndler, 1997), a estrutura das micelas (Verrall, 1995; Zana, 1995) e a interação soluto-micela (Vercammen *et al.*, 1998).

Cromatografia em camada delgada, CLAE, CG e CE são métodos úteis para a análise e quantificação de metabólitos secundários de plantas. Embora a CLAE seja bastante popular devido à alta precisão, reprodutibilidade e sensibilidade, sua aplicação possui alguns empecilhos como um adequado pré-tratamento das amostras para remover o material sólido residual e eliminar interferências que absorvem de modo irreversível na fase estacionária. A CE está se tornando cada vez mais reconhecida como uma técnica analítica de separação rápida e eficiente, com a limitação da reprodutibilidade e seletividade que a torna inferior a CLAE (Marston, 2007).

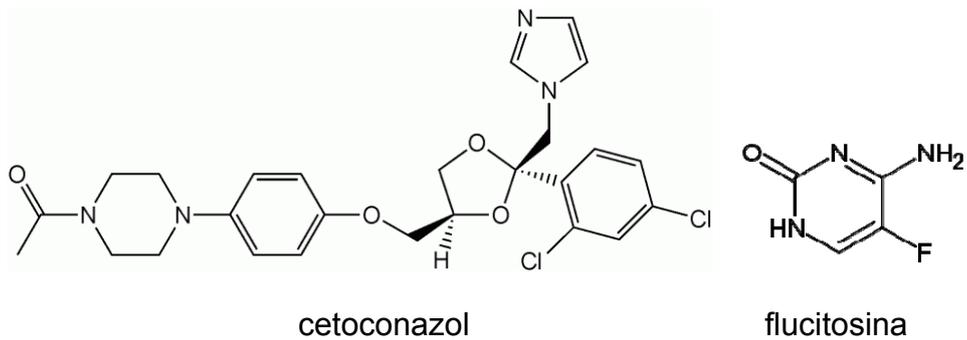
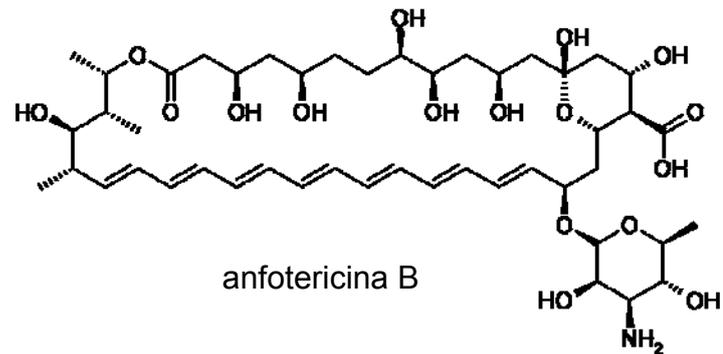
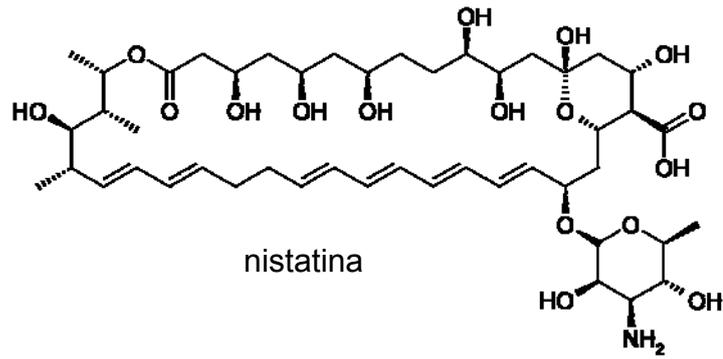
Muitas substâncias, incluindo fenóis, cumarinas, lignanas e flavonóides, têm sido analisadas de forma bem sucedida por esta técnica (Fonseca *et al.*, 2001; Fonseca e Tavares, 2004; Mandrioli *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005; Tonin *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2007).

1.5. Produtos naturais como antifúngicos e tripanocidas

Ao contrário de antibacterianos, onde 68% dos fármacos aprovados entre 1981-2002 são derivados de produtos naturais ou derivados semi-sintéticos, os antifúngicos correspondem apenas a 8%, sendo a maioria drogas sintéticas, normalmente uma modificação de um agente existente (Newman *et al.*, 2003).

As infecções fúngicas variam de condições superficiais da pele (por exemplo, micose e pé-de-atleta) e unhas (onicomicoses) para doenças potencialmente fatais. Infecções fúngicas invasivas graves causadas por *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Pneumocystis carinii* e *Histoplasma capsulatum*, representam uma ameaça crescente para a saúde humana. A preponderância destas infecções fúngicas sistêmicas aumentou significativamente durante a última década (Vicente *et al.*, 2003).

Até a década de 70 as infecções fúngicas foram consideradas tratáveis e a procura por novos medicamentos foi muito pequena. Antes deste período, a quimioterapia antifúngica incluía somente iodeto de potássio (eficaz no tratamento da esporotricose) e dois polienos (nistatina e anfotericina B). Com exceção do desenvolvimento da flucitosina (1964), novos fármacos só tiveram progresso com surgimento das drogas azólicas, como por exemplo, o cetoconazol em meados da década de 70. Por isso, apenas um número limitado de agentes antifúngicos (polienos e azóis) estão atualmente disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas potencialmente fatais (Vicente *et al.*, 2003; Martinez, 2006).



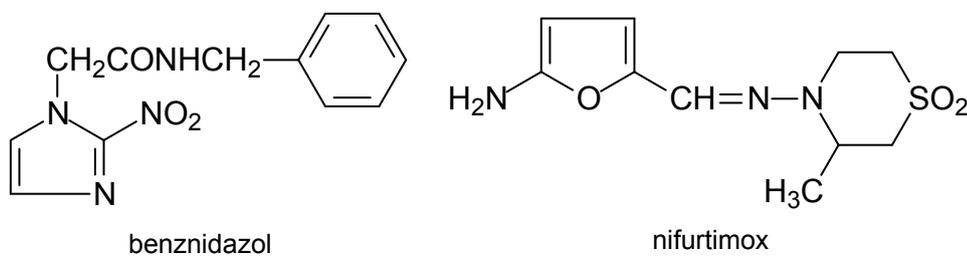
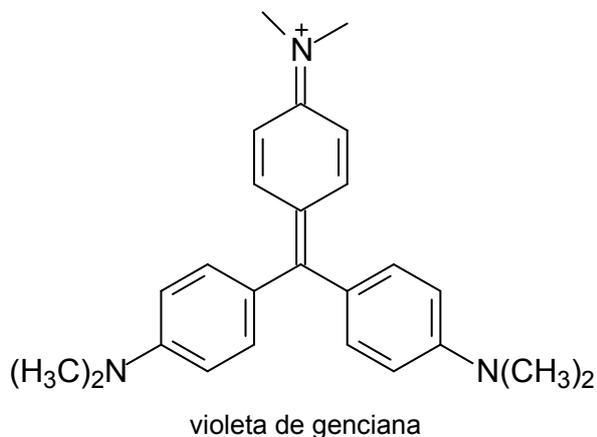
Recentemente, com o aumento de infecções fúngicas causadas por fungos como *Candida* e *Aspergillus*, e a resistência microbiana a uma série de antibióticos disponíveis no mercado estão motivando, novamente, as companhias farmacêuticas a investirem na busca por substâncias antifúngicas de fontes naturais (Newman *et al.*, 2003; Marqui *et al.*, 2008).

Outra doença na qual os produtos naturais podem ser de grande importância na descoberta novos fármacos, é a doença de Chagas. Esta é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo uma das mais graves endemias do Brasil

(Ambrozin *et al.*, 2008). Ela é muito comum em regiões de florestas tropicais, sendo endêmica em 21 países, com cerca de 16-18 milhões de indivíduos infectados e com mais de 100 milhões de pessoas em risco (Molfetta *et al.*, 2005; Pozas *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2008). Atualmente, a principal forma de transmissão da doença de Chagas em áreas urbanas é através da transfusão de sangue contaminado, cujo risco é de 20% (Schmunis, 1999). Esse tipo de transmissão adquiriu especial relevância em regiões que não possuem o vetor, mas que recebem imigrantes de áreas afetadas. Outra forma de transmissão da doença ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de seus dejetos. Também pode ocorrer através da ingestão de carne crua, de caça mal cozida ou de alimentos contaminados por urina ou secreção anal de marsupiais infectados, ou mesmo por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (Dias, 2006).

Apesar da diminuição das taxas de prevalência e incidência da infecção pelo *T. cruzi*, a doença de Chagas permanece um obstáculo para a saúde e para o desenvolvimento econômico na América Latina, especialmente para a população rural pobre (Medrano *et al.*, 2003). A violeta de genciana é o único agente empregado na quimioprofilaxia de sangue destinado a esse fim. No entanto, existem algumas restrições ao seu uso, pois este corante triarilmetânico confere ao sangue uma coloração púrpura, podendo manchar pele e mucosas, causar a microaglutinação e a aglomeração dos eritrócitos, além de apresentar propriedades mutagênicas (Ramirez *et al.*, 1995). Os medicamentos benznidazol e nifurtimox têm demonstrado ter uma eficácia no tratamento de casos agudos e indeterminados da doença. No entanto, atualmente não existe nenhuma droga disponível recomendada

para pacientes com cardiomiopatia ou uma das megasíndromes (megacólon ou megaesôfago) (Medrano *et al.*, 2003).



Devido à ampla distribuição geográfica desta doença, à falta de tratamento eficaz e seguro, e às graves manifestações clínicas que ocasiona a procura de novas substâncias para a profilaxia e/ou tratamento desta endemia se faz necessária. Neste contexto, as plantas são valiosas fontes de novos compostos ativos e com baixa toxicidade (Newman e Cragg, 2007; Lang *et al.*, 2008).

1.6. Emprego de produtos naturais e sintéticos no desenvolvimento de fármacos

Quando a química sintética moderna nasceu em meados do século XIX, a natureza já vem gerando uma enorme variedade de substâncias por milhões de

anos. Pelo fato de muitas dessas substâncias se associaram a um organismo para conduzir uma vantagem que garantam sua sobrevivência em um ambiente hostil, a porcentagem de substâncias biologicamente ativas na natureza é relativamente elevada em relação a substâncias de origem sintética (Tietze *et al.*, 2003).

Aproximadamente 60% da população mundial possuem uma grande dependência das plantas para diversos tratamentos e os produtos naturais têm sido reconhecidos por muito tempo como uma fonte importante de medicamentos terapêuticos eficazes (Cragg *et al.*, 1997; Butler, 2004; Lee, 2004; Newman e Cragg, 2007; Lang *et al.*, 2008). Fármacos derivados de produtos naturais estão bem representados entre os 35 produtos de fármacos mais vendidos em 2000, 2001 e 2002. O percentual de fármacos derivados de produtos naturais era de 40% em 2000 e permaneceu constante em aproximadamente 24% em 2001 e 26% em 2002 (Figura 11.). Portanto, fármacos derivados de produtos naturais além de serem comprovados como uma fonte importante para conduzir a medicamentos, também contribuem significativamente para a lucratividade de muitas empresas (Butler, 2004). Além disso, muitos produtos naturais são de grande valor agregado devido às suas aplicações em produtos cosméticos e como agroquímicos (Pinto *et al.*, 2002).

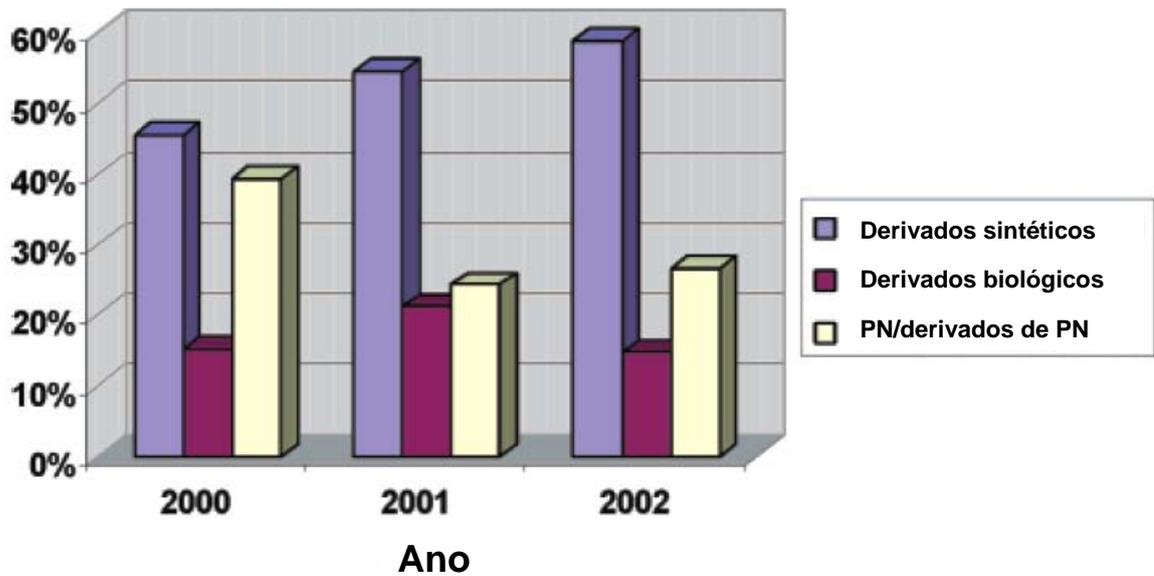


Figura 11. Porcentagem de fármacos de produtos naturais (PN), derivados de PN, derivados biológicos e derivados sintéticos no top 35 mundial de vendas de fármacos de 2000, 2001 e 2002 (Butler, 2004).

Dados mercadológicos recentes também evidenciam a importância dos produtos naturais. Dos vinte medicamentos não-protéicos mais vendidos em 1999, nove foram derivados ou desenvolvidos como o resultado de pesquisas geradas a partir de produtos naturais, como a lovastatina, a sinvastatina, o captopril, o enalapril, a amoxicilina, a fenoximetilpenicilina e o taxol (Figura 12). As vendas anuais destes medicamentos ultrapassaram os US\$ 16 bilhões (Harvey, 2000).

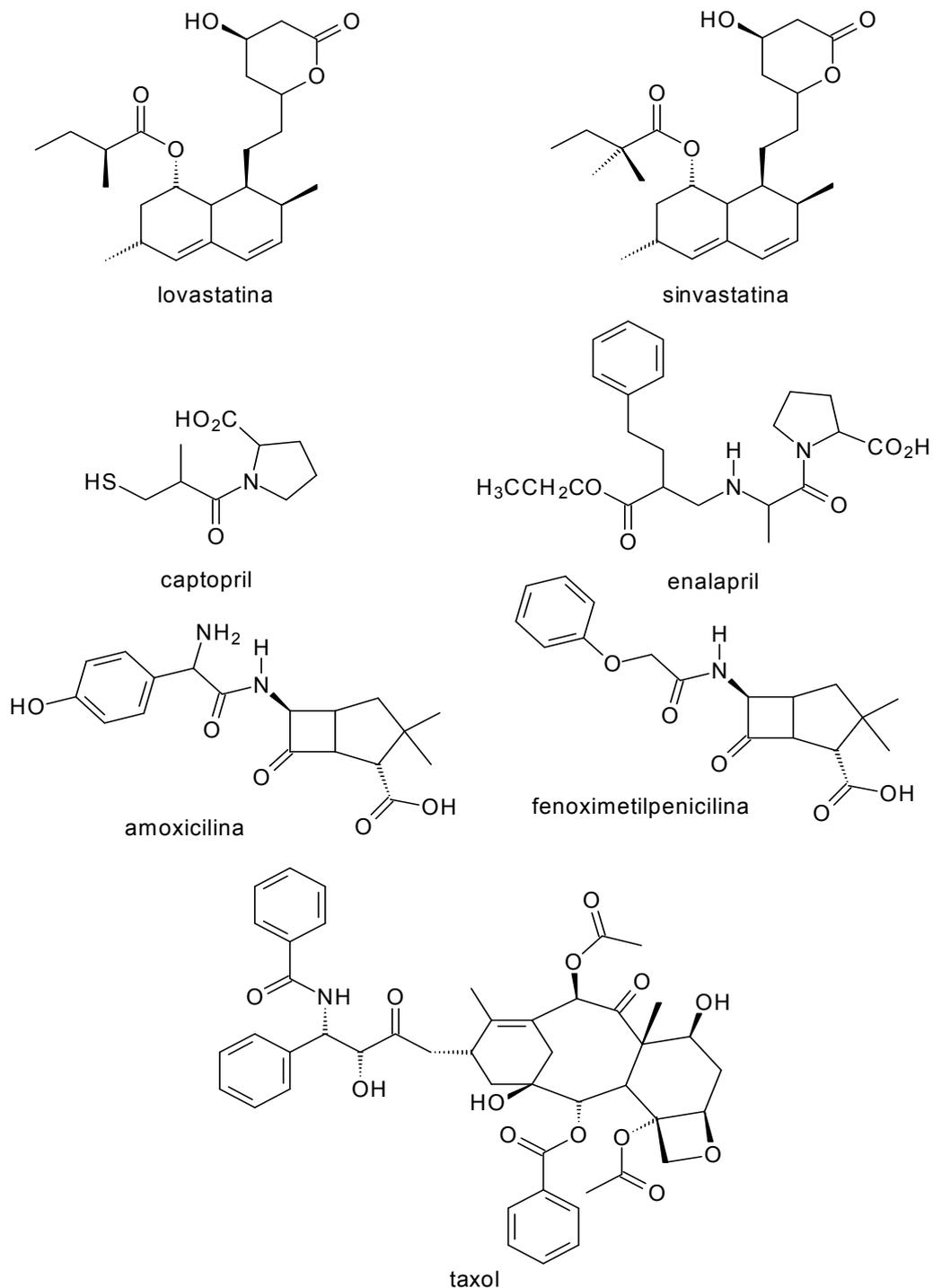
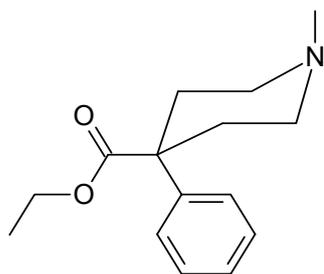


Figura 12. Estruturas de alguns medicamentos mais vendidos recentemente derivados de produtos naturais.

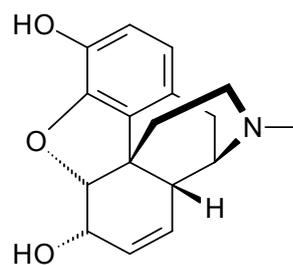
Em função da importância comercial ou da baixa disponibilidade natural, muitos produtos naturais têm-se constituído em desafios para químicos sintéticos. Algumas espécies vegetais tornaram-se ameaçadas devido a um excesso de coleta

na natureza ou seu custo. Em outros casos a extração e isolamento apresentam custos elevados para a comercialização (Newman e Cragg, 2007).

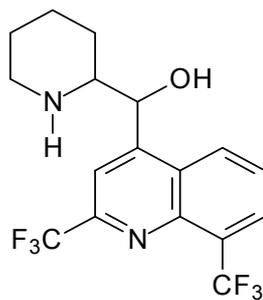
Durante muitos anos, produtos naturais têm sido utilizados como modelos para a síntese de novos fármacos e existem inúmeros exemplos de drogas sintéticas que têm por base a estrutura de uma molécula do produto natural (Newman e Cragg, 2007). O conhecimento do mecanismo da atividade biológica destes compostos, bem como a potencialização da atividade dos mesmos evolui com a síntese e ensaios biológicos de novos compostos que sejam análogos estruturais da molécula considerada modelo ou protótipo (Cechinel Filho e Yunes, 1998). O efeito destas alterações estruturais sobre a atividade biológica pode ser avaliado qualitativamente por estudos de relação estrutura-atividade (Kawamura *et al.*, 1992). Além disso, análogos sintéticos podem ser preparados com tentativas de melhorar a solubilidade em água e o perfil de segurança farmacológico (Lipinski *et al.*, 1997). Como exemplos de compostos análogos têm-se o analgésico petidina cujo desenvolvimento foi baseado na estrutura da morfina e o antimalárico mefloquina na quinina (Phillipson, 2007).



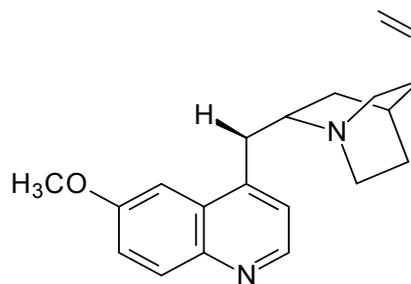
petidina



morfina



mefloquina



quinina

A química combinatória moderna permite a síntese de milhares de novos compostos em um tempo relativamente curto. Estas bibliotecas podem ser avaliadas pela sua atividade biológica utilizando técnicas de "high-throughput screening (HTS)" (Gershell e Atkins, 2003; Lima, 2007). No entanto, o sucesso dessas abordagens puramente aleatórias não está sendo muito pronunciado, que pode ser devido à falta de novas entidades químicas (NCEs) com alta diversidade. Tendo isto em mente, a próxima etapa deveria ser aproveitar a diversidade estrutural presente na natureza, e através da combinação de dois ou mais produtos naturais para formar um híbrido (Tietze *et al.*, 2003).

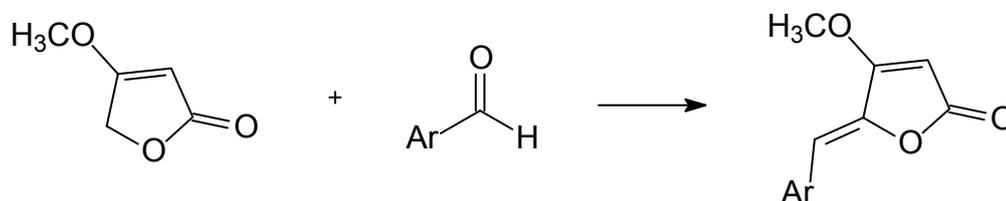
2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a investigação dos metabólitos secundários de *Piper malacophyllum* nas diversas partes da planta, bem como quantificar os piperolídeos [4,6-dimetóxi-5-*E*-fenilbutenolídeo (1) e 4,6-dimetóxi-5-*Z*-fenilbutenolídeo (2)] e sintetizar compostos análogos objetivando o estudo das atividades biológicas.

Entre os objetivos específicos incluem-se:

- Isolar e caracterizar os principais metabólitos, incluindo os piperolídeos 1 e 2, e as substâncias minoritárias das folhas de *Piper malacophyllum*. Como a literatura não apresenta dados sobre estudos dos constituintes químicos presentes nas raízes, caules, frutos e óleo essencial de *Piper malacophyllum*, objetivou-se também estabelecer um protocolo por cromatografia gasosa para caracterizar tais constituintes, e através dos compostos identificados estabelecer relações biossintéticas entre os metabólitos secundários isolados de *Piper malacophyllum* e outras espécies de *Piper*.
- Desenvolver um método rápido, simples, específico, exato e preciso para a determinação e quantificação dos piperolídeos, uma vez que não há estudos via cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) na literatura.
- Sintetizar uma série de compostos análogos aos piperolídeos isolados de *P. malacophyllum*, visto que membros desta classe de compostos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas. Este estudo foi realizado

modificando-se o padrão de substituição do anel aromático, para avaliar a influência destas alterações sobre as atividades biológicas estudadas.



Ar = 3-bromofenila
Ar = fenila
Ar = 1,3-benzodioxolila
Ar = 4-bromofenila
Ar = 4-clorofenila
Ar = 4-(dimetilamino)fenila
Ar = 4-nitrofenila
Ar = 4-metoxifenila
Ar = 3-metoxifenila
Ar = 3-metilfenila
Ar = 2-metilfenila
Ar = 4-[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi-3-iodo-5-metoxifenila
Ar = 4-[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi-3,5-dimetoxifenila
Ar = 4-hidroxi-3,5-metoxifenila

- Avaliar a atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e contra *Trypanosoma cruzi* dos compostos análogos aos piperolídeos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades metodológicas

Os solventes utilizados nas extrações e nas eluições das colunas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados segundo os procedimentos usuais (Vogel, 1988). Para as análises cromatográficas em CLAE, CG e CE foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck e Tedia S/A). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi obtido da Riedel-de Haën (Seelze, Germany), tetraborato de sódio decaidratado e o hidróxido de sódio da Merck (Darmstadt, Germany). A água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para os ensaios biológicos e síntese dos compostos foram utilizados reagentes de grau P.A. Os solventes utilizados foram devidamente secos por refluxo sobre um agente secante, destilados e armazenados sobre peneira molecular e atmosfera de nitrogênio, de acordo com os procedimentos descritos (Armarego e Chai, 2003).

Para o experimento de administração de precursores radioativos foram utilizados acetato de sódio-[1-¹⁴C] (0,75 mCi mL⁻¹ e 39 mCi mmol⁻¹) e *L*-fenilalanina-[U-¹⁴C] (0,1 mCi mL⁻¹ e 400 mCi mmol⁻¹), ambos da Sigma.

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizadas sílica gel do tipo 60, partículas 63-200 μm e para tipo “flash”, sílica gel 60 com partículas de 40-63 μm.

As placas de CCDP foram confeccionadas utilizando sílica 60GF₂₅₄ (5-40 μm). Estas placas foram preparadas aplicando uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador “Quickfit”, regulado pra produzir camadas de 1,00 mm de espessura. Para CCDC, foram utilizadas placas

comerciais de sílica gel 60 F₂₅₄ para cromatografia de camada fina, sobre suporte de alumínio.

As placas de CCDC foram reveladas com aspensão de solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico 2 mol L⁻¹ (2% m/v) e solução de vanilina (5,1 g de vanilina, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 800 mL de etanol) sobre as mesmas, após terem sido observadas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm). As placas preparativas foram visualizadas sob radiação ultravioleta (254 e 365 nm).

As fases orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida em um evaporador rotatório.

As análises em CLAE foram obtidas em um sistema Shimadzu composto por duas bombas analíticas modelo LC-10AD conectadas a um detector de ultravioleta modelo SPD-M10A Diode Array, controlados por um módulo de comunicação SCL-10A e tratados pelo programa de computador CLASS-VP versão 6.10.

Para as análises em cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo gasoso HP-5890 Série II, com injetor automático de divisão de fluxo (Split), detector por ionização de chama (FID) e integrador HP-3396A. Foi utilizada coluna de polaridade média HP-5MS (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm. i.d., 0,25 µm).

Os experimentos de eletroforese foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar da Beckman PACE/MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos. Detecção a 308 nm e controle de temperatura mantido a 22°C. Um software para aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante do equipamento (32 KaratTM Software v 8.0) foi usado na integração e análise dos dados. As amostras foram introduzidas no capilar via injeção hidrodinâmica por aplicação de 0,5 psi por 3s (1 psi = 6894,76 Pa). O

instrumento foi operado em polaridade positiva (injeção no fim do capilar). Uma voltagem constante de +25 kV foi usada em todos os experimentos.

Os espectros no infravermelho foram obtidos por meio de pastilhas de KBr, solução ou filme em espectrômetro Bomem MB100.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker AC200, Varian Gemini 2000, Bruker DPX300, Bruker DRX500 operando a 200, 200, 300 e 500 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) são expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram medidos a 70 eV em um espectrômetro CGEM SHIMADZU modelo GCMS-QP5050A, equipado com coluna capilar DB5 (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 m. i.d., 0.25 μ m).

3.2. Metabólitos secundários de *P. malacophyllum*

3.2.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal da espécie *P. malacophyllum* foi coletada no Parque Estadual de Intervales (Instituto Florestal do Estado de São Paulo) e em Guaraqueçaba no estado do Paraná (Tabela 3). Coletaram-se estacas para a manutenção de espécimes vivos nas estufas do IQUSP. Os espécimes em estudo foram identificados pela Profa. Dr^a Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

Tabela 3. Material vegetal coletado da espécie *P. malacophyllum*

Espécie	Exsicatas	Parte da planta
<i>Piper malacophyllum</i>	K-447 ^a	Folhas, frutos, raízes e frutos
	K-448 ^a	Folhas
	K-449 ^a	Folhas
	K-450 ^a	Folhas
	K-646 ^b	Folhas
	K-858 ^c	Folhas
	K-882 ^c	Folhas
	K-883 ^c	Folhas
	K-884 ^c	Folhas

^a Coletadas no Parque Estadual de Intervales (Instituto Florestal do Estado de São Paulo) em novembro de 2004; ^b Coletada no Parque Estadual de Intervales (Instituto Florestal do Estado de São Paulo) em novembro de 2005; ^c Coletadas em Guaraqueçaba no estado do Paraná em janeiro de 2007.

3.2.2. Metabólitos secundários das folhas de *P. malacophyllum*

3.2.2.1. Obtenção do extrato

As folhas (K-447) foram secadas ao ar livre e depois em estufa a temperatura de 50 °C, e posteriormente moídas em moinho de facas, obtendo-se 93,0 g de material seco. Este material foi extraído exaustivamente por dois dias com metanol (300 mL por vez) a frio. Após a extração, os solventes foram concentrados à pressão reduzida, em evaporador rotatório, tendo sido obtido 10,5 g de extrato bruto.

3.2.2.2. Eliminação da clorofila

O extrato metanólico (10,3 g) das folhas de *P. malacophyllum* foi dissolvido em 400 mL de MeOH e em seguida foram adicionados 100 mL de água destilada, provocando a precipitação de clorofilas. Este material foi submetido a uma coluna

filtrante de celite compactada a vácuo (Fernandes *et al.*, 1997). Foram obtidas quatro frações de 500 mL, sendo duas compostas por uma solução aquosa de metanol 80% (M1 e M2), uma com metanol (M3) e a última com acetona (M4). As frações M1 e M2 foram concentradas em evaporador rotatório para aproximadamente 200 mL e, em seguida, submetidas a partições sucessivas com diclorometano (3x200 mL). As frações orgânicas obtidas neste processo foram secadas com sulfato de sódio anidro, filtrados, e em seguida, os solventes foram evaporados a pressão reduzida em evaporador rotatório (Figura 13). As frações M1, M2 e M3 foram analisadas por CLAE (Figura 17).

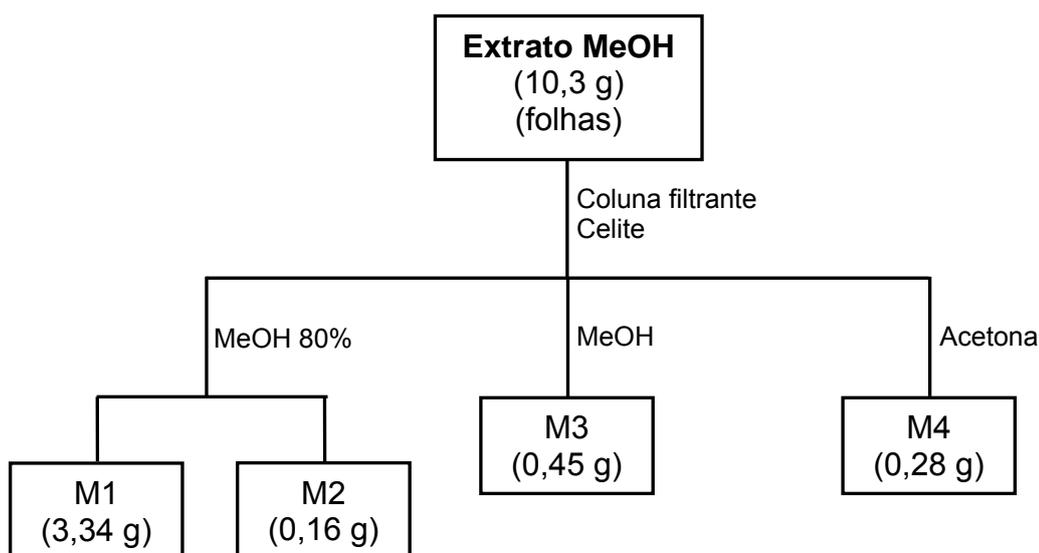


Figura 13. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *P. malacophyllum*.

3.2.2.3. Fracionamento cromatográfico

De modo geral, os métodos utilizados para a separação de substâncias de baixa e média polaridade foram à cromatografia de adsorção em sílica gel e a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Em alguns casos foi

utilizada cromatografia rápida em sílica gel (“flash”). Em todos os casos as separações foram monitoradas por CCDC.

A seguir estão representados sob forma de fluxogramas os fracionamentos cromatográficos realizados com a fração M1, obtida após tratamento do extrato metanólico com celite. A fração M1 inicialmente foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna empacotada com sílica gel 60 (63-200 μm), eluída a baixa pressão com mistura de solventes em gradiente de polaridade (hexano/AcOEt) (Figura 14). A fração M1/5 forneceu uma mistura dos isômeros dos butenólídeos **1** e **2**. Desta fração, 50 mg foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa utilizando-se com fase móvel hexano:DCM (1:2). A escolha da fase móvel foi realizada através do monitoramento por CCDC. Após a eluição da placa, esta foi visualizada no ultravioleta e os compostos de interesse separados. Foram obtidas 30 mg do (5*E*)-4-metoxi-5-[metoxi(fenil)metileno]-furan-2(5*H*)-ona (**1**) e 18,3 mg do (5*Z*)-4-metoxi-5-[metoxi(fenil)metileno]-furan-2(5*H*)-ona (**2**).

As frações M1/1 e M1/3 foram submetidas a sucessivas separações cromatográficas em sílica gel e CCDC (Figura 15 e Figura 16), levando ao isolamento dos compostos 5-[(3*E*)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol (**3**), acetato de shizuka-acoradienolila (**4**), shizuka-acoradienol (**4**) e gibbilimbol B (**5**).

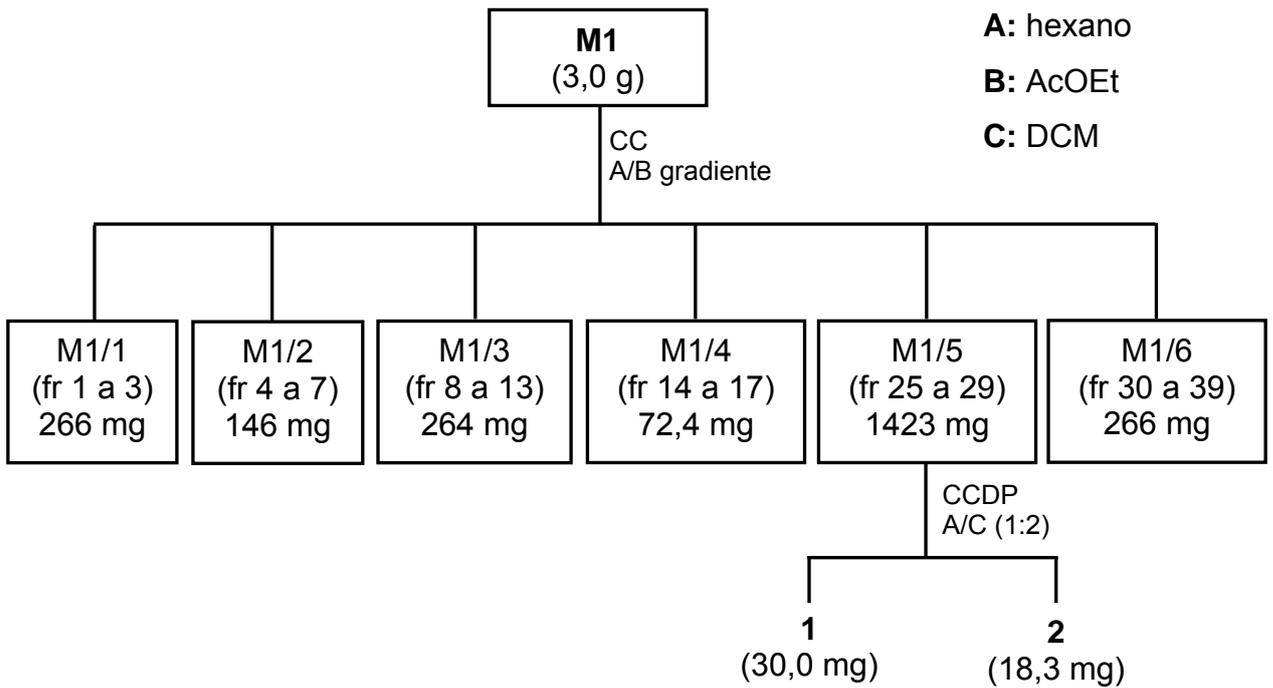


Figura 14. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1 obtida após tratamento com celite do extrato metanólico das folhas de *P. malacophyllum*.

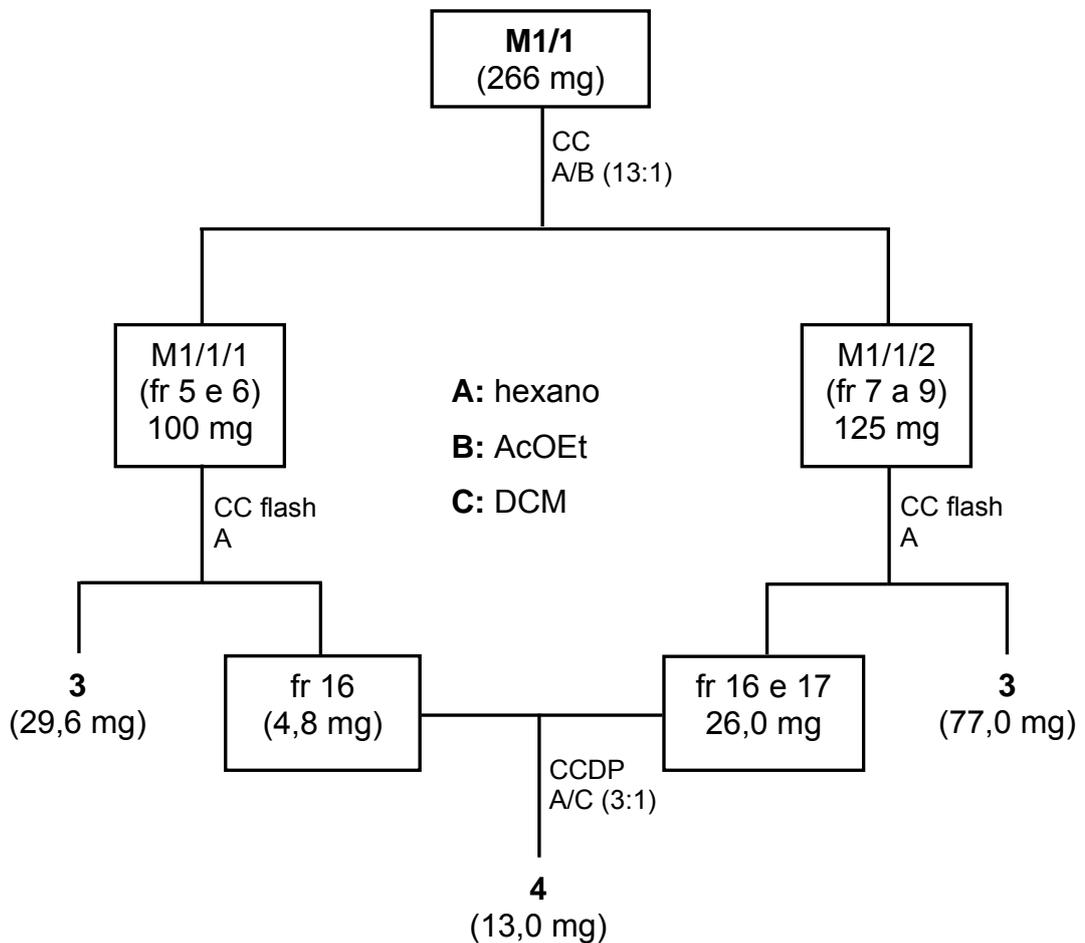


Figura 15. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1/1.

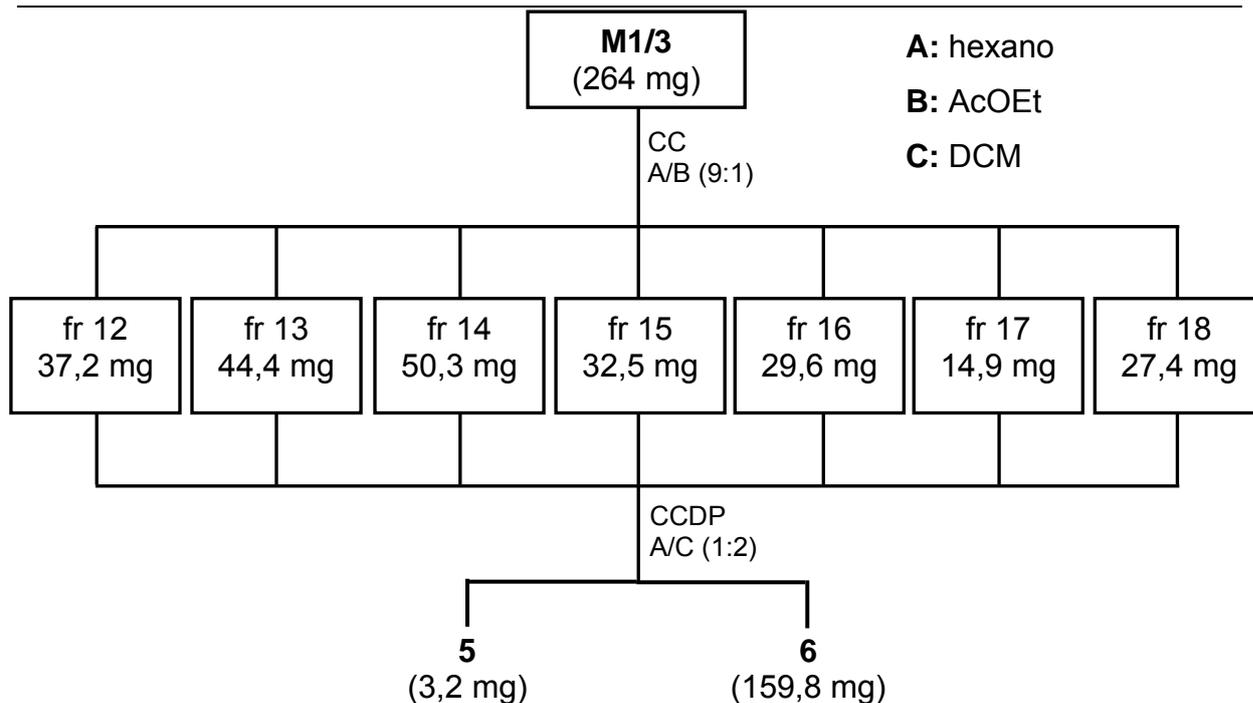


Figura 16. Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração M1/3.

3.2.2.4. Análise por CLAE

As frações M1, M2 e M3 foram submetidas a um tratamento prévio de “clean-up” antes de serem analisados por CLAE. Os extratos foram dissolvidos em uma solução MeOH:H₂O (9:1) em uma concentração de 2 mg mL⁻¹. Estas soluções foram eluídas em um cartucho Sep-Pak C18 e em seguida filtradas com filtros para seringa de teflon (3 mm, 20 μm). Foram injetados 20 μL das amostras.

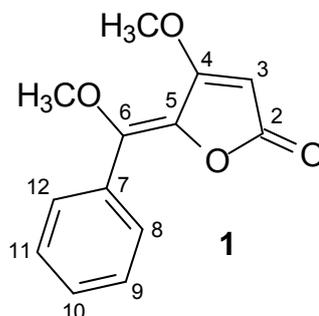
Para as análises por CLAE foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa RP 80 (Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, 5 μm). A fase móvel utilizada foi ACN e água milli-Q com um fluxo de 1 mL min⁻¹. A Tabela 4 apresenta o gradiente de solventes que foi utilizado. A detecção foi por ultravioleta nos comprimentos de onda de 204 e 307 nm. O programa de computador Shimadzu CLASS-VP versão 6.10 foi empregado para o tratamento dos dados.

Tabela 4. Gradiente dos solventes para análise das frações M1, M2 e M3.

Tempo (min)	ACN (%)
0 - 8	40
8 - 40	80
40 - 45	100
45 - 50	100
50 - 55	40
55 - 60	40

3.2.2.5. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos compostos identificados em *P. malacophyllum* (Piperaceae)

4,6-dimetóxi-5-*E*-fenilbutenolídeo (1)



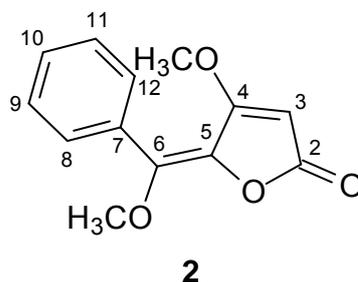
Nome IUPAC: (5*E*)-4-metóxi-5-[metóxi(fenil)metil]furan-2(5*H*)-ona

Característica: sólido amarelo claro.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 11, pag. 108.

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 11, pag. 108.

EM m/z (int rel %): 232 (C₁₃H₂₂O₄, [M⁺], 27); 189 (15); 161 (9); 109 (9); 105 (64); 91 (10); 77 (74); 69 (100); 55 (40); 51 (52) e 41 (88).

4,6-dimetóxi-5-Z-fenilbutenolídeo (2)

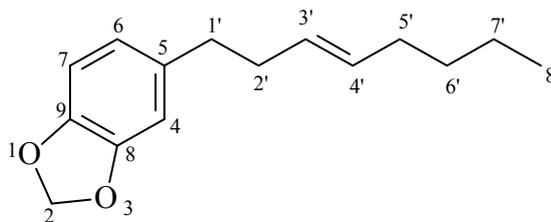
Nome IUPAC: (5Z)-4-metoxi-5-[metoxi(fenil)metil]furan-2(5H)-ona

Característica: sólido amarelo claro.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): Tabela 11, pag. 108.

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): Tabela 11, pag. 108.

EM m/z (int rel %): 232 ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_4$, $[\text{M}^+]$, 27); 189 (8); 161 (16); 115 (11); 105 (78); 91 (8); 77 (95); 69 (100), 51 (39) e 41 (49).

5-[(3E)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole (3)

Nome IUPAC: 5-[(3E)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole.

Característica: óleo incolor.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): Tabela 13, pag. 119.

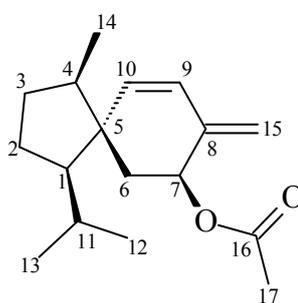
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): Tabela 13, pag. 119.

IV (filme, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3070, 3028, 2957, 2926, 2885, 1608, 1501, 1489, 1442, 1360, 1246, 1042, 969, 939 e 808.

EM m/z (int rel %): 232 ($C_{16}H_{20}O_2$, $[M^+]$, 5); 135 (100); 105 (6); 77 (34); 55 (7); 51 (23); 41 (27) e 39 (18).

Análise elementar: Encontrado: C 76.21%, H 8.63%. $C_{15}H_{20}O_2$ requerido: C 77.55%, H 8.68%.

Acetato de shizuka-acoradienolila (4)



Nome IUPAC: Acetato de (1*R*, 4*R*, 5*R*, 7*S*)-1-isopropil-4-metil-8-metileno-espiro[4.5]dec-9-en-7-ila.

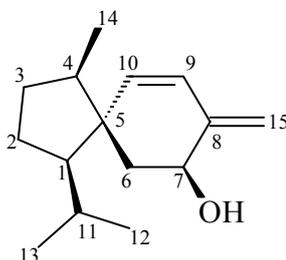
Característica: óleo amarelo. $[\alpha]_D^{19} = -52^\circ \text{C}$ (c 0.29, CHCl_3).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): Tabela 15, pag. 130.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): Tabela 15, pag. 130.

IV (solução, CHCl_3 , $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3097, 2955, 2930, 2871, 1738, 1645, 1464, 1372, 1241, 1039 e 888.

EM m/z (int rel %): 262 ($C_{17}H_{26}O_2$, $[M^+]$, 3); 219 (3); 202 (7); 177 (44); 159 (44); 146 (9); 131 (27); 118 (64); 105 (24); 91 (47); 69 (31); 55 (27); 43 (100) e 41 (43).

Shizuka-acoradienol (5)

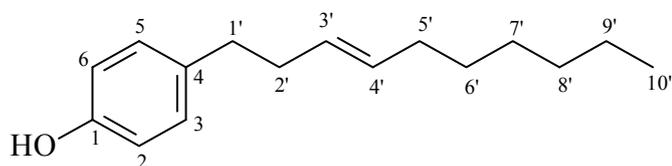
Nome IUPAC: (1*R*, 4*R*, 5*R*, 7*S*)-1-isopropil-4-metil-8-metilenoespиро-[4.5]dec-9-en-7-ol

Característica: sólido branco amorfo.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 15, pag. 130.

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 15, pag. 130.

EM m/z (int rel %): 220 (C₁₅H₂₄O, [M⁺], 7); 202 (12); 159 (97); 131 (52); 118 (58); 107 (57); 91 (100); 69 (61); 55 (59) e 41 (87).

Gibbilimbol B (6)

Nome IUPAC: 4-[(3*E*)-dec-3-en-1-il]fenol.

Característica: óleo amarelo e sólido amarelo quando resfriado.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): Tabela 13, pag. 119.

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): Tabela 13, pag. 119.

IV (filme, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3378, 3021, 2956, 2854, 1613, 1599, 1514, 1454, 1376, 1236, 967 e 827.

EM m/z (int rel %): 232 ($\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}$, $[\text{M}^+]$, 2); 108 (8); 107 (100); 91 (1); 77 (6); 55 (3); 43 (3) e 41 (7).

3.2.3. Metabólitos secundários das raízes, caules, folhas e frutos de *P. malacophyllum*

3.2.3.1. Preparo das amostras

O material vegetal (raízes, caules e frutos) foi secado em estufa 40°C, pulverizado e extraído com MeOH por 30 min sob banho de ultrassom por duas vezes. Após a extração, os solventes foram concentrados a pressão reduzida em evaporador rotatório, sendo obtidos os extratos brutos para cada parte.

Para a análise dos extratos por cromatografia gasosa, 8 mg dos extratos metanólicos (raízes, caules e frutos) foram suspensos em 3 mL de MeOH:H₂O (9:1), filtrados em filtro millipore (0,45 μm) e eluídos por uma coluna Sep-Pak C-18. Após evaporação do solvente os extratos foram suspensos em MeOH para uma concentração 2 mg mL⁻¹, e então submetidos a análise por cromatografia a gás e espectrometria de massas. O extrato metanólico das folhas também foi analisado por CG suspendendo 4 mg da fração M1 (Figura 13) em 2 mL de MeOH.

As condições empregadas nas análises por CG foram: temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 280°C, volume de injeção de 1 μL , hélio foi usado como gás de arraste, fluxo da coluna de 1 mL min⁻¹, temperaturas programadas de 60°C (1 min), 60 para 280°C (5°C min⁻¹) e 280°C (20 min).

3.2.4. Composição do óleo essencial das folhas de *P. malacophyllum*

3.2.4.1. Obtenção e análise do óleo essencial

Folhas (K-447) de *P. malacophyllum* (43 g) foram submetidas a arraste por vapor d'água em aparelho tipo Clevenger modificado (Wasicky, 1963). Foram obtidos 53,3 mg do óleo essencial (0,13% de rendimento). O teor de óleo foi expresso em porcentagem de base seca. Uma alíquota foi dissolvida em hexano para análise em CG e CG/EM.

Os hidrocarbonetos da série homóloga de C8 a C23 foram injetados sob forma de uma mistura homogênea. Esta série foi utilizada para cálculo dos índices de retenção.

As condições empregadas nas análises por CG foram: temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 280°C, volume de injeção de 1 µL, hélio foi usado como gás de arraste, fluxo da coluna de 1 mL min⁻¹, temperaturas programadas de 60°C (1 min), 60 para 280°C (3°C min⁻¹) e 280°C (2 min).

3.2.5. Administração de precursores radioativos (acetato-[1-¹⁴C] e L-fenilalanina-[U-¹⁴C]) em folhas de *P. malacophyllum*

Para realizar os estudos de incorporação de precursores acetato-[¹⁴C] e L-fenilalanina-[U-¹⁴C] foram coletadas folhas jovens de plantas (6 meses) adultas de *P. malacophyllum* no jardim do bloco 11 do Instituto de Química da USP-SP.

Incorporação do precursor $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+-[1-^{14}\text{C}]$ *in vivo* em *P. malacophyllum*

Três folhas jovens de espécimes adultos de aproximadamente mesma forma e peso foram coletadas e os pecíolos imediatamente imersos em uma solução de 20 μL de H_2O contendo 0,48 μCi de acetato de sódio $[1-^{14}\text{C}]$ e mantidas sob luz branca para facilitar o processo de metabolização do precursor. Após absorção parcial da solução, foram adicionados volumes de 15 μL de H_2O destilada até as folhas serem retiradas das soluções, uma a uma, a intervalos de 6, 9 e 22 horas respectivamente, congeladas em N_2 líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de um tubo e um bastão de vidro. Foram adicionados aproximadamente 12 mL de acetona ao material triturado. O material foi filtrado em algodão e a vácuo, e o filtrado foi evaporado. Os resíduos foram ressuspensos em 1 mL de acetona e foram separados 100 μL da solução para leitura de radioatividade específica para o ^{14}C . Para isso, foram adicionados 5 mL do líquido cintilador ao 100 μL do extrato e a radiação medida em um cintilador. A radioatividade específica é dada em dpm (desintegrações por minuto) e para efeito de correlação entre o valor da radioatividade específica lida e a correspondente em μCi , utiliza-se a relação onde 1 μCi equivale a $2,2 \times 10^6$ dpm (Tabela 5).

Tabela 5. Radiação absoluta em cada experimento de incorporação do precursor $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+-[1-^{14}\text{C}]$ *in vivo* em *P. malacophyllum*.

Tempo de incorporação (h)	Radiação inicial (dpm)	Radiação incorporada (dpm)	Incorporação no extrato (%)
6	1056000	1215,3	0,12
9	1056000	2048,3	0,19
22	1056000	5024,4	0,48

Incorporação do precursor *L*-fenilalanina -(U-¹⁴C) in vivo em *P. malacophyllum*

Foi utilizado o mesmo procedimento para o CH₃COO⁻Na⁺ [1-¹⁴C]. Foi utilizado 20 µL de H₂O contendo 2,1 µCi de acetato de sódio[1-¹⁴C] e intervalos de 4, 9, 21 e 29 horas (Tabela 6).

Tabela 6. Radiação absoluta em cada experimento de incorporação do precursor *L*-fenilalanina-[U-¹⁴C] in vivo em *P. malacophyllum*.

Tempo de incorporação (h)	Radiação inicial (dpm)	Radiação incorporada (dpm)	Incorporação no extrato (%)
4	4620000	160357,4	3,47
9	4620000	94977,6	2,06
21	4620000	143498,0	3,10
29	4620000	306792,0	6,64

Os extratos com maior radioatividade foram então submetidos à análise por CLAE em uma concentração de 3 mg L⁻¹, sendo o solvente coletado minuto a minuto para a medição da radiação. Para o experimento com acetato de sódio-[1-¹⁴C] foi injetada uma radiação total de 837 dpm e para a *L*-fenilalanina 10828 dpm. As condições utilizadas na análise foram as mesmas utilizadas no item 3.2.1.4 (pag. 68), utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex[®], 250 x 4,6 mm, 5 µm). A detecção foi por ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm.

3.3. Desenvolvimento e validação de um método em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para a quantificação e determinação de butenolídeos em *P. malacophyllum*

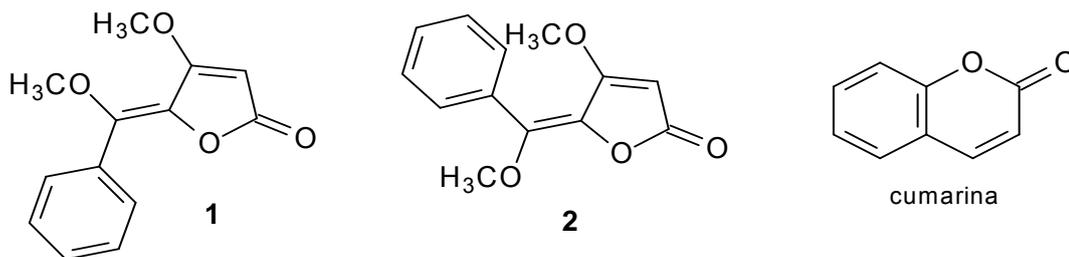
3.3.1. Condicionamento do capilar e procedimento

Foi utilizado capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com comprimento total de 40,2 cm (comprimento até a janela de detecção 30 cm), sendo os diâmetros externo e interno iguais a 375 μm e 75 μm , respectivamente. O capilar foi mantido na temperatura de 22°C por circulação de líquido resfriador (coolant, *Beckman Coulter*).

Ao início de cada ensaio realizado o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L⁻¹ por 20 min, seguido por 15 min de água deionizada e 15 minutos de eletrólito de corrida. Entre cada corrida o capilar foi reconicionado passando-se o próprio eletrólito de corrida por 1 min. Ao final dos ensaios o capilar foi lavado com NaOH 1 mol L⁻¹ por 5 minutos e água deionizada por mais 5 minutos.

3.3.2. Preparo das soluções padrões

As soluções estoque dos padrões de butenolídeos **1** e **2** (1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e da cumarina (300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), usada como padrão interno, foram preparadas em MeOH e transferidas para frascos âmbar e mantidas sob refrigeração. As soluções padrões de trabalho eram preparadas diariamente pela diluição apropriada das soluções estoques com o padrão interno.



3.3.3. Preparo das amostras

As folhas secas (K-447, K-448, K-449, K-450, K646, K-858, K-882, K-883 e K-884) foram pulverizadas e uma amostra (0,5 g) foi extraída com 5 mL de MeOH por 30 min sob banho de ultrassom. O procedimento de extração foi realizado em triplicata. Uma alíquota de 1 mL foi filtrada com filtros para seringa de teflon (0,45 μm) e 150 μL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 1 mL, dopado com os padrões dos butenólídeos (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentração final) e o volume completado com a solução do padrão interno (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentração final). Uma alíquota de 50 μL foi diluída com 450 μL de uma solução de 5 mmol L^{-1} SDS/5 mmol L^{-1} tetraborato de sódio.

3.3.4. Ensaio fatorial

Foi utilizado um fatorial 2^3 , ou seja, de dois níveis (+, -) e três variáveis (concentrações de ACN, SDS e TBS), para otimizar a separação de uma mistura teste com os padrões dos butenólídeos na concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros experimentais investigados.

Fatores		(-)	(+)	0
A	SDS (mmol L ⁻¹)	10	20	15
B	ACN (% v/v)	10	20	15
C	TBS (mmol L ⁻¹)	10	20	15

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e para minimizar os erros experimentais, as análises foram feitas de forma aleatória. Os ensaios estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Matriz para os três parâmetros e os dois níveis (fatores na escala de códigos e as variáveis).

Ensaio	Fatores			Variáveis (mmol L ⁻¹)		
	A	B	C	SDS	ACN (%)	TBS
1	+	-	-	20	10	10
2	+	+	-	20	20	10
3	-	-	-	10	10	10
4	-	+	-	10	20	10
5	+	-	+	20	10	20
6	+	+	+	20	20	20
7	-	-	+	10	10	20
8	-	+	+	10	20	20
9	0	0	0	15	15	15

3.3.5. Preparo do sistema micelar

Um sistema micelar contendo 20 mmol L⁻¹ SDS, 20% (v/v) ACN e 10 mmol L⁻¹ TBS em pH 9,2 foi usado na separação dos butenolídeos.

3.3.6. Validação do método

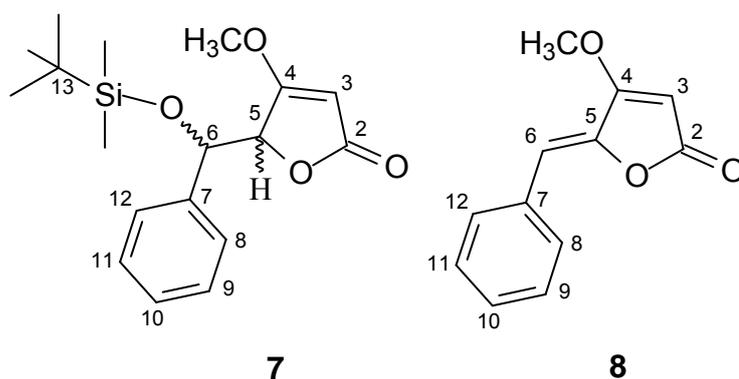
Para a construção da curva de calibração, alíquotas de 100, 200, 300, 400 e 500 µL, da solução padrão estoque dos butenolídeos (1000 µg mL⁻¹) foram transferidas separadamente para um balão volumétrico de 1 mL e então diluídas ao volume com o padrão interno (300 µg mL⁻¹). Uma alíquota de 50 µL foi diluída com 450 µL de uma solução de 5 mmol L⁻¹ SDS/5 mmol L⁻¹ TBS. Obtiveram-se concentrações na faixa de 10,0 a 50,0 µg mL⁻¹ dos butenolídeos, e 30,0 µg mL⁻¹ da cumarina. Cada solução foi injetada em triplicata. Os dados foram dispostos em gráfico da razão das áreas dos picos (butenolídeo/cumarina) versus a concentração de 1 e 2.

A exatidão do método foi avaliada por teste de recuperação em que as folhas secas e pulverizadas da *P. malacophyllum* (0,5 g) foram extraídas com 5 mL das soluções metanólicas dos butenolídeos em três concentrações conhecidas (30, 40 e 50 µg mL⁻¹) por 30 min em banho de ultrassom.

3.4. Procedimentos sintéticos

3.4.1. Síntese de compostos análogos de piperolídeos

5-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi(fenil)metil]-4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (7) e (5*Z*)-5-benzilideno-4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (8)



Em um balão tritubulado (25 mL) acoplado a um condensador de refluxo sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado 4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (**24**) (300 mg; 2,63 mmol) dissolvida em DCM anidro (5 mL). Em seguida foram adicionados TBDMSOTf (726 μ L; 3,16 mmol), DIPEA (1,3 mL; 7,89 mmol) e benzaldeído (300 μ L; 2,90 mmol). Após agitação durante 2 h à temperatura ambiente, DBU (786 μ L, 5,26 mmol) foi adicionado e a mistura ficou sob refluxo. Após 4 h, DCM (80 mL) foi adicionado e a mistura foi lavada sucessivamente com solução aquosa de HCl (3 mol L⁻¹, 2x40 mL). As fases aquosas foram combinadas e extraída com DCM (2x40 mL) e os extratos orgânicos coletados foram lavados com solução saturada de NaCl (~3x40 mL) até a neutralização. A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida resultando na obtenção de um sólido amarelado (827 mg). O sólido foi fracionado em coluna de sílica gel (hexano/DCM

1:2), levando a obtenção do composto **7** (227 mg; 0,68 mmol; 26 %) e do composto **8** (390 mg; 1,93 mmol; 73 %), ambos como um sólido branco.

Dados físicos do composto **7**:

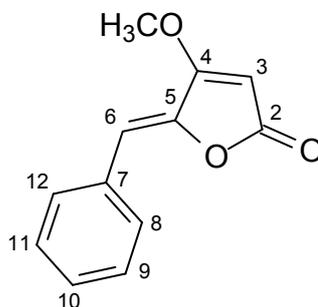
Característica: sólido branco. **Tf** = 125,8-126,9°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3135, 3032, 2955, 2932, 2858, 1759, 1637, 1460, 1369, 1256, 1148, 1124, 1061, 1009, 949, 901, 837, 777 e 702.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ -0,21 e -0,02 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0,85 (s, 9H, $13\text{-(CH}_3)_3$); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 4,74 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2,0$ Hz e $J_{5,3} = 0,9$ Hz; H5); 4,96 (d, 1H, $J_{6,5} = 2,0$ Hz; H6); 5,28 (d, 1H, $J_{3,5} = 0,9$ Hz; H3); 7,27-7,33 (m, 5H, H8, H9, H10, H11 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ -5,7 e -4,8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 18,0 (C13); 25,5 ($13\text{-(CH}_3)_3$); 59,1 (OCH_3); 72,5 (C6); 82,6 (C5); 90,3 (C3); 126,9 (C8 e C12); 128,1 (C9 e C11); 130,5 (C10); 139,8 (C7); 172,5 (C2) e 179,4 (C4).

EM m/z (int rel %): 277 ([M-57], 6); 221 (21); 143 (19); 105 (39); 89 (34); 73 (100); 59 (24) e 41 (29).

Dados físicos do composto 8:**8**

Característica: sólido branco. **Tf** = 131,5-132,8°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3124, 2943, 1759, 1605, 1445, 1375, 1215, 1173, 1080, 972, 820 e 692.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,98 (s, 3H, OCH_3); 5,28 (s, 1H, H3); 6,23 (s, 1H, H6); 7,26-7,39 (m, 3H; H9, H10 e H11); 7,75 (dd, 2H, $J_{8/12,9/11} = 8,2$ Hz e $J_{8/12,10} = 1,6$ Hz; H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,3 (OCH_3); 88,3 (C3); 107,8 (C6); 128,8 (C9 e C11); 129,0 (C10); 130,6 (C8 e C12); 132,4 (C7); 142,3 (C5); 168,7 (C2) e 171,1 (C4).

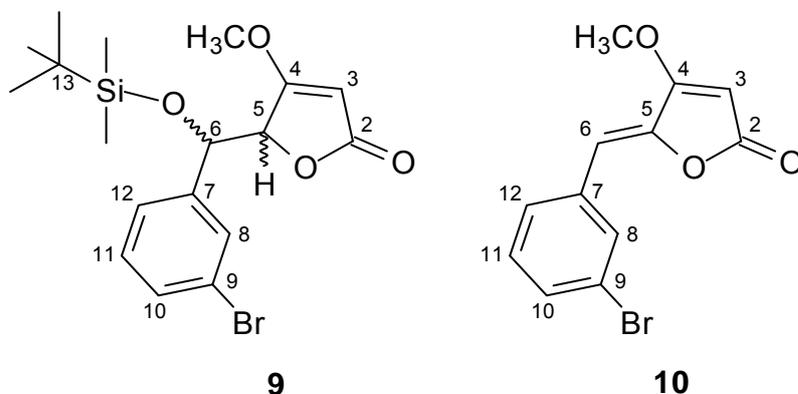
EM m/z (int rel %): 202 ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$ [M^+], 29); 131 (9); 118 (12); 90 (23); 89 (25); 69 (100); 63 (17) e 39 (19).

Os compostos **9** a **22** foram preparados utilizando-se o procedimento descrito para síntese dos compostos **7** e **8**. As quantidades dos reagentes e os rendimentos para cada reação são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Dados referentes ao preparo dos compostos 9 ao 22.

Aldeídos (mg; mmol)	4-metoxifuran- 2(5 <i>H</i>)-ona (mg; mmol)	TBDMSOTf (μ L; mmol)	DIPEA (mL; mmol)	DBU (μ L; mol)	Rendimento (mg; %)
3-bromobenzaldeído (537; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	9 (230; 21) e 10 (436; 59)
1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído (435; 2,90)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	11 (358; 55)
4-bromobenzaldeído (537; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	12 (205; 28)
4-clorobenzaldeído (408; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	13 (410; 66)
4-(dimetilamino)benzaldeído (433; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	14 (495; 77)
4-nitrobenzaldeído (438; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	15 (565; 87)
4-metoxibenzaldeído (395; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	16 (520; 85)
3-metoxibenzaldeído (395; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	17 (468; 77)
3-metilbenzaldeído (348; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	18 (394; 69)
2-metilbenzaldeído (348; 2,9)	300; 2,63	726; 3,16	1,3; 7,89	786; 5,26	19 (329; 58)
5-iodovanilina (806; 2,9)	300; 2,63	1000; 4,35	1,3; 7,89	786; 5,26	20 (372; 29)
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (528; 2,9)	300; 2,63	910; 3,95	1,3; 7,89	786; 5,26	21 (392; 50) e 22 (235; 23)
4-TBDMSO-3,5-dimetoxibenzaldeído (356; 1,20)	124; 1,09	300; 1,31	0,53; 3,27	325; 2,18	22 (271; 63)

**5-((3-bromofenil){[(*tert*-butil(dimetil)silil]oxi)metil]-4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (9) e
(5*Z*)-5-(3-bromo-benzilideno)-4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (10)**



Dados físicos do composto 9:

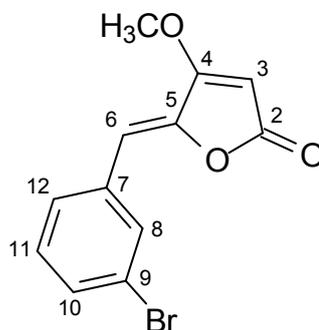
Característica: sólido branco. **Tf** = 166,5-167,5 °C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3115, 2953, 2856, 1744, 1629, 1470, 1366, 1250, 1128, 1055, 1014, 957, 912, 829, 777.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ -0,17 e -0,01 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0,86 (s, 9H, $13\text{-(CH}_3)_3$); 3,89 (s, 3H, OCH_3); 4,73 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2,0$ Hz e $J_{5,3} = 0,9$ Hz; H5); 4,92 (d, 1H, $J_{6,5} = 2,0$ Hz; H6); 5,10 (d, 1H, $J_{3,5} = 0,9$ Hz; H3); 7,21 (t, 1H, $J_{11,10} = J_{11,12} = 7,9$ Hz; H11); 7,36 (dl, 1H, $J_{10,11} = 7,9$ Hz; H10); 7,43 (dt, 1H, $J_{12,11} = 7,9$ Hz e $J_{12,8} \cong J_{12,10} \cong 1,8$ Hz; H12) e 7,54 (t, 1H, $J_{8,10} = J_{8,12} = 1,8$ Hz; H8).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ -5,6 e -4,7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 18,0 (C13*); 25,5 ($13\text{-(CH}_3)_3$); 59,2 (OCH_3); 71,9 (C6**); 82,2 (C5**); 90,5 (C3); 122,2 (C9*); 125,7 (C10**); 129,7 (C10**); 129,9 (C8**); 131,2 (C12**); 142,2 (C7*); 172,3 (C2) e 179,1 (C4*).* Atribuído pelo DEPT. ** Atribuído pelo HETCOR.

EM m/z (int rel %): 355 ($[\text{M}-57]$, 3); 301 (7); 183 (8); 143 (28); 89 (35); 73 (100); 59 (25) e 41 (28).

Dados físicos do composto 10:**10**

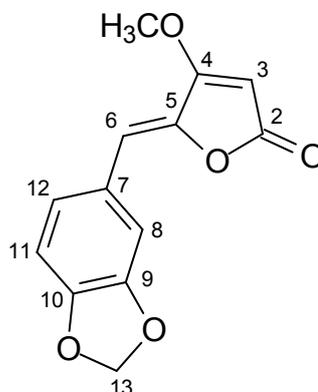
Característica: sólido branco. **Tf** = 127,1-128,0°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3108, 2924, 1779, 1606, 1414, 1368, 1214, 1117, 1076, 975 e 880.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,99 (s, 3H, OCH_3); 5,29 (s, 1H, H3); 6,13 (s, 1H, H6); 7,24 (t, 1H, $J_{11,10} = J_{11,12} = 7,9$ Hz; H11); 7,44 (dl, 1H, $J_{10,11} = 8,3$ Hz; H10); 7,68 (dl, 1H, $J_{12,11} = 7,9$ Hz; H12) e 7,87 (t, 1H, $J_{8,10} \cong J_{8,12} \cong 1,5$ Hz; H8).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,3 (OCH_3); 88,6 (C3); 106,0 (C6); 122,8 (C9); 128,9 (C12); 130,2 (C11); 131,8 (C10); 132,9 (C8); 134,4 (C7); 143,1 (C5); 168,2 (C2) e 170,9 (C4).

EM m/z (int rel %): 282 ($[\text{M}^+ + 2]$, 47); 280 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrO}_3$ $[\text{M}^+]$, 50); 209 (3); 196 (8); 145 (18); 101 (15); 89 (36) e 69 (100).

(5Z)-5-(1,3-benzodioxol-5-ilmetileno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (11)

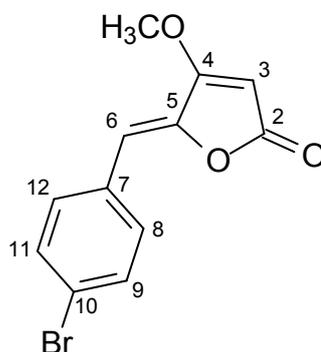
Característica: sólido amarelo. Tf = 169,0-170,0°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3105, 2945, 1872, 1749, 1662, 1597, 1491, 1445, 1261, 1171, 1038, 932, 849 e 660.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,96 (s, 3H, OCH_3); 5,23 (s, 1H, H3); 5,99 (s, 1H, H13); 6,13 (s, 1H, H6); 6,80 (d, 1H, $J_{11,12} = 8,1$ Hz; H11), e 7,13 (dd, 1H, $J_{12,11} = 8,1$ Hz e $J_{12,8} = 1,8$ Hz; H12) e 7,40 (d, 1H, $J_{8,12} = 1,8$ Hz; H8).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,2 (OCH_3); 88,7 (C3); 101,4 (C13); 107,8 (C6); 108,5 (C11); 110,0 (C8); 125,8 (C12); 126,6 (C7); 140,8 (C5); 148,1 (C9*); 148,4 (C10*); 168,7 (C2) e 171,1 (C4). * As atribuições podem estar trocadas.

EM m/z (int rel %): 246 ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_5$ [M^+], 25); 175 (10); 134 (16); 104 (8); 76 (34); 69 (100); 53 (17); 50 (24) e 41 (16).

(5Z)-5-(4-bromobenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (12)

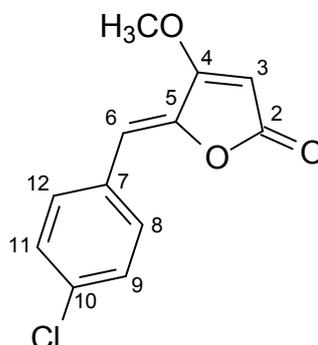
Característica: sólido branco. Tf = 182,3-183,5°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3139, 2923, 1770, 1606, 1482, 1401, 1371, 1214, 1165, 966 e 801.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,98 (s, 3H, OCH₃); 5,29 (s, 1H, H3); 6,15 (s, 1H, H6); 7,50 (d, 2H, $J_{9/11,8/12} = 8,6$ Hz; H9 e H11) e 7,61 (d, 2H, $J_{8/12,9/11} = 8,6$ Hz; H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,3 (OCH₃); 88,4 (C3); 106,4 (C6); 123,2 (C10); 131,2 (C7); 131,8 (C9 e C11); 131,9 (C8 e C12); 142,6 (C5); 168,4 (C2) e 170,9 (C4).

EM m/z (int rel %): 282 ($[\text{M}^+ + 2]$, 54); 280 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrO}_3$ $[\text{M}^+]$, 61); 209 (5); 196 (13); 145 (14); 101 (17); 89 (45); 84 (4) e 69 (100).

(5Z)-5-(4-clorobenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (13)

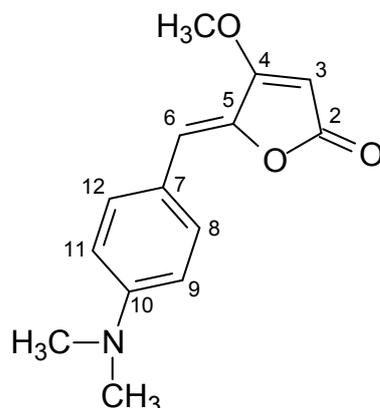
Característica: sólido branco. Tf = 168,0-169,5°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3130, 2956, 1798, 1609, 1487, 1373, 1217, 1167, 968, 798 e 636.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,97 (s, 3H, OCH_3); 5,28 (s, 1H, H3); 6,15 (s, 1H, H6); 7,34 (d, 2H, $J_{9/11,8/12} = 8,5$ Hz; H9 e H11) e 7,67 (d, 2H, $J_{8/12,9/11} = 8,5$ Hz; H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,3 (OCH_3); 88,4 (C3); 106,4 (C6); 129,0 (C9 e C11); 130,9 (C7); 131,6 (C8 e C12); 134,8 (C10); 142,5 (C5); 168,3 (C2) e 170,9 (C4).

EM m/z (int rel %): 236 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClO}_3$ [M^+], 6); 124 (7); 89 (37); 84 (4), 69 (100), 63 (20) e 41 (14).

(5Z)-[4-(dimetilamino)benzilideno]-4-metoxifuran-2(5H)-ona (14)

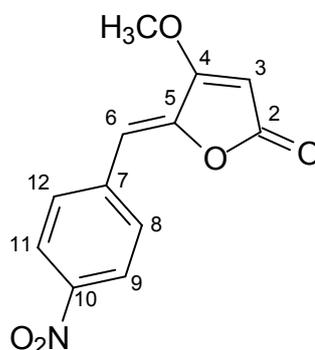
Característica: sólido alaranjado.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3175, 3111, 2945, 2810, 1744, 1666, 1589, 1524, 1443, 1364, 1234, 1192, 1074, 970, 930, 866, 812 e 648.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,01 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 3,94 (s, 3H, OCH_3); 5,19 (s, 1H, H3); 6,16 (s, 1H, H6); 6,68 (d, 2H, $J_{9/11,8/12} = 9,0$ Hz; H9 e H11) e 7,65 (d, 2H, $J_{8/12,9/11} = 9,0$ Hz; H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 40,1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 59,0 (OCH_3); 86,8 (C3); 109,0 (C6); 111,9 (C9 e C11); 120,3 (C7); 132,4 (C8 e C12); 139,1 (C5); 150,6 (C10); 169,4 (C2) e 171,2 (C4).

EM m/z (int rel %): 245 ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ [M^+], 29); 202 (17); 174 (21); 161 (8); 132 (27); 118 (19); 89 (22); 69 (100) e 41 (19).

(5Z)-4-metoxi-5-(4-nitrobenzilideno)furan-2(5H)-ona (15)

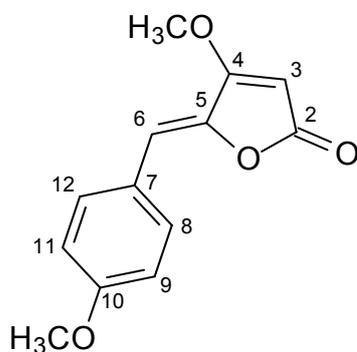
Característica: sólido vermelho. **Tf** = 213,3-215,0°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3128, 2949, 1767, 1605, 1514, 1346, 1169, 1072, 966, 868, 818 e 689.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 4.02 (s, 3H, OCH_3); 5,36 (s, 1H, H3); 6,25 (s, 1H, H6); 7,89 (d, 2H, $J_{8/12,9/11} = 9,0$ Hz; H8 e H12) e 8,23 (d, 2H, $J_{9/11,8/12} = 9,0$ Hz; H9 e H11).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 59,5 (OCH_3); 89,2 (C3); 104,8 (C6); 123,9 (C9 e C11); 130,8 (C8 e C12); 144,9 (C7); 139,1 (C5); 147,2 (C10); 167,6 (C2) e 170,7 (C4).

EM m/z (int rel %): 247 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_5$ [M^+], 23); 200 (3); 145 (5); 133 (7); 89 (15); 69 (100); 63 (21) e 39 (15).

(5Z)-4-metoxi-5-(4-metoxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (16)

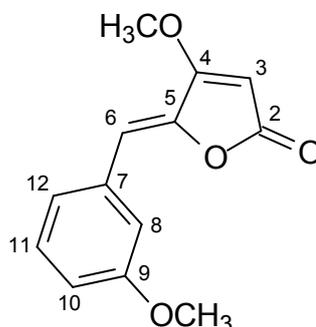
Característica: sólido branco. **Tf** = 106,3-106,7°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3119, 2980, 1774, 1601, 1516, 1435, 1381, 1263, 1190, 1074, 974, 868, 822 e 656.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,82 (s, 3H, 10-OCH₃); 3,95 (s, 3H, 4-OCH₃); 5,22 (s, 1H, H3); 6,17 (s, 1H, H6); 6,90 (d, 2H, $J_{9/11,8/12} = 8,8$ Hz; H9 e H11) e 7,70 (d, 2H, $J_{8/12,9/11} = 8,8$ Hz; H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 55,3 (10-OCH₃); 59,1 (4-OCH₃); 87,6 (C3); 107,7 (C6); 114,2 (C9 e C11); 125,1 (C7); 132,2 (C8 e C12); 140,7 (C5); 160,1 (C10); 168,9 (C2) e 171,1 (C4).

EM m/z (int rel %): 232 (C₁₃H₁₂O₄ [M⁺], 47); 189 (14); 161 (25); 148 (13); 133 (15); 120 (16); 105 (9); 91 (26), 77 (28); 69 (100), 63 (20) e 51 (47).

(5Z)-5-(3-metoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (17)

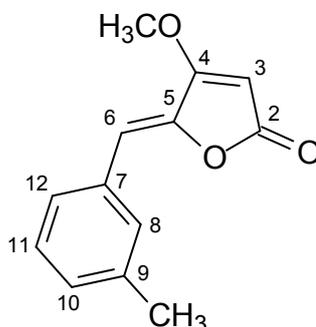
Característica: sólido branco. **Tf** = 121,1-122,5°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3113, 2939, 2839, 1761, 1609, 1573, 1489, 1433, 1273, 1202, 1076, 976, 891 e 833.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 3,84 (s, 3H, 10-OCH₃); 3,97 (s, 3H, 4-OCH₃); 5,27 (s, 1H, H3); 6,19 (s, 1H, H6); 6,88 (dt, 1H; $J_{10,8} = J_{10,12} = 2,4$ Hz e $J_{10,11} = 6,6$ Hz; H10) e 7,26-7,31 (m, 3H; H8, H11 e H12)

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 55,3 (10-OCH₃); 59,2 (4-OCH₃); 88,2 (C3); 107,7 (C6); 115,2 (C8 e C10); 123,2 (C12); 129,6 (C11); 133,6 (C7); 142,3 (C5); 159,7 (C9); 168,5 (C2) e 171,0 (C4).

EM m/z (int rel %): 232 (C₁₃H₁₂O₄ [M⁺], 18); 161 (13); 148 (7); 133 (6); 105 (5); 91 (21), 77 (20); 69 (100), 63 (13) e 51 (32).

(5Z)-5-(3-metilbenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (18)

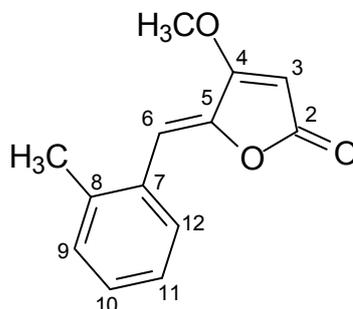
Característica: sólido amarelo claro. **Tf** = 123,4-124,8°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3119, 3029, 2957, 2856, 1755, 1632, 1460, 1366, 1244, 1159, 1057, 970, 835, 775 e 704.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 2,37 (s, 3H, 9- CH_3); 3,98 (s, 3H, OCH_3); 5,27 (s, 1H, H3); 6,19 (s, 1H, H6); 7,14 (d, 1H, $J_{10,11} = 7,6$ Hz; H10); 7,28 (t, 1H, $J_{11,10} = J_{11,12} = 7,6$ Hz; H11); 7,54 (d, 1H, $J_{12,11} = 7,8$ Hz; H12) e 7,57 (sl, 1H, H8).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 21,4 (9- OCH_3); 59,2 (OCH_3); 88,1 (C3); 108,0 (C6); 127,8 (C12); 128,6 (C11); 129,9 (C10); 131,0 (C8); 132,2 (C7); 138,4 (C9); 142,0 (C5); 168,8 (C2) e 171,1 (C4).

EM m/z (int rel %): 216 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3$ [M^+], 17); 145 (13); 132 (7); 103 (14); 78 (21), 69 (100), 63 (11) e 51 (17).

(5Z)-5-(2-metilbenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (19)

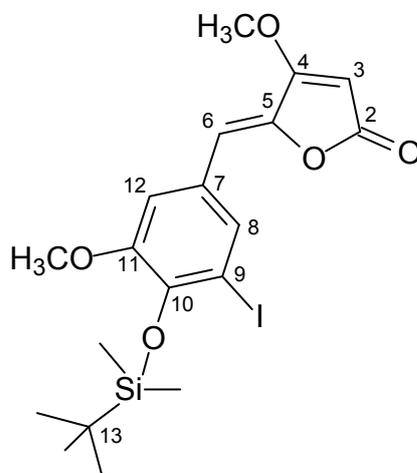
Característica: sólido amarelo claro. **Tf** = 139,0-140,2°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3124, 3057, 2930, 2856, 1753, 1601, 1487, 1460, 1373, 1203, 1078, 974, 932, 827 e 750.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 2,42 (s, 3H, 9- CH_3); 3,99 (s, 3H, OCH_3); 5,28 (s, 1H, H3); 6,43 (s, 1H, H6); 7,18-7,25 (m, 3H, H9, H10 e H11) e 8,06 (d, 1H, $J_{12,11} = 7,5$ Hz; H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 20,1 (8- OCH_3); 59,2 (OCH_3); 88,2 (C3); 104,6 (C6); 126,4 (C9); 128,9 (C10); 130,3 (C11); 130,7 (C12); 130,8 (C8); 137,3 (C7); 142,3 (C5); 168,8 (C2) e 171,1 (C4).

EM m/z (int rel %): 216 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3$ [M^+], 13); 188 (6); 145 (8); 128 (15); 115 (10); 103 (15); 78 (22), 69 (100), 63 (13) e 51 (21).

(5Z)-5-(4--3-iodo-5-metoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (20)

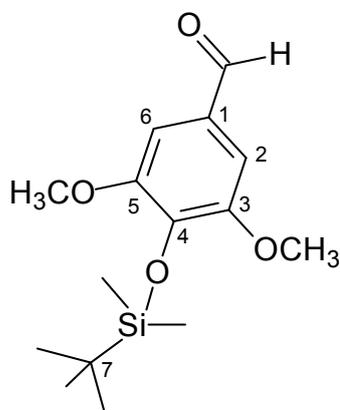
Característica: sólido branco. **Tf** = 145,6-146,6°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3018, 2931, 2856, 1784, 1610, 1581, 1302, 1165, 1043, 910, 781 e 660.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 0,26 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 1,05 (s, 9H, $13-(\text{CH}_3)_3$); 3,84 (s, 3H, 11- OCH_3); δ 3,97 (s, 3H, 4- OCH_3); 5,24 (s, 1H, H3); 6,06 (s, 1H, H6); 7,41 (d, 2H, $J_{8,12} = 1,9$ Hz; H12*) e 7,57 (d, 2H, $J_{12,8} = 1,9$ Hz; H8*). * Atribuídos pelo NOESY.

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ -3,3 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 19,1 (C13); 26,1 ($13-(\text{CH}_3)_3$); 55,1 (11- OCH_3); δ 59,2 (4- OCH_3); 87,9 (C3); 90,2 (C9); 106,5 (C6); 112,9 (C12); 127,3 (C7); 133,9 (C8); 141,2 (C5); 146,5 (C10); 149,4 (C11); 168,5 (C2) e 171,0 (C4).

EM m/z (int rel %): 488 ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{IO}_5\text{Si}$ [M^+], 1); 431 (61); 416 (100); 332 (7); 290 (6); 233 (11); 177 (38); 145 (37); 137 (27); 89 (24); 73 (70); 69 (84); 59 (63) e 41 (38).

4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxy]-3,5-dimetoxibenzaldeído (21)

Característica: sólido branco. **Tf** = 69,5-70,4°C

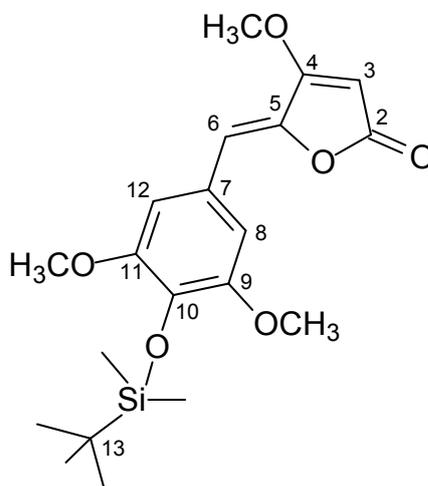
IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3013, 2948, 2856, 2739, 2709, 1682, 1585, 1504, 1466, 1335, 1234, 1124, 869 e 783.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 0,15 (s, 6H, Si(CH₃)₂); 1,01 (s, 9H, 13-(CH₃)₃); 3,86 (s, 6H, 3,5-OCH₃); 7,10 (s, 2H, H2 e H6) e 9,82 (s, 1H, CHO).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ -4,6 (Si(CH₃)₂); 18,8 (C13); 25,7 (13-(CH₃)₃); 55,8 (3,5-OCH₃); 106,7 (C2 e C6); 129,3 (C1); 142,4 (C4); 152,0 (C3 e C5) e 191,0 (CHO).

EM m/z (int rel %): 295 (C₁₅H₂₄O₄Si [M-1], 0,1); 239 (48); 224 (100); 209 (7); 195 (9); 179 (3); 165 (3); 153 (10); 137 (5); 123 (4); 89 (5); 73 (22); 59 (27) e 41 (26).

(5Z)-5-(4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-3,5-dimetoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (22)



Característica: sólido amarelo claro. **Tf** = 135,8-136,9°C

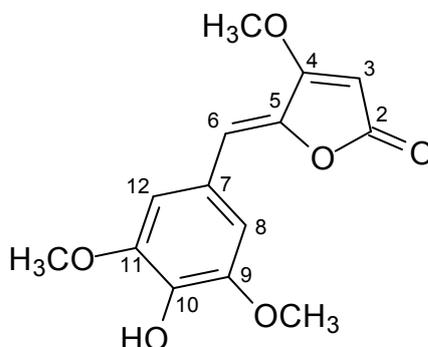
IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3064, 2932, 2866, 1759, 1609, 1512, 1468, 1335, 1252, 1171, 1124, 920, 841 e 779.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 0,14 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 1,00 (s, 9H, 13- $(\text{CH}_3)_3$); 3,83 (s, 6H, 9,11- OCH_3); 3,96 (s, 3H, 4- OCH_3); 5,23 (s, 1H, H3); 6,14 (s, 1H, H6); 6,97 (s, 2H, H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ -4,6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 18,7 (C13); 25,7 (13- $(\text{CH}_3)_3$); 55,8 (9,11- OCH_3); 59,2 (4- OCH_3); 87,6 (C3); 107,9 (C8 e C12); 108,5 (C6); 125,1 (C7); 136,0 (C10); 140,8 (C5); 151,6 (C9 e C11); 168,8 (C2) e 171,1 (C4).

EM m/z (int rel %): 392 ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{Si}$ [M^+], 1); 335 (15); 320 (43); 227 (7); 249 (8); 233 (7); 193 (7); 135 (7); 89 (17); 73 (100); 69 (93); 59 (69) 57 (31) 45 (21) e 41 (52).

Síntese da (5Z)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (23)



Em um frasco de plástico (25 mL) contendo (5Z)-5-(4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-3,5-dimetoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (**21**) (78 mg; 0,20 mmol) foram adicionados 3 mL de uma solução de ACN/HF (1:1 v/v). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 3 horas e então transferida para um funil de separação contendo AcOEt (40 mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (3x25 mL). As fases aquosas foram combinadas e em seguida extraída com AcOEt (2x25 mL). As fases orgânicas foram então combinadas e secada com MgSO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida resultando na obtenção do composto **23** (52 mg; 0,19 mmol; 95%) como um sólido amarelo.

Característica: sólido amarelo. Tf = 161,0-162,0°C

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3678-3294, 3123, 2945, 2845, 1745, 1601, 1518, 1466, 1313, 1240, 1124, 852 e 785.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 3,92 (s, 6H, 9,11-OCH₃); 3,96 (s, 3H, 4-OCH₃); 5,23 (s, 1H, H3); 5,81 (sl, 1H, OH); 6,13 (s, 1H, H6); 7,01 (s, 2H, H8 e H12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 56,4 (9,11- OCH_3); 59,2 (4- OCH_3); 87,6 (C3); 107,5 (C8 e C12); 108,3 (C6); 123,9 (C7); 136,1 (C10); 140,8 (C5); 147,1 (C9 e C11); 168,8 (C2) e 171,1 (C4).

EM m/z (int rel %): 278 ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$ [M^+], 62); 235 (10); 203 (10); 189 (14); 151 (12); 123 (12); 95 (10), 79 (15); 69 (100), 53 (29), 51 (24) e 41 (17).

3.5. Ensaio biológicos

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

O ensaio para a atividade antifúngica foi realizado na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo aos cuidados da Prof^a Dr^a Maria Cláudia M. Young, a partir de cinco soluções de cada um dos compostos e uma solução de nistatina em solvente adequado as suas solubilidades, nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,1 mg mL⁻¹ e aplicados 10 μL de cada solução em uma placa de CCDC-Si suportada em alumínio. Após a evaporação do solvente aspergiu-se sobre a placa uma solução contendo esporos do fungo revelador. As placas foram incubadas em câmara úmida a 25°C no escuro por 42h (Homans e Fuchs, 1970).

3.5.2. Ensaio contra *Trypanosoma cruzi*

O ensaio contra *Trypanosoma cruzi* foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Paratias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP/ Araraquara aos cuidados da Prof^a Dr^a Maria Regina Barretto Cicarelli.

3.5.2.1. Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida para se realizar este experimento por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

Os parasitas são cultivados em meio LIT - Liver Infusion Tryptose (Fernandes e Castellani, 1966) a 28 °C, com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório. A cepa Y (Silva e Nussenzweig, 1953) é considerada uma cepa padrão do tipo I segundo Briones *et al.* (1999), que classifica como tipo I, linhagens isoladas de seres humanos e tipo II, linhagens que foram isoladas de vetores.

3.5.2.2. Método colorimétrico utilizando MTT

O teste colorimétrico utilizando MTT foi padronizado por Muelas-Serrano *et al.* (2000a), utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y).

Para a padronização dessa reação, foi utilizada a fração acetato do extrato da folha da planta *Piper tuberculatum* da família Piperaceae, uma vez que, em prévias contagens, essa substância se mostrou com alta atividade tripanocida.

Posteriormente, essa padronização foi confirmada com o benzonidazol, cujo IC_{50} é de $9,01 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, na câmara de fluxo laminar.

Para o teste foram colocados $3 \mu\text{L}$ da substância nas concentrações desejadas (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$), não ultrapassando o limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores mostram-se tóxicas para o parasita.

A seguir, foram adicionados $97 \mu\text{L}$ de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* na concentração desejada nos poços para teste e $97 \mu\text{L}$ de meio LIT nos poços controles. Foram realizados dois controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência dessa, mas contendo parasitas.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C por 72 horas. A seguir, adicionou-se $10 \mu\text{L}$ de solução MTT/PMS ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de MTT e $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$ de PMS) em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo de luz por 75 minutos a 28°C . Neste momento, ocorre a redução do sal tetrazolium [MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio] em um produto colorido, *formazan*, pela enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta *et al.*, 2005).

Colocou-se então 100 μL da solução 10% SDS-0,01mol L^{-1} HCl, para dissolver os cristais de *formazan*, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos em porcentagem de citotoxicidade (% C) foi calculada segundo a equação seguinte (Muelas-Serrano *et al.*, 2000b).

$$\% C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitas (mL^{-1}) nos poços controles e G_p , o número de parasitas (mL^{-1}) detectados em diferentes concentrações da substância. O A_c corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitas; A_m representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasita; A_p , o valor da absorbância nos testes e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metabólitos secundários da *Piper malacophyllum*

4.1.1. Metabólitos secundários das folhas de *Piper malacophyllum*

4.1.1.1. Análise por CLAE

Os extratos das diversas partes da espécie *P. malacophyllum* foram analisadas através de CLAE visando a obtenção de um perfil químico. Os extratos de folhas foi submetido a um processo de “clean-up” através de filtração de uma solução hidroalcoólica em camada de celite, visando à eliminação de clorofila e matrizes apolares, bem como uma pré-concentração dos constituintes. A análise das frações M1, M2 e M3 por CLAE (Figura 17) indicou o predomínio dos piperolídeos **1** e **2** (Tabela 10), previamente descritos (Lago *et al.*, 2005). Além disso, verificou-se a presença de outros metabólitos minoritários, que se tornaram alvo de purificações, considerando a possibilidade de serem biossinteticamente relacionados a **1** e **2**. Após a análise dos cromatogramas optou-se por fracionar o extrato M1, visto que este possuía a maior massa e concentração relativa destes compostos. Após sucessivos procedimentos cromatográficos foram isolados seis substâncias (Figura 17 e Tabela 10). Como o produto **5** degradou, não foi possível determinar o seu tempo de retenção.

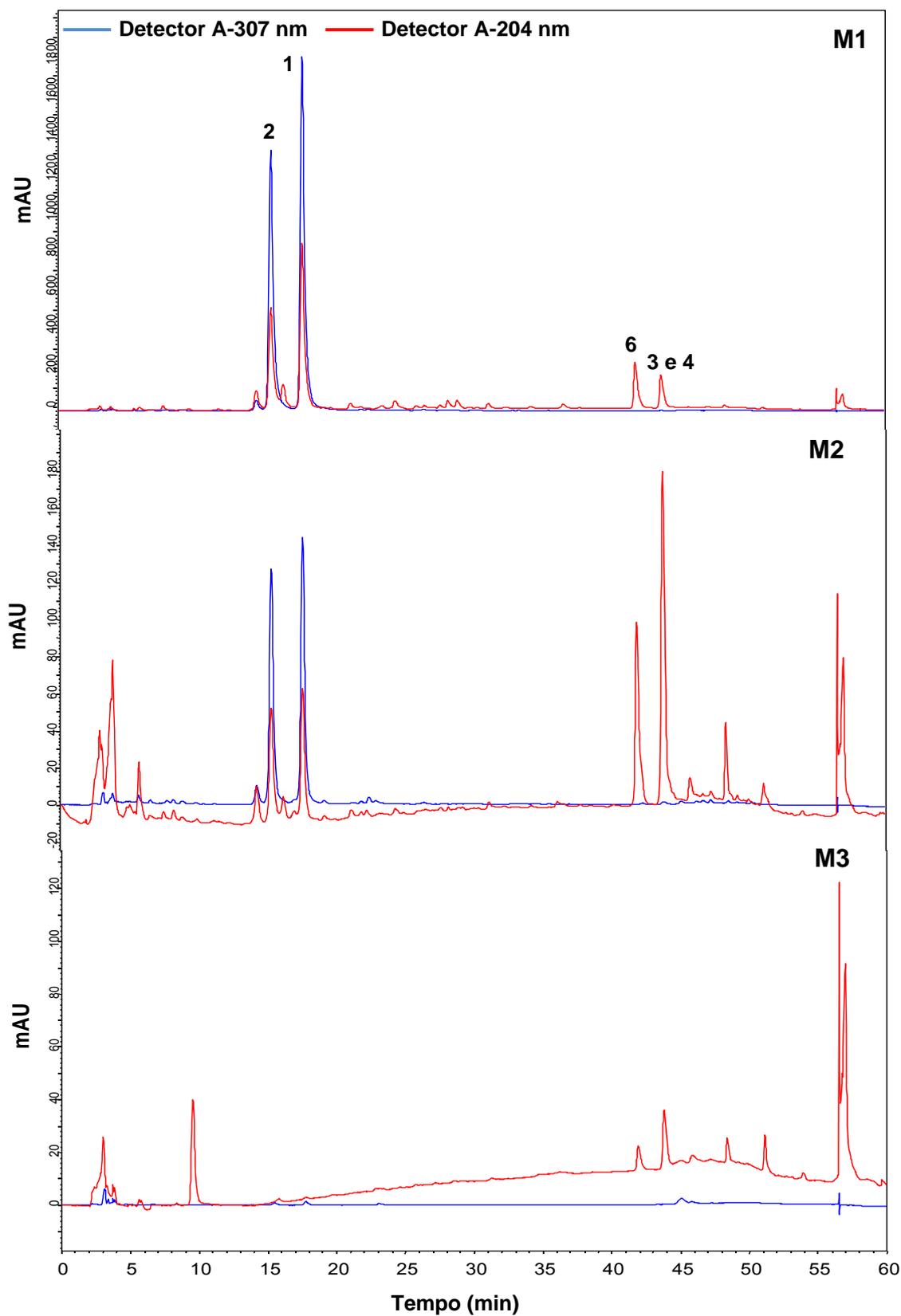


Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE das frações M1, M2 e M3 obtidas após tratamento com celite do extrato metanólico das folhas de *P. malacophyllum*.

Tabela 10. Identificação dos compostos obtidos por CLAE do extrato metanólico das folhas de *P. malacophyllum*.

Números	Compostos	t _R (min)
1	4,6-dimetóxi-5- <i>E</i> -fenilbutenolido	17,73
2	4,6-dimetóxi-5- <i>Z</i> -fenilbutenolido	15,46
3	5-[(3 <i>E</i>)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol	43,78
4	acetato de shizuka-acoradienolila	43,78
5	shizuka-acoradienol*	-
6	gibbilimbol B	41,90

4.1.1.2. Fracionamento cromatográfico

Visando o isolamento dos compostos presentes no extrato metanólico das folhas de *P. malacophyllum*, este foi ressuspendido em uma solução hidroalcoólica e inicialmente submetido a uma coluna filtrante com celite para a eliminação da clorofila (Fernandes *et al.*, 1997), sendo a fração M1 obtida após este tratamento. Esta fração foi analisada por CCDC em sílica gel, eluída com misturas de hexano/AcOEt com diferentes forças de eluição, revelada com luz ultravioleta e sulfato cérico e em seguida analisada por RMN de ¹H.

A fração M1 foi então submetida a sucessivas separações cromatográficas, como descrito no item 3.2.3 (pag. 65), que resultaram no isolamento dos compostos 4,6-dimetóxi-5-*E*-fenilbutenolídeo (**1**), 4,6-dimetóxi-5-*Z*-fenilbutenolídeo (**2**), 5-[(3*E*)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole (**3**), acetato de shizuka-acoradienolila (**4**), shizuka-acoradienol (**5**) e gibbilimbol B (**6**). Entre estes, **3** e **4** são inéditos na literatura e o composto **5** inédito no gênero *Piper*.

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

4.1.1.3. Elucidação estrutural

4,6-dimetóxi-5-*E*-fenilbutenolídeo (1) e 4,6-dimetóxi-5-*Z*-fenilbutenolídeo (2)

Tendo como base a descrição anterior de piperolídeos em *P. malacophyllum*, os dados obtidos no espectro de RMN de ^1H (Tabela 11 e Figura 18) do piperolídeo **1** foram atribuídos como se seguem: apresentou multipletos em 7,40-7,48 (3H) e 7,71-7,76 (2H), padrão de anel aromático monossustituído. Apresenta também dois sinais de metoxilas em δ 3,66 (s, 3H, 6-OCH₃) e 4,00 (s, 3H, 4-OCH₃), além de um simpleto em δ 5,25 (1H, H3). Estas informações, associadas aos dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19 e Tabela 11) em δ 171,6 (C4), 168,1 (C=O), 134,9 (C5), 144,5 (C6) e 88,8 (C3) indicam a presença da estrutura do piperolídeo (butenolídeo) contendo o grupo metoxílico em C4. Os sinais em δ 134,9 (C5) e 144,5 (C6) confirmam a presença da ligação dupla tetrasustituída e, conseqüentemente, o segundo grupo metoxílico está ligado ao carbono C6. Finalmente, os sinais em δ 128,5 (C9 e C11), 128,9 (C8 e C12), 129,9 (C10) e 131,0 (C7) referem-se aos carbonos do anel aromático. O composto **2** possui estrutura semelhante ao composto **1**, sendo isômero dele. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22 e Tabela 11) apresentou dois sinais de dois grupos metoxílicos (δ 58,8 e 58,9), dois carbonos olefínicos tetrasustituídos [δ 128,9 (C5) e 144,5 (C6)], quatro carbonos do anel do piperolídeo [δ 170,8 (C4), 167,9 (C2), 128,9 (C5) e 87,5 (C3)] e os seis carbonos

aromáticos [δ 127,9 (C9 e C11), 130,0 (C10), 130,1 (C8 e C12) e 130,6 (C7)], similares aos sinais apresentados pelo piperolídeo **1**. O espectro de RMN de ^1H (Figura 21 e Tabela 11) mostrou um multiplete em δ 7,37-7,48 (5H), indicando o anel aromático monosubstituído, e sinais em δ 3,61 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,74 (s, 3H, 6-OCH₃) e 5,13 (s, 1H, H3), que confirmam a similaridade estrutural entre **1** e **2**. Os espectros de massas (Figura 20 e Figura 23) dos butenolídeos obtidos (m/z 232) estão consistentes com suas fórmulas moleculares (C₁₃H₁₂O₄). Estes dados estão de acordo com os apresentados por Lago *et al.* (2005).

Tabela 11. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz) dos piperolídeos **1 e **2** (δ , CDCl₃).**

	1		2	
	^1H (mult, J _{Hz})	^{13}C	^1H (mult, J _{Hz})	^{13}C
2		168,1 (C=O)		167,9 (C=O)
3	5,29 (s)	88,8 (CH)	5,13 (s)	87,5 (CH)
4		171,6 (C)		170,8 (C)
5		134,9 (C)		128,9 (C)
6		144,5 (C)		144,0 (C)
7		131,0 (C)		130,6 (C)
8	7,71-7,76 (m)	128,9 (CH)	7,37-7,48 (m)	130,1 (CH)
9	7,40-7,48 (m)	128,5 (CH)	7,37-7,48 (m)	127,9 (CH)
10	7,40-7,48 (m)	129,9 (CH)	7,37-7,48 (m)	130,0 (CH)
11	7,40-7,48 (m)	128,5 (CH)	7,37-7,48 (m)	127,9 (CH)
12	7,71-7,76 (m)	128,9 (CH)	7,37-7,48 (m)	130,1 (CH)
4-OCH ₃	4,00 (s)	59,5 (CH ₃)	3,61 (s)	58,9 (CH ₃)
6-OCH ₃	3,66 (s)	60,5 (CH ₃)	3,74 (s)	58,8 (CH ₃)

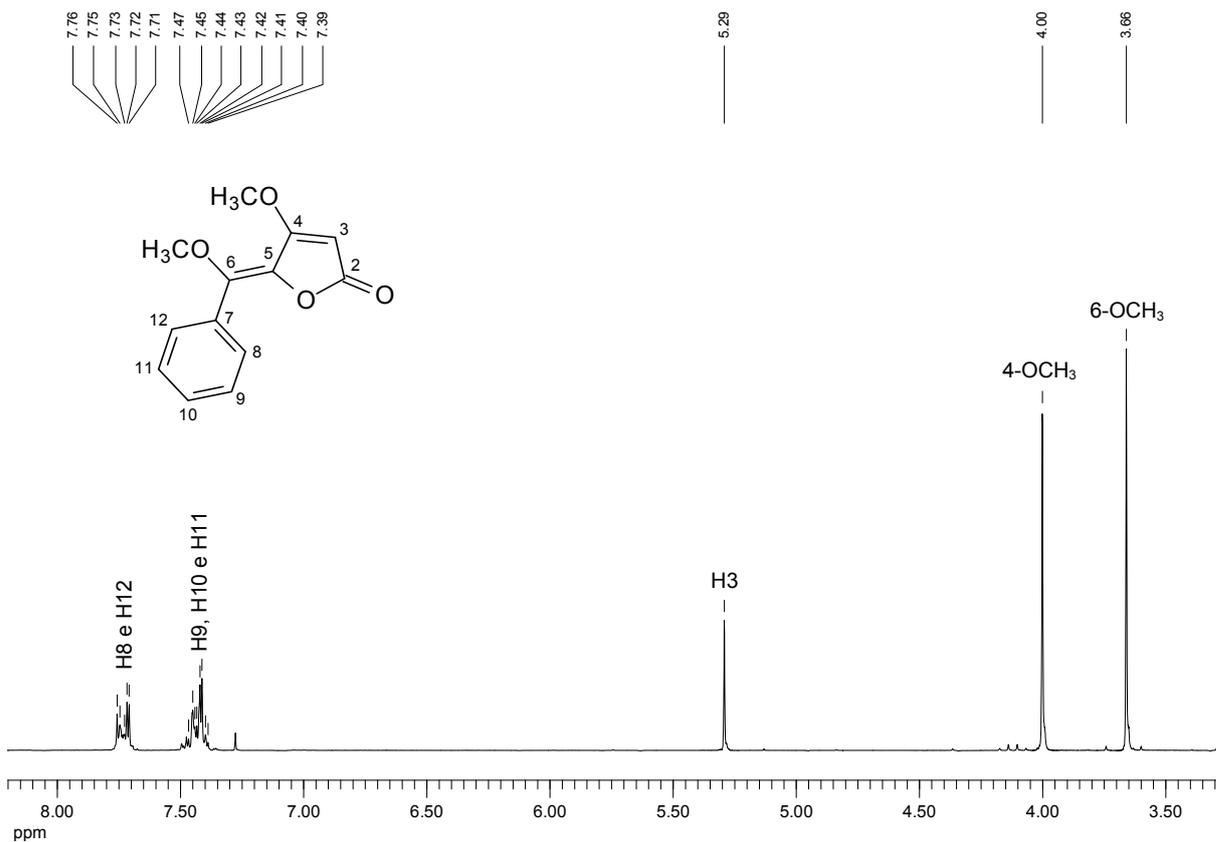


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 1.

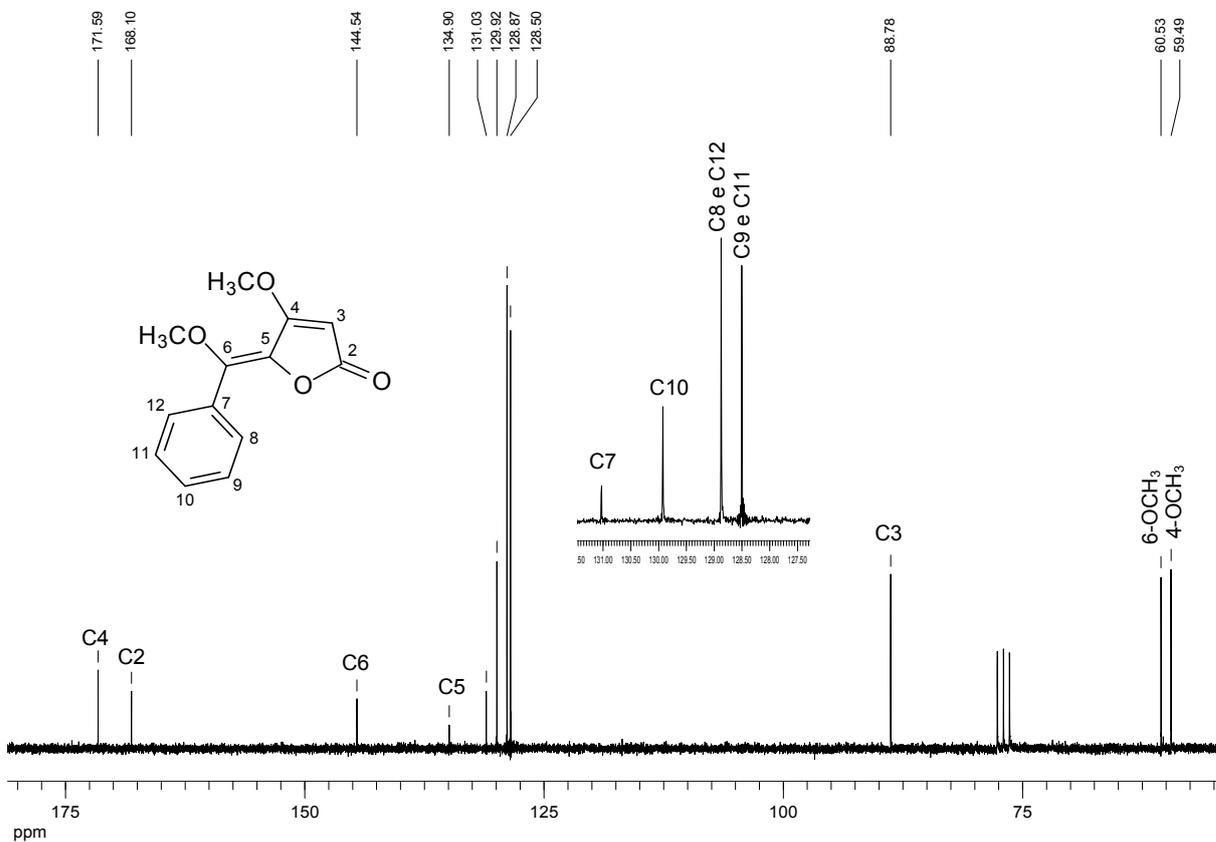


Figura 19. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 1.

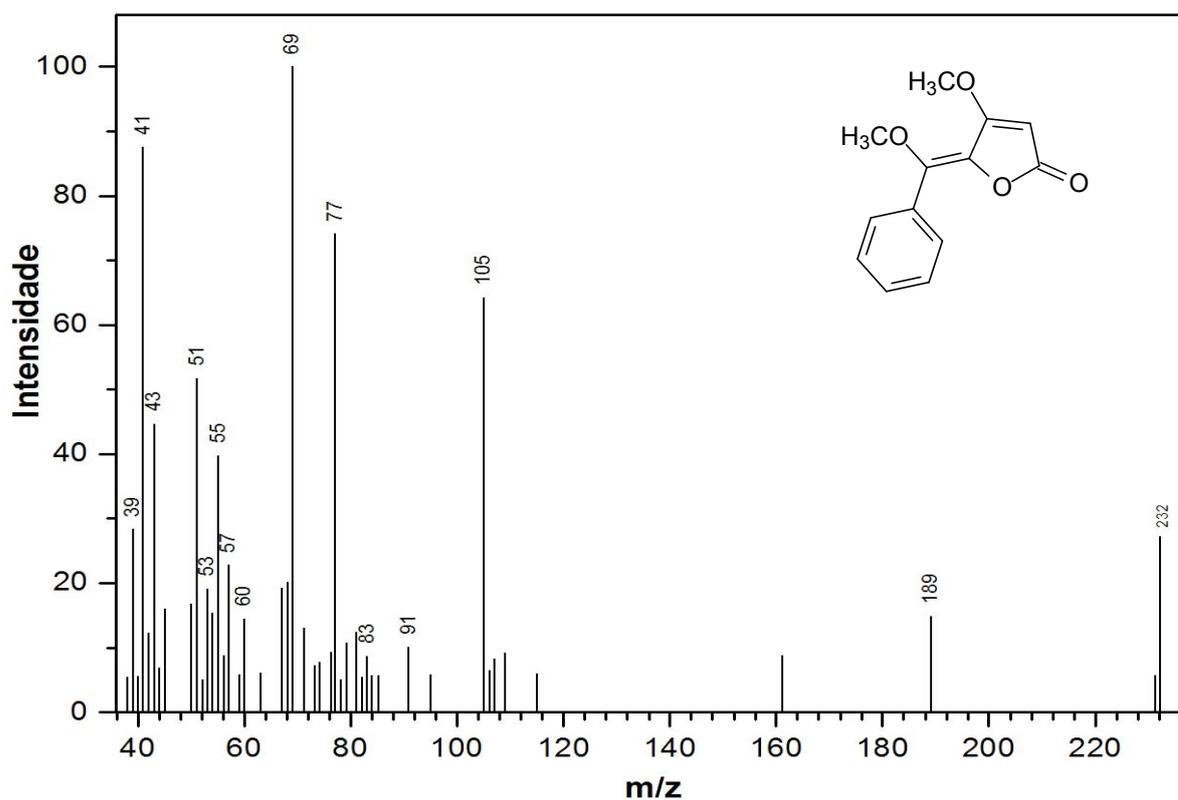
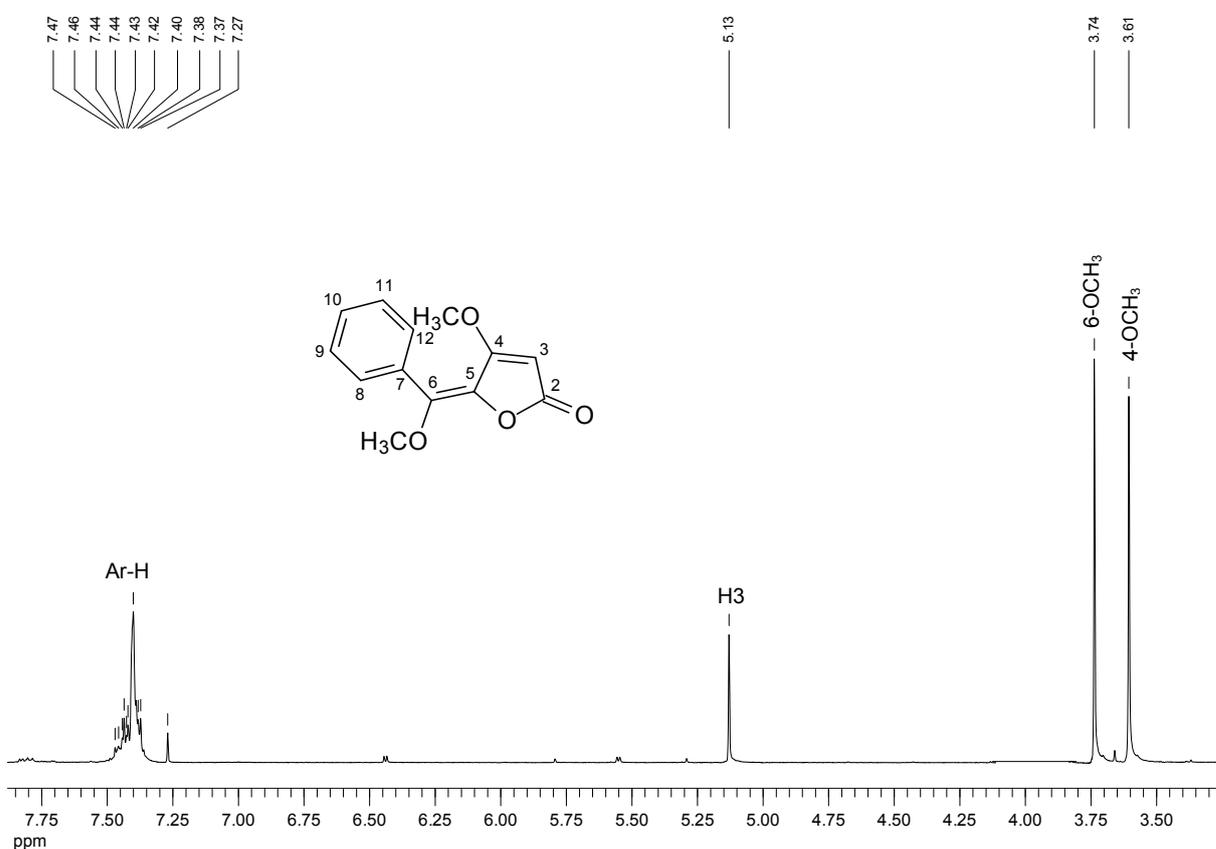


Figura 20. Espectro de massas de 1.

Figura 21. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 2.

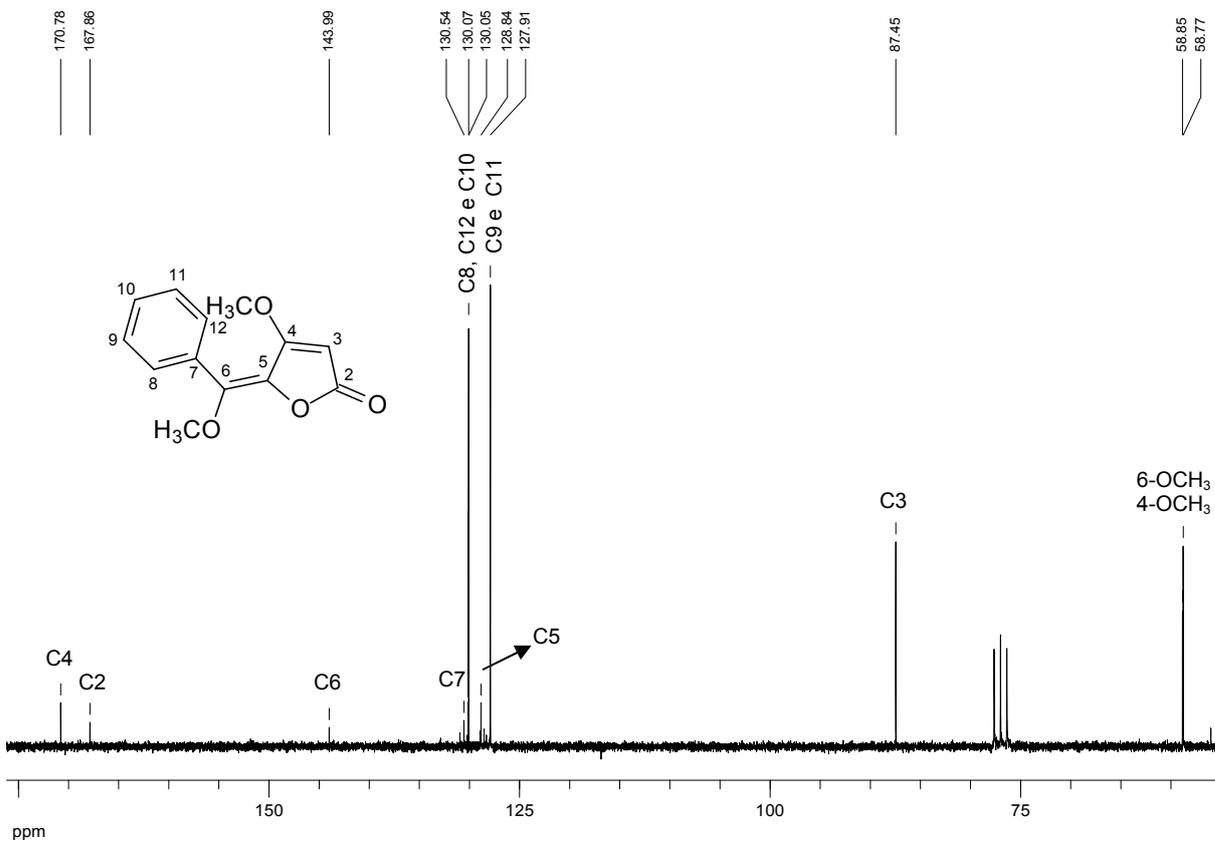


Figura 22. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 2.

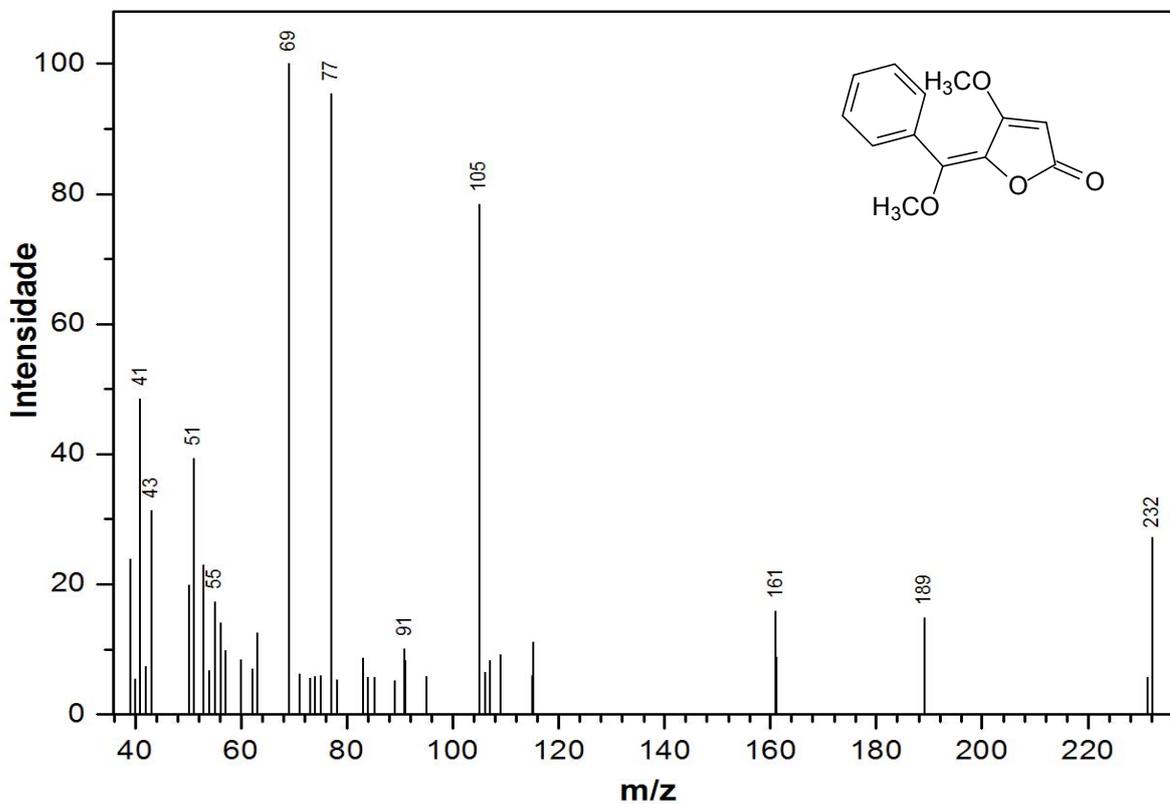


Figura 23. Espectro de massas de 2.

5-[(3E)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol (3)

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Tabela 12 e Figura 25) foi observada a presença de um simpleto em δ 5,93 referente ao grupo metilenodioxi e um multipletto de três hidrogênios em δ 6,62-6,75 atribuídos aos hidrogênios aromáticos H4, H6 e H7, confirmando a presença de um anel aromático trissubstituído. Os sinais do espectro RMN de ^1H remanescentes mostram a presença de uma dupla ligação (δ 5,43; 2H, H3' e H4'), também evidente no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 12 e Figura 26) (δ 129,1; C3' e 131,2; C4'), um grupo metileno benzílico (δ 2,60, t, 2H, $J_{1',2'} = 7,7$ Hz; H1'), dois metilenos alílicos (δ 1,99; m, 2H, H5' e 2,27; m, 2H, H2'), dois metilenos adicionais (δ 1,24-1,37; m, 4H, H6' e H7') e um metil (δ 0,90; t, 3H, $J_{8',7'} = 7,0$ Hz; H8'). Os dados do espectro de RMN de ^{13}C também indicam uma cadeia lateral com oito carbonos e os sinais em δ 100,7 (C2); 108,0 (C4); 108,9 (C7); 121,1 (C6); 136,1 (C5); 145,4 (C9) e 147,4 (C8) confirmam a presença do grupo 1,3-benzodioxolil.

A identificação do composto **3** como sendo o 5-[(3E)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole, bem como as atribuições citadas, foram definidas pela comparação de seus dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C com compostos similares descritos na literatura (Lopes, 1997; Abe *et al.*, 2001).

O espectro no IV (Figura 27) de **3** apresentou bandas em 2925 e 2856 cm^{-1} , normais de metilas e metilenos alifáticos e 1609 cm^{-1} referente ao estiramento C=C de alquenos. O espectro de massas (Figura 28) obtido para o alquenilbenzênico ($[\text{M}^+]$ em m/z 232) está consistente com sua fórmula molecular ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$). O pico base em m/z 135 refere-se à quebra benzílica (Figura 24).

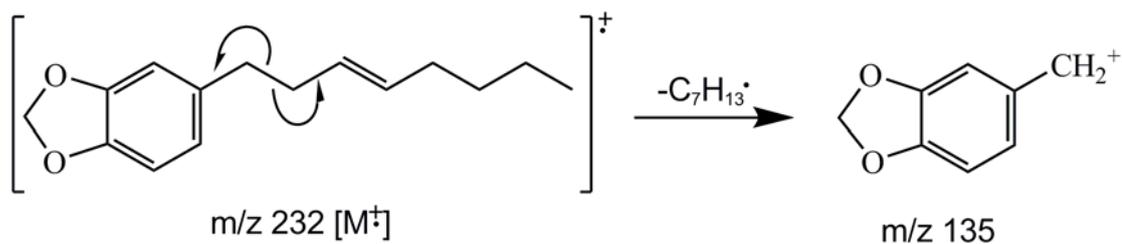


Figura 24. Fragmentação referente à formação do pico base de 3 no espectro de massas.

Tabela 12. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de 3 (300 e 75 MHz, δ , $CDCl_3$).

3		
	1H (mult, J_{Hz})	^{13}C
2	5,93 (s)	100,7 (CH ₂)
4	6,62-6,75 (m)	108,0 (CH)
5		136,1,(C)
6	6,62-6,75 (m)	121,1 (CH)
7	6,62-6,75 (m)	108,9 (CH)
8		147,4 (C)
9		145,4 (C)
1`	2,60 (t, 7,7)	35,9 (CH ₂)
2`	2,27 (m)	34,7 (CH ₂)
3`	5,43 (m)	129,1 (CH)
4`	5,43 (m)	131,2 (CH)
5`	1,99 (m)	32,2 (CH ₂)
6`	1,24-1,37 (m)	31,7 (CH ₂)
7`	1,24-1,37 (m)	22,1 (CH ₂)
8`	0,90 (t, 7,0)	13,9 (CH ₃)

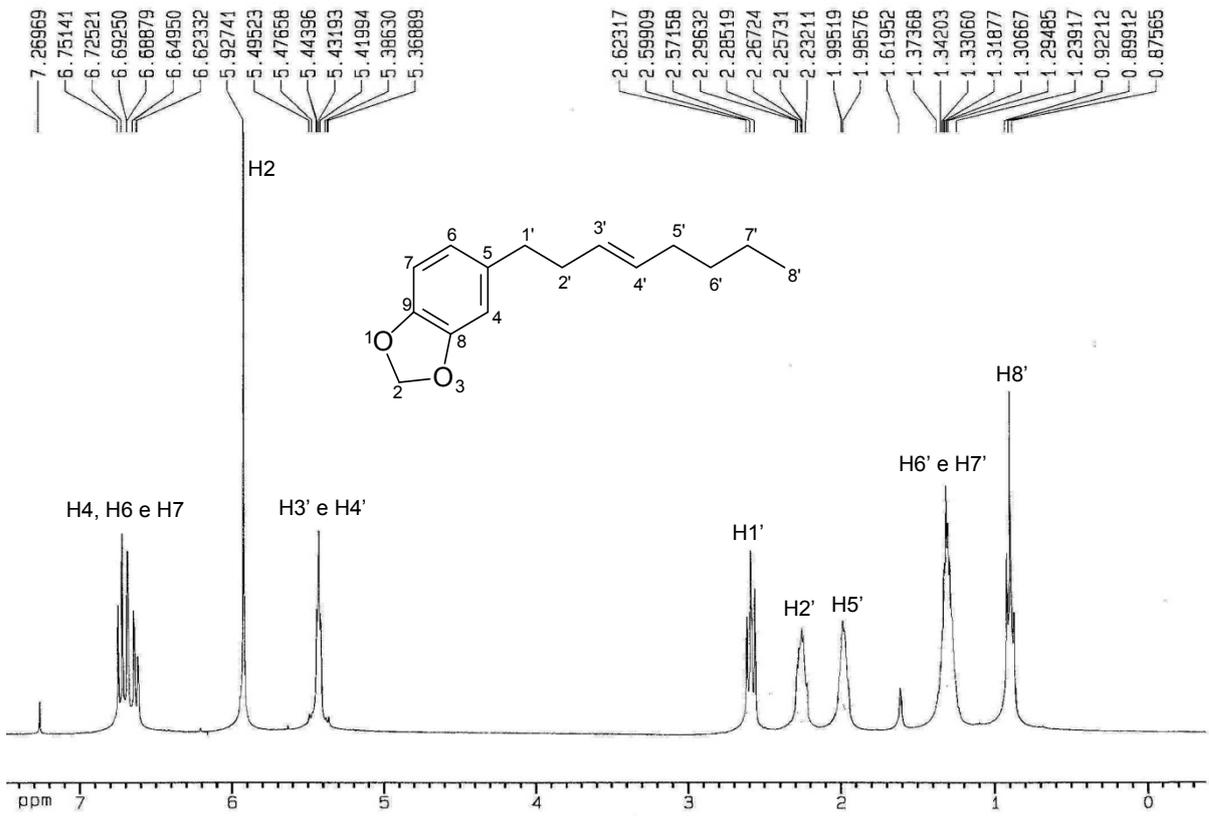


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 3.

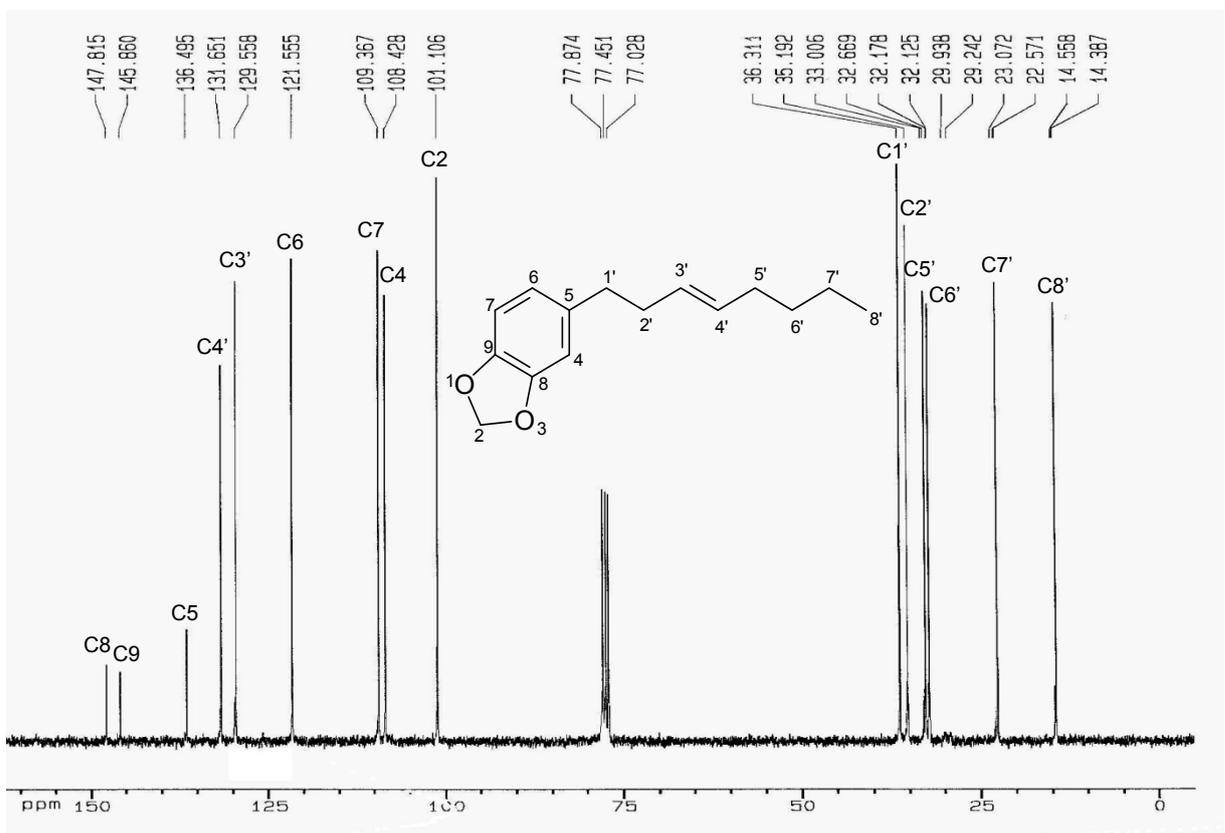


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 3.

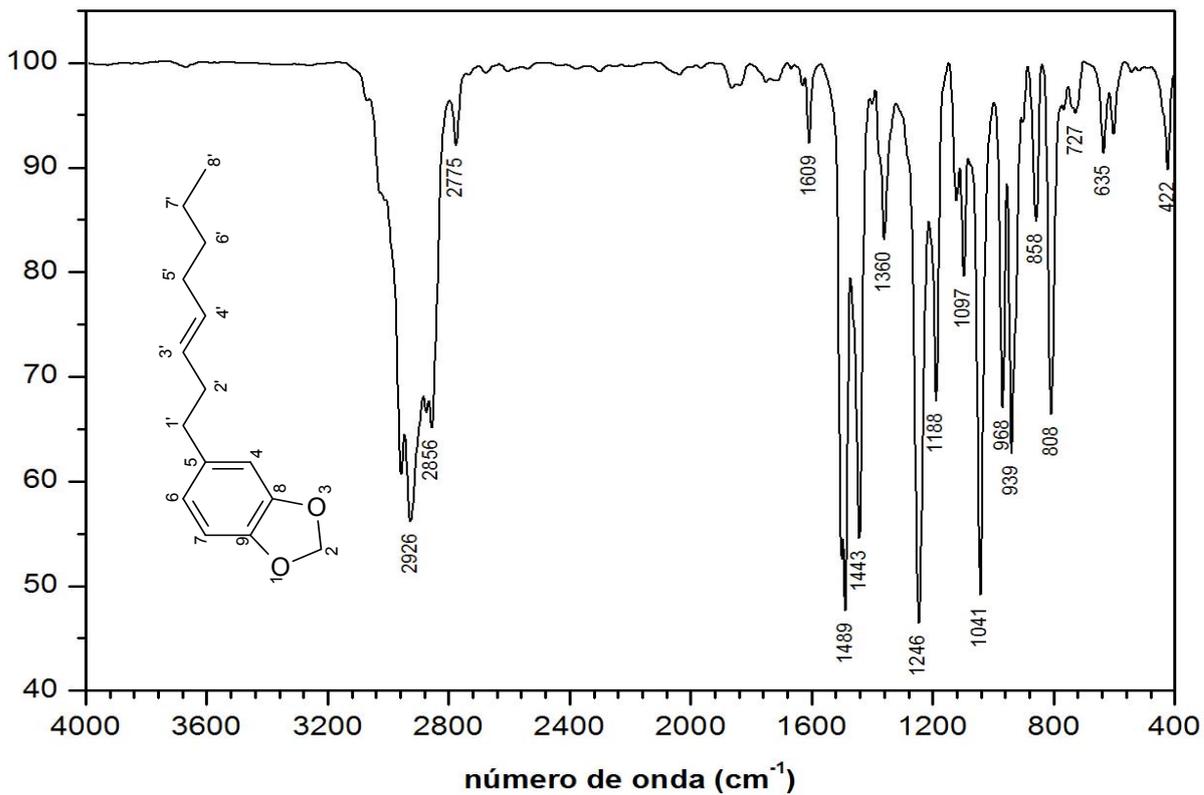


Figura 27. Espectro no infravermelho (filme) de 3.

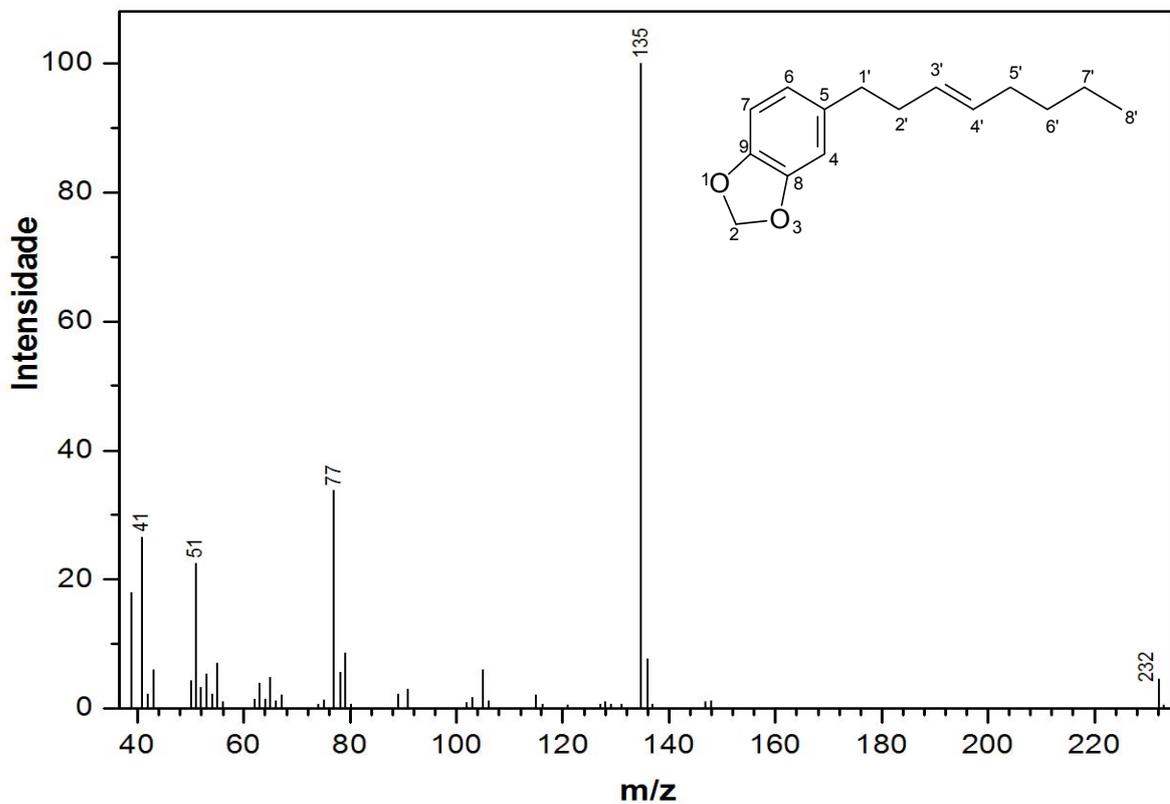
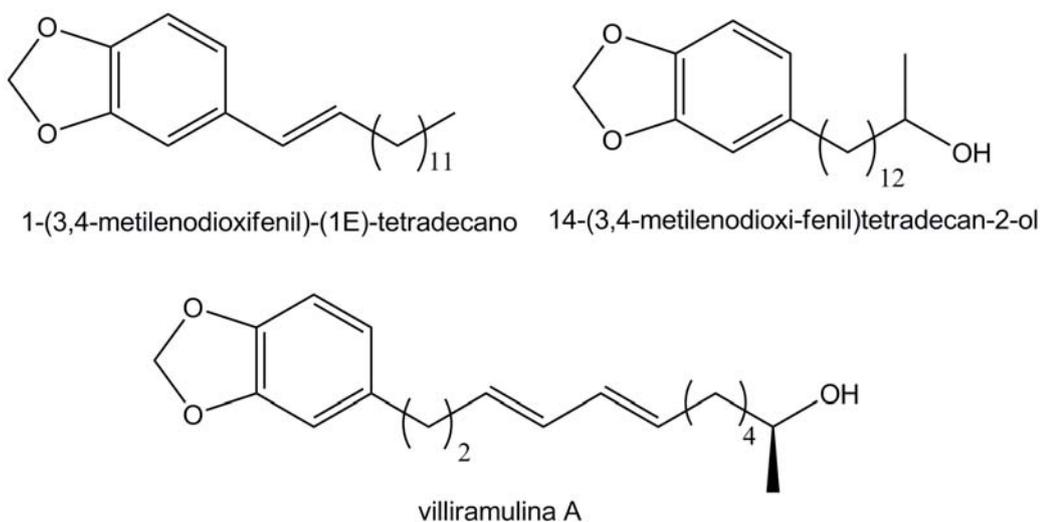


Figura 28. Espectro de massas de 3.

A estereoquímica *trans* da ligação dupla foi determinada pela interpretação dos deslocamentos químicos do RMN de ^{13}C . Os deslocamentos químicos dos carbonos alílicos (δ 32,2 e 34,7) foram comparados com os deslocamentos químicos calculados para (3*E*)-dec-3-en-1-ilbenzeno (δ 34,8 e 33,2) e (3*Z*)-dec-3-en-1-ilbenzeno (δ 29,7 e 27,8) (Orjala *et al.*, 1998). Esta atribuição também pode ser confirmada pelo espectro no IV, o qual mostrou uma absorção intensa em 968 cm^{-1} , como esperado para ligação dupla *trans*. A absorção característica para alquenos *cis*-substituídos é uma banda forte que ocorre entre 730 e 650 cm^{-1} (Socrates, 2001).

Compostos com estruturas similares foram isolados de *Piper sarmentosum* (1-(3,4-metilenodioxifenil)-(1*E*)-tetradecano), *Piper attenuatum* (14-(3,4-metilenodioxifenil)tetradecan-2-ol) e *Piper villiramulina* (villiramulina A) (Parmar *et al.*, 1997).



Gibbilimbol B (6)

O composto **6** possui estrutura semelhante ao composto **3**, porém com um anel aromático *p*-hidróxi-substituído e com tamanho da cadeia lateral maior. O

espectro de RMN de ^1H (Tabela 13 e Figura 30) mostra a presença de um grupo OH (δ 4,96; sl) e dupletos típicos de acoplamentos *orto* em δ 6,75 ((d, 2H, $J_{2/6, 3/5} = 8,3$ Hz; H2 e H6) e δ 7,04 (d, 2H, $J_{3/5, 2/6} = 8,3$ Hz; H3 e H5) referentes a dois pares de hidrogênios equivalentes, atribuídos a um anel aromático *para* substituído. Além destes, observou-se a presença de uma ligação dupla (δ 5,43; 2H, H3' e H4'), confirmando-se pela análise do RMN de ^{13}C (Tabela 13 e Figura 31) (δ 129,3; C3' e 131,2; C4'), um grupo metileno benzílico (δ 2,60, t, 2H, $J_{1',2'} = 7,9$ Hz; H1'), dois metilenos alílicos (δ 1,95; m, 2H, H5' e 2,26; m, 2H, H2'), quatro grupos metilênicos (δ 1,19-1,38; m, 8H, H6', H7', H8' e H9') e um metílico (δ 0,89; t, 3H, $J_{10',9'} = 6,2$ Hz; H10').

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 13 e Figura 31), foi observado os sinais referentes ao fenol *para* substituído [δ 115,0 (C2 e C6), 129,5 (C3 e C5), 134,4 (C4) e 153,5 (C1)] e os dez sinais referentes à cadeia lateral do alquenilfenol. As atribuições foram também confirmadas pela análise do espectro de DEPT 135 (Figura 32).

A estereoquímica *trans* da ligação dupla foi determinada pela comparação com o dec-3-en-1-ilbenzeno, conforme explicado para o composto **3**.

O espectro de massas (Figura 34) obtido para o alquenilfenol ($[\text{M}^+]$ em m/z 232) está consistente com sua fórmula molecular ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}$). O pico base em m/z 107 refere-se à quebra benzílica (Figura 29) e os fragmentos em m/z 91 e 77 ao íon tropílio e ao cátion fenila, respectivamente.

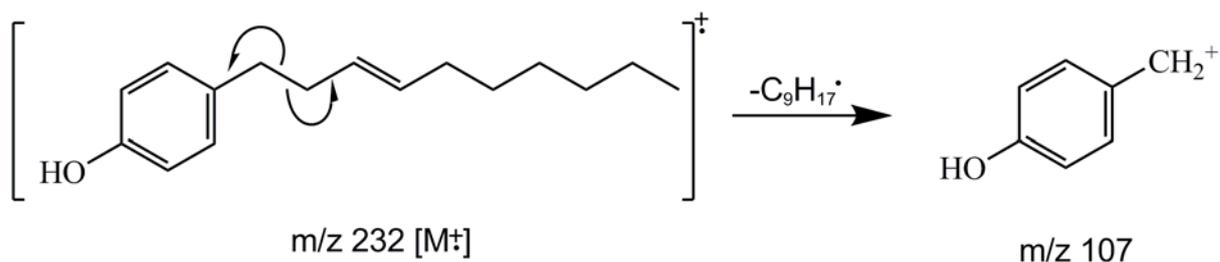
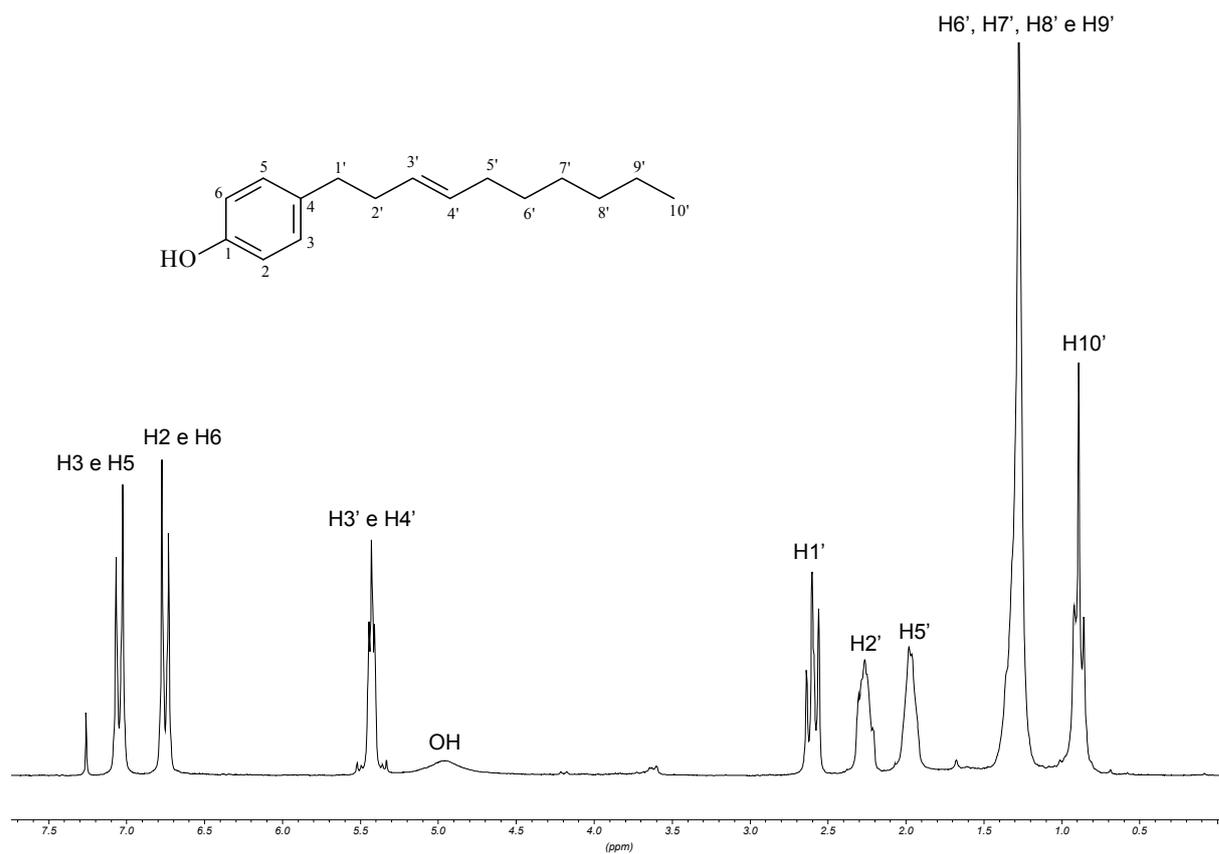
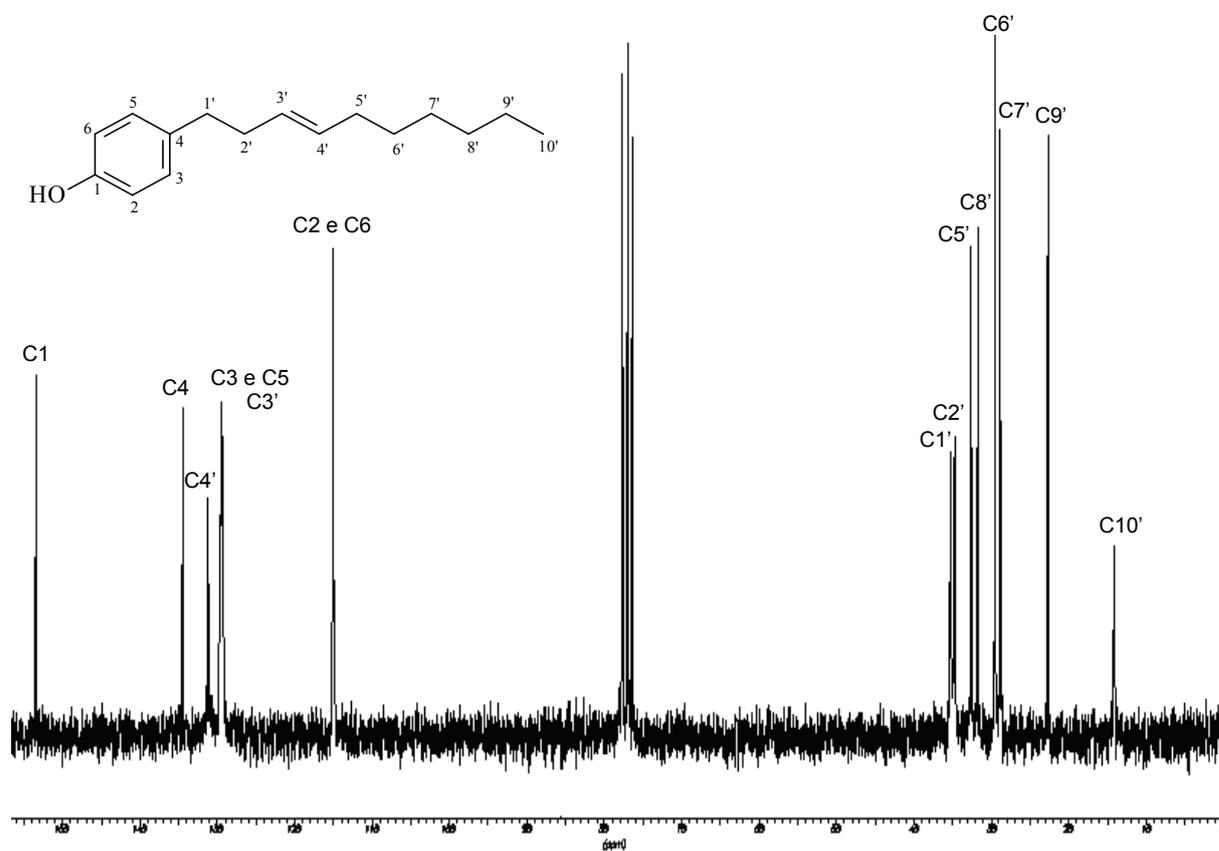


Figura 29. Fragmentação referente à formação do pico base de **6** no espectro de massas.

O espectro no IV (Figura 33) de **6** apresentou bandas em 3379 cm^{-1} (sinal largo referente ao estiramento OH), 1609 cm^{-1} (estiramento C=C), 1514 cm^{-1} (estiramento C=C de aromáticos) e 966 cm^{-1} (estiramento fora do plano C-H de ligação dupla *trans*).

Tabela 13. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN de 6 (200 e 50 MHz, δ , CDCl_3).

6		
	^1H (mul, J_{Hz})	^{13}C
1		153,5 (C)
2	6,75 (d, 8,3)	115,0 (CH)
3	7,04 (d, 8,3)	129,5 (CH)
4		134,4 (C)
5	7,04 (d, 8,3)	129,5 (CH)
6	6,75 (d, 8,3)	115,0 (CH)
1'	2,60 (t, 7,9)	35,2 (CH_2)
2'	2,26 (m)	34,7 (CH_2)
3'	5,43 (m)	129,3 (CH_2)
4'	5,43 (m)	131,2 (CH_2)
5'	1,95 (m)	32,6 (CH_2)
6'	1,19-1,38 (m)	29,5 (CH_2)
7'	1,19-1,38 (m)	28,8 (CH_2)
8'	1,19-1,38 (m)	31,7 (CH_2)
9'	1,19-1,38 (m)	22,6 (CH_2)
10'	0,89 (t, 7,0)	0,89 (CH_3)
OH	4,96 (sl)	

Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 6.Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 6.

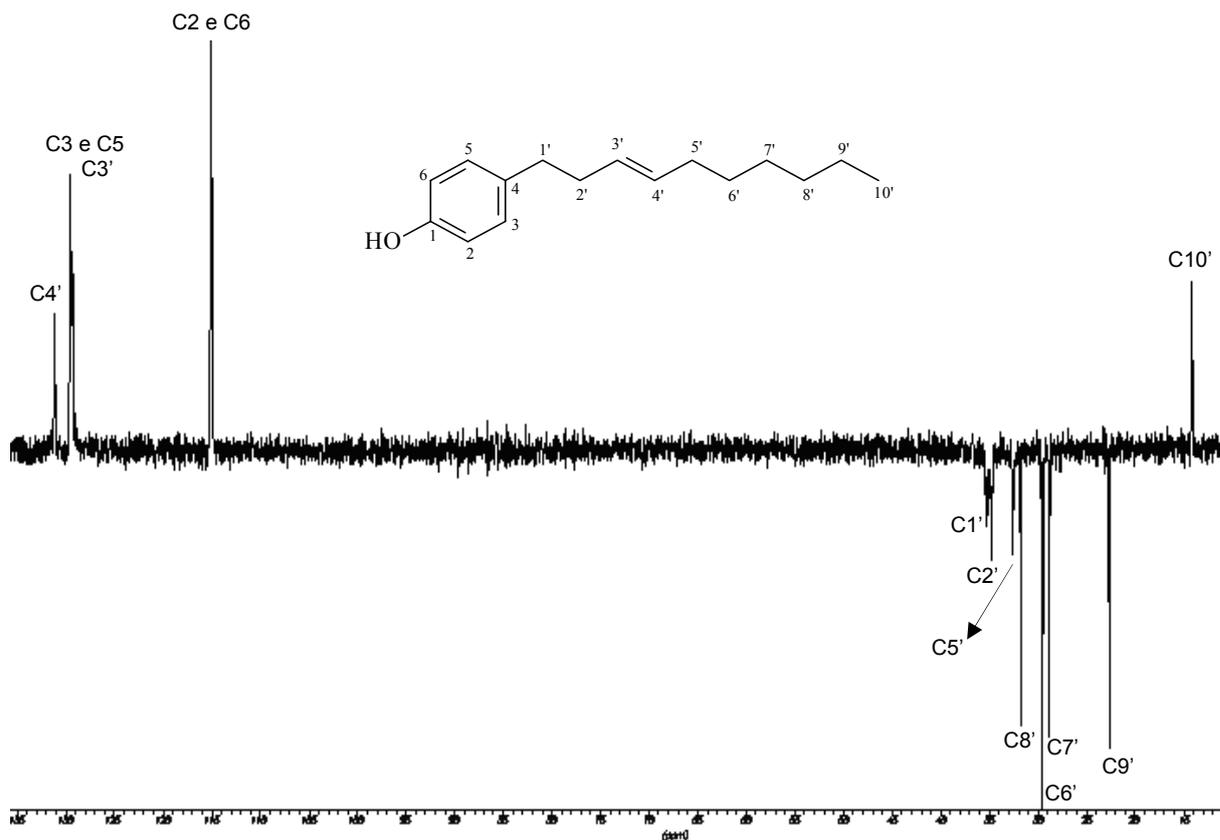


Figura 32. Espectro de DEPT 135 (50 MHz, CDCl₃) de 6.

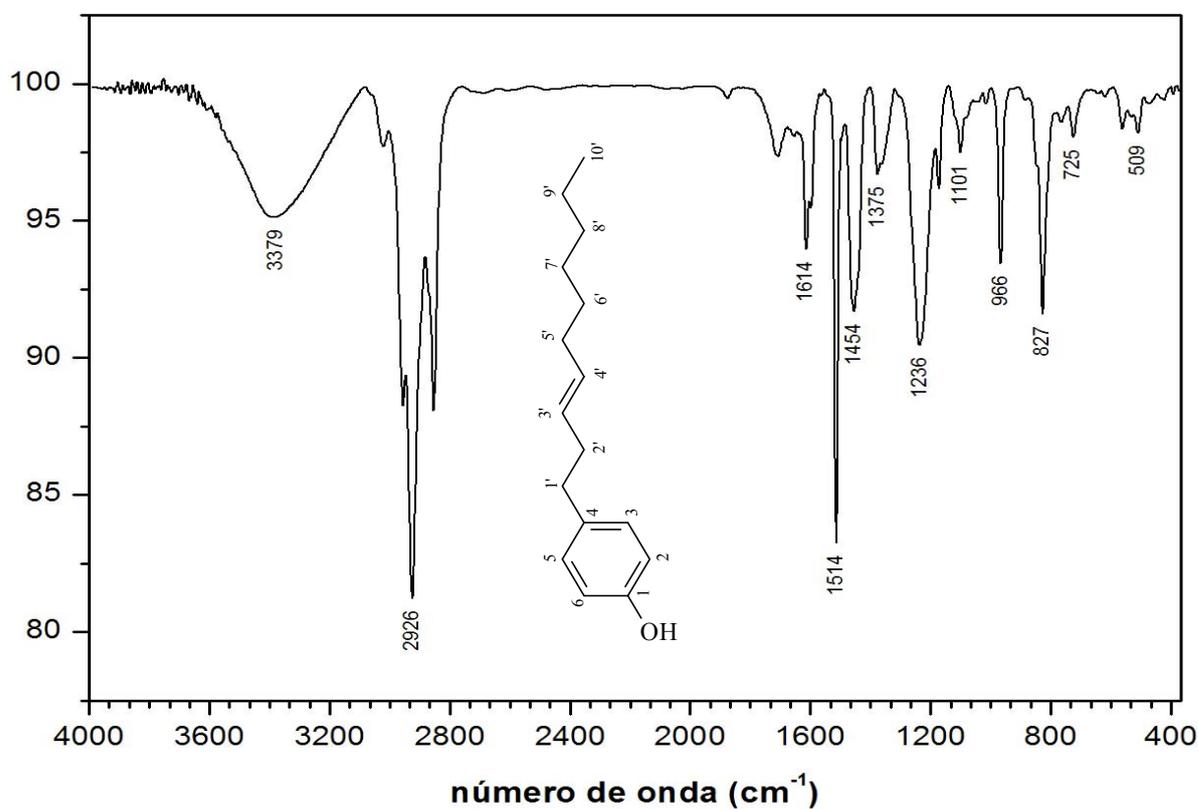


Figura 33. Espectro no infravermelho (filme) de 6.

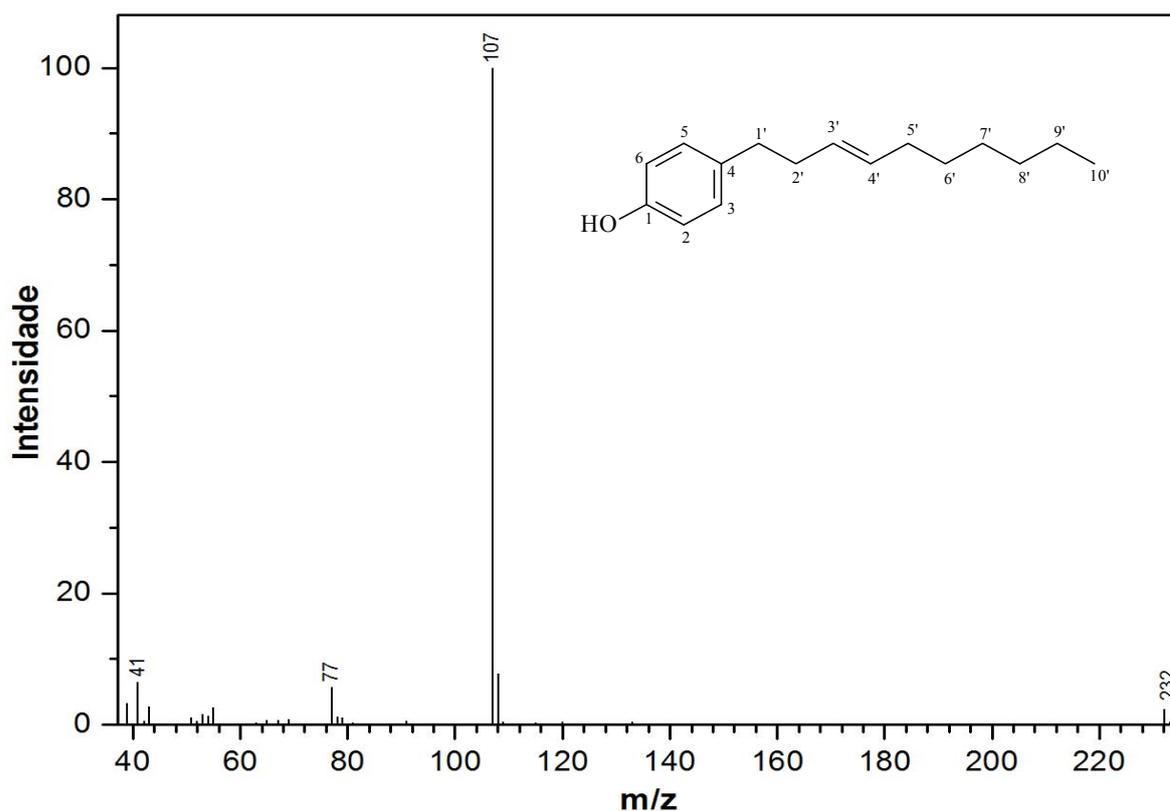


Figura 34. Espectro de massas de 6.

Este composto foi anteriormente isolado por Orjala *et al.* (1998) das folhas de *Piper gibbilimum* (Piperaceae), que é usada em Papua-Nova Guiné como um anti-séptico para curar abscessos e ulceração da pele, e também como antifebril. Quatro novos alquenilfenóis foram isolados desta *Piper*, denominados gibbilimbols A-D (Figura 35), sendo o 4-[(3E)-dec-3-en-1-il]fenol (6), denominado gibbilimbol B. Estes compostos exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* e foram tóxicos para o camarão de salmoura (*Artemia salina*) (Rali *et al.*, 2007).

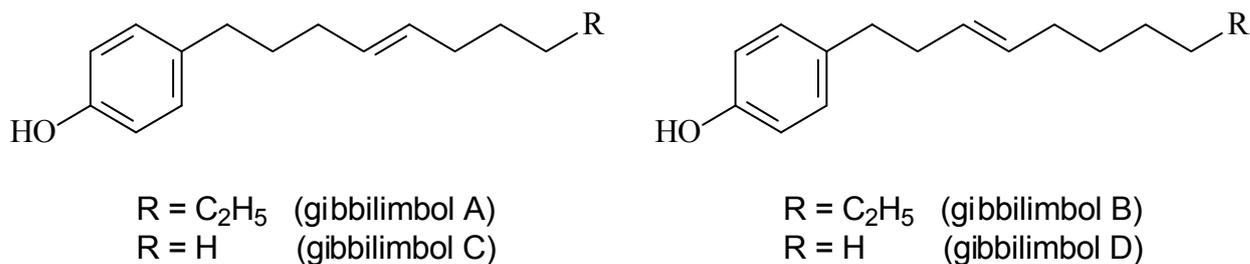
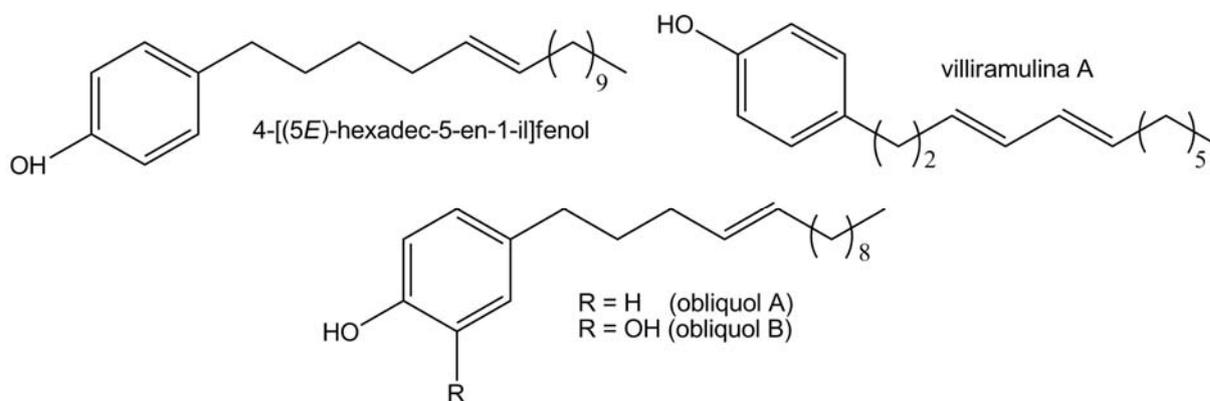


Figura 35. Estruturas dos gibbilimbols A-D.

O gênero *Piper* tem sido intensamente estudado, e alquenilfenóis como os gibbilimbols A-D têm sido raramente isolados (Sengupta e Ray, 1987). Existe reportado na literatura a ocorrência do alquenilfenol C-16 (4-[(5E)-hexadec-5-en-1-il]fenol) em *P. hispidum* (Vieira *et al.*, 1980), villiramulina B em *P. villiramulum* (Parma *et al.*, 1997) e obliquol A e B em *P. obliquum* (Valdivia *et al.*, 2008).



Shizuka-acoradienol (5)

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 14 e Figura 38) foi observada a presença de quinze sinais, os quais, com exceção dos simples, foram observados como três quartetos, quatro tripletos e seis dupletos no espectro de DEPT 135 (Figura 39). Quatro sinais são característicos de ligações duplas [δ 107,8 (C15), 127,3 (C9),

140,2 (C10) e 146,7 (C8)] e um carbinólico [δ 67,7 (C7)]. Em decorrência disso, a fórmula molecular deste composto foi definida como $C_{15}H_{26}O$, como indicado pelo espectro de massas (Figura 40), sendo que sua estrutura apresenta três deficiências de hidrogênios, referentes a duas ligações duplas e a dois anéis. O fragmento de massa em m/z 202 corresponde à perda de uma molécula de água, característico de alcoóis (Figura 36).

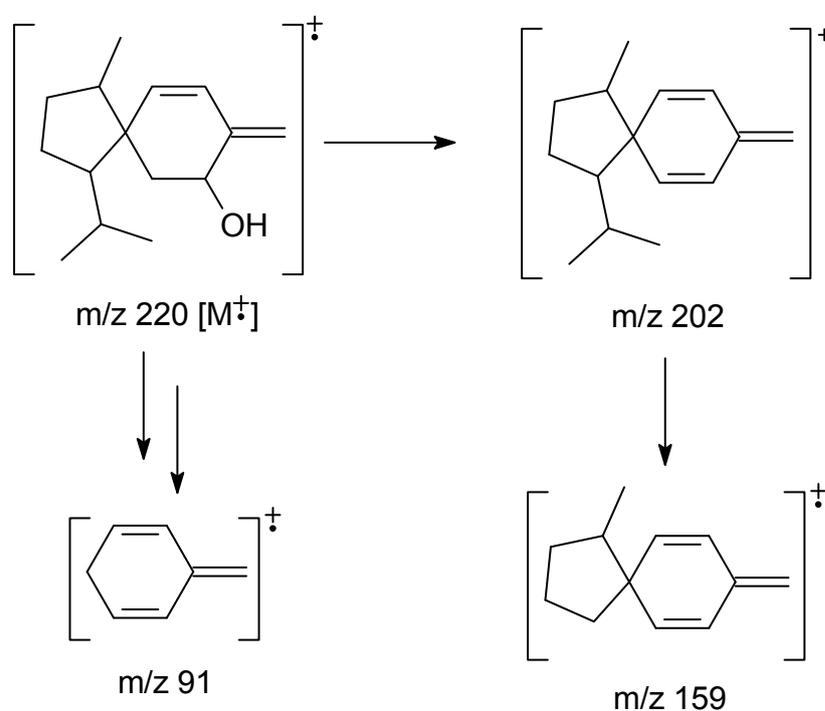


Figura 36. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas do composto 5.

No espectro de RMN de 1H (Tabela 14 e Figura 37) foram observados dois dupletos em δ 0,86 ($J = 6,6$ Hz) e em δ 0,90 ($J = 6,6$ Hz) atribuídos a dois grupos metílicos, de um grupo isopropílico e um dupletos em δ 0,75 ($J = 6,1$ Hz) atribuído ao H14. Além disso, há dois simpletos em δ 4,94 e 5,10 indicativos da presença de uma ligação dupla exocíclica; dois hidrogênios olefínicos orientados em *cis* (δ 5,32; d, 1H, $J_{9,10} = 9,7$ Hz; H9 e 6,18; d, 1H, $J_{10,09} = 9,7$ Hz; H10) e um metínico carbinólico

(δ 4,46; m, 1H, H7). A análise dos dados permitiu definir o composto como sendo um sesquiterpeno com esqueleto acorano (Connolly e Hill, 1999). Na Tabela 14 também são apresentados os dados de RMN de ^{13}C encontrados na literatura para o composto 5 e o 1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol.

Tabela 14. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN do 1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol (175 MHz, δ , CDCl_3) e 5 (200 e 50 MHz, δ , CDCl_3).

	1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol*		5	
	^{13}C	^1H (mult, J_{Hz})	^{13}C	$^{13}\text{C}^{**}$
1	57,3 (CH)	1,16-1,86 (m)	57,8 (CH)	57,9 (CH)
2	26,3 (CH_2)	1,16-1,86 (m)	27,3 (CH_2)	27,3 (CH_2)
3	31,5 (CH_2)	1,16-1,86 (m)	29,2 (CH_2)	29,3 (CH_2)
4	47,4 (CH)	1,16-1,86 (m)	47,2 (CH)	47,3 (CH)
5	51,0 (C)		50,8 (C)	50,9 (C)
6a	45,6 (CH_2)	1,16-1,86 (m)	31,4 (CH_2)	31,5 (CH_2)
6b		1,16-1,86 (m)		
7	67,7 (CH)	4,46 (m)	67,7 (CH)	67,8 (CH)
8	147,0 (C)		146,7 (C)	146,8 (C)
9	127,7 (CH)	5,32 (d, 9,7)	127,3 (CH)	127,4 (CH)
10	131,9 (CH)	6,18 (d, 9,7)	140,2 (CH)	140,1 (CH)
11	29,5 (CH)	1.61-1.80 (m)	30,4 (CH)	30,4 (CH)
12	23,4 (CH_3)	0,86 (d, 6,6)	22,8 (CH_3)	22,9 (CH_3)
13	21,6 (CH_3)	0,90 (d, 6,6)	23,4 (CH_3)	23,4 (CH_3)
14	17,9 (CH_3)	0,75 (d, 6,1)	13,6 (CH_3)	13,7 (CH_3)
15a	108,2 (CH_2)	4,94 (sl)	107,8 (CH_2)	107,7 (CH_2)
15b		5,10 (sl)		

* (Harinantenaina *et al.*, 2005); ** (Kawabata *et al.*, 1984)

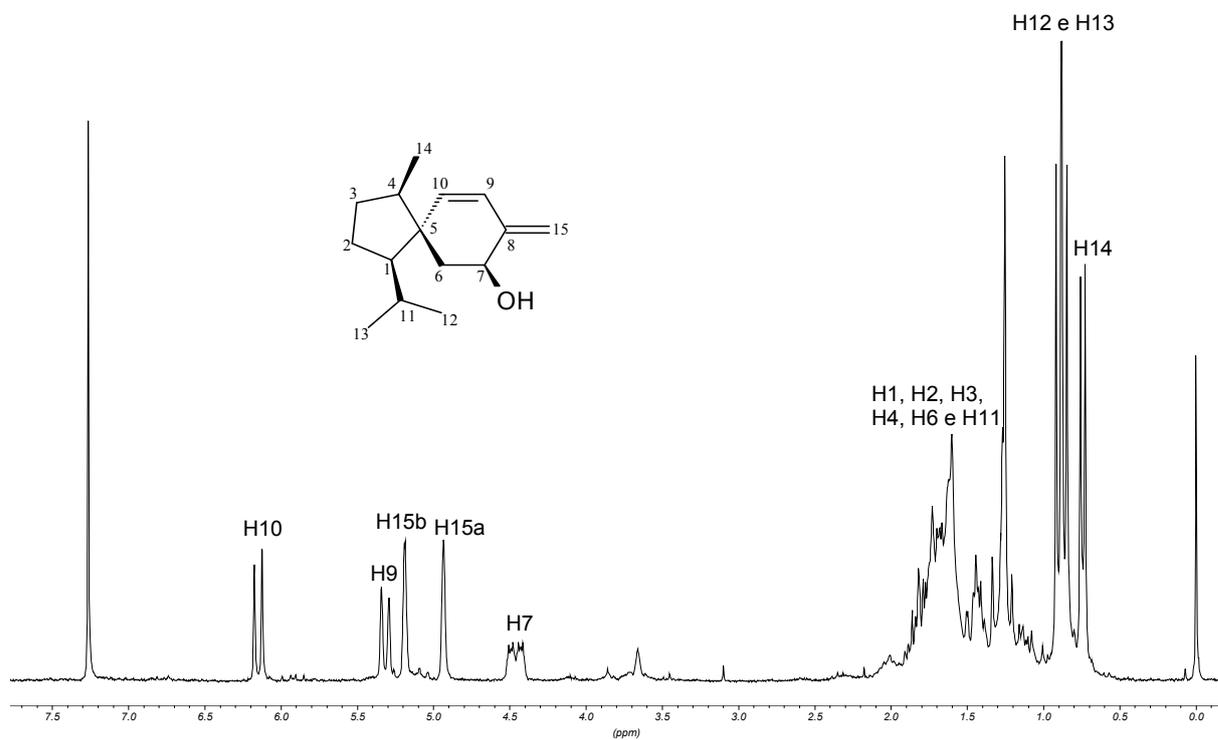


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 5.

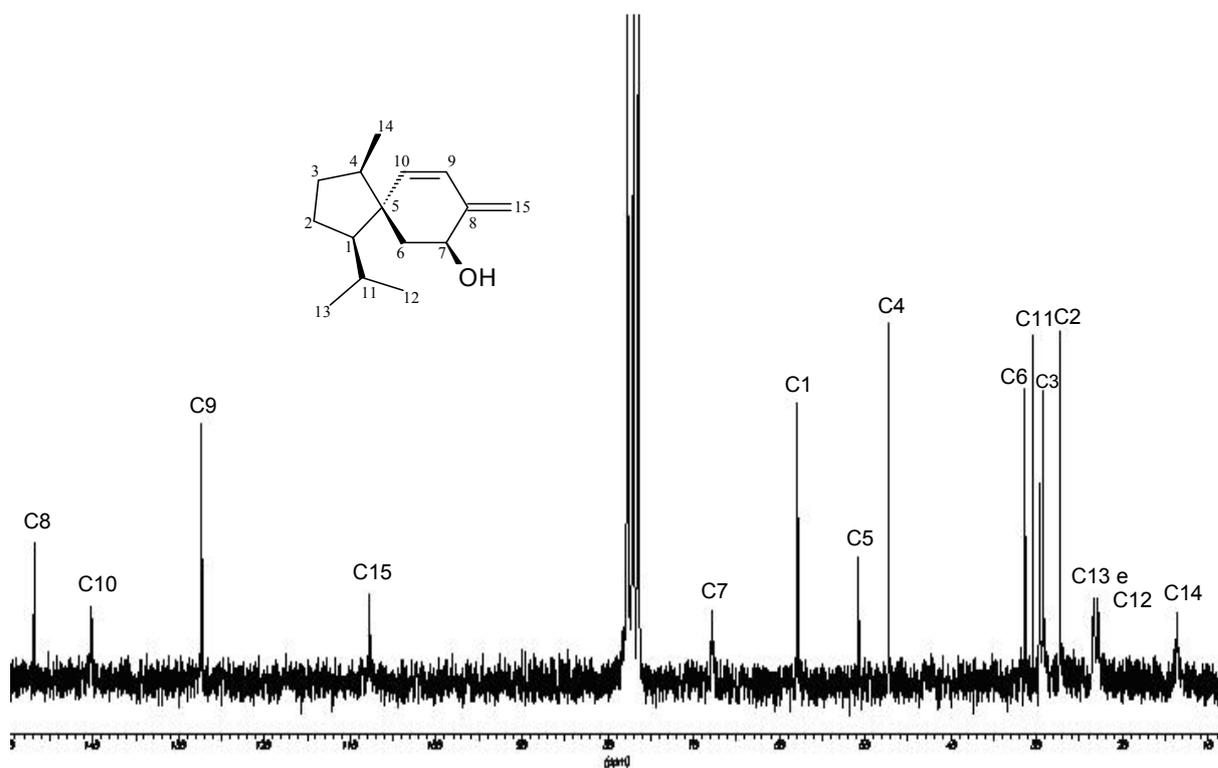


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 5.

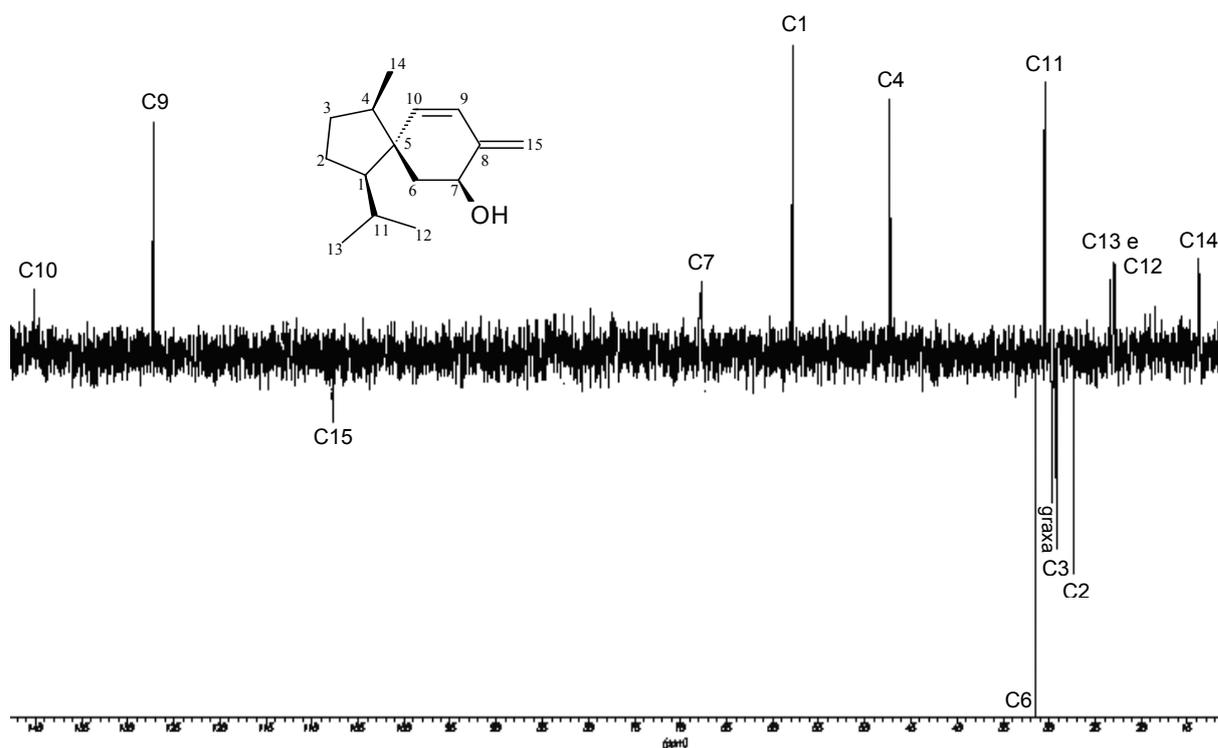
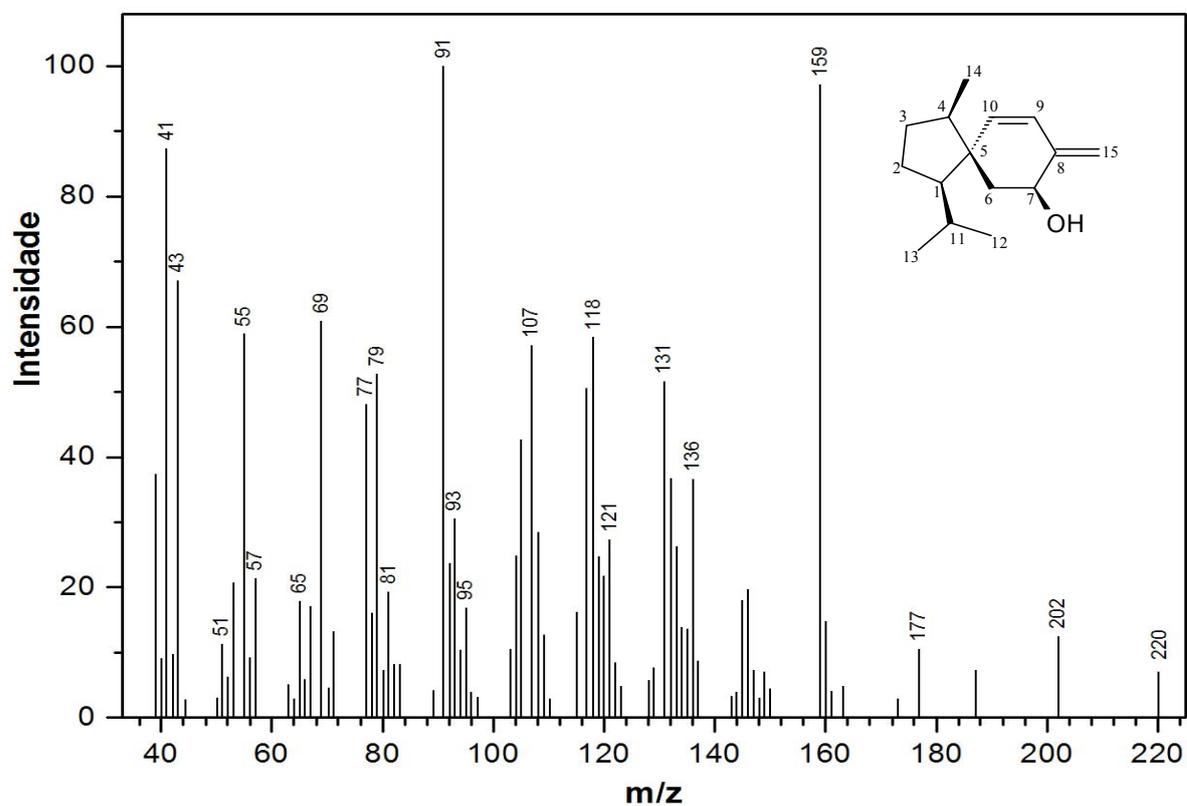
Figura 39. Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de 5.

Figura 40. Espectro de massas de 5.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , estão de acordo com o shizuka-acoradienol (**5**) (Tabela 14), isolado anteriormente de *Chloranthus japonicus* (Kawabata *et al.*, 1984). Recentemente, Harinantenaina *et al.* (2005) isolaram o mesmo composto de *Bazzania madagassa*, um musgo, mas com variações nas configurações nos carbonos C1, C4 e C7. Através da comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os da literatura foi possível determinar a configuração relativa da molécula. A Figura 41 mostra a configuração do acoranodienol isolado por Harinantenaina *et al.* e alguns valores de deslocamentos de RMN de ^{13}C que diferenciam do sesquiterpeno isolado, tornando-se possível determinar sua estereoquímica. O sesquiterpeno **5** é inédito em *Piper*.

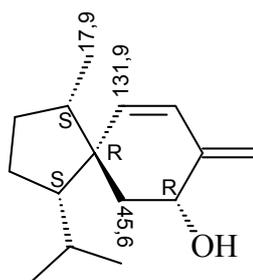


Figura 41. Estrutura do 1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol.

Acetato de shizuka-acoradienolila (**4**)

O sesquiterpeno **4** possui a mesma estrutura e configuração do esqueleto sesquiterpênico do composto **5**, confirmado pelos seus dados espectroscópicos, sendo a principal diferença entre eles o fato de o composto **4** ser um derivado acetilado do acoradienol. As configurações relativas também foram determinadas por comparação com os dados de RMN de ^{13}C do 1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol (Tabela 15).

No espectro de RMN de ^1H (Tabela 15, Figura 42 e Figura 43) foram observados dois dupletos em δ 0,87 ($J = 6,5$ Hz) e em δ 0,94 ($J = 6,5$ Hz) atribuídos a dois grupos metílicos, de um grupo isopropílico e um duplete em δ 0,75 ($J = 6,4$ Hz) atribuído ao H14. Além disso, dois simpletos em δ 4,94 e 5,10 confirmam a presença de uma ligação dupla exocíclica; dois hidrogênios em δ 5,35 (d, 1H, $J_{9,10} = 9,9$; H9) e δ 6,15 (d, 1H, $J_{10,09} = 9,9$; H10) referem-se a carbonos olefínicos orientados em *cis* e o sinal em δ 5,62 (m, 1H, H7) referente a um metínico. A análise dos dados confirma o esqueleto acorano acetilado.

A presença do grupo acetato pode ser confirmada pela presença do simpleto em δ 2,14 (H17) no RMN de ^1H , e os sinais em δ 21,3 (C17) e a carbonila em δ 170,6 (C16) no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) e o estiramento de carbonila em 1738 cm^{-1} no espectro no infravermelho (Figura 46). Outra diferença entre os dois sesquiterpenos são os deslocamentos químicos referentes ao H7 (δ 5,62), C7 (δ 70,1) e C6 (δ 27,4), devido ao grupo acetato ligado ao C7. Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 15 e Figura 44) observou-se a presença de dezessete sinais e no espectro de DEPT 135 (Figura 45) foram observados quatorze sinais de carbono correspondentes aos quatro quartetos, quatro tripletos e seis dupletos.

Tabela 15. Deslocamentos químicos observados nos espectros RMN do 1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol (175 MHz, δ , CDCl₃) e 4 (500 e 75 MHz, δ , CDCl₃).

	1S, 4S, 5R, acora-8(15),9-dien-7R-ol*	4		
	¹³ C	¹ H (mult, ρ)	¹ H- ¹ H COSY	¹³ C
1	57,3 (CH)	1,10 (m)		57,9 (CH)
2	26,3 (CH ₂)	1,60-1,90 (m)		27,3 (CH ₂)
3	31,5 (CH ₂)	1,22-1,43 (m)	H-4	29,3 (CH ₂)
4	47,4 (CH)	1,60-1,90 (m)	H-3, H-14	47,2 (CH)
5	51,0 (C)			50,5 (C)
6a	45,6 (CH ₂)	1,36 (t, 12,8)	H-7, H-6b	27,4 (CH ₂)
6b		2,12-2,19 (m)	H-6a	
7	67,7 (CH)	5,62 (m)	H-6a	70,1 (CH)
8	147,0 (C)			141,7 (C)
9	127,7 (CH)	5,35 (d, 9,9)	H-10	127,2 (CH)
10	131,9 (CH)	6,15 (d, 9,9)	H-9	140,1 (CH)
11	29,5 (CH)	1,61-1,80 (m)		30,2 (CH)
12	23,4 (CH ₃)	0,87 (d, 6,5)		23,1 (CH ₃)
13	21,6 (CH ₃)	0,94 (d, 6,5)		23,4 (CH ₃)
14	17,9 (CH ₃)	0,75 (d, 6,4)	H-4	13,7 (CH ₃)
15a	108,2 (CH ₂)	4,93 (sl)		108,6 (CH ₂)
15b		4,98 (sl)		
16				170,6 (C)
17		2,15 (s)		21,3 (CH ₃)

*(Harinantenaina *et al.*, 2005)

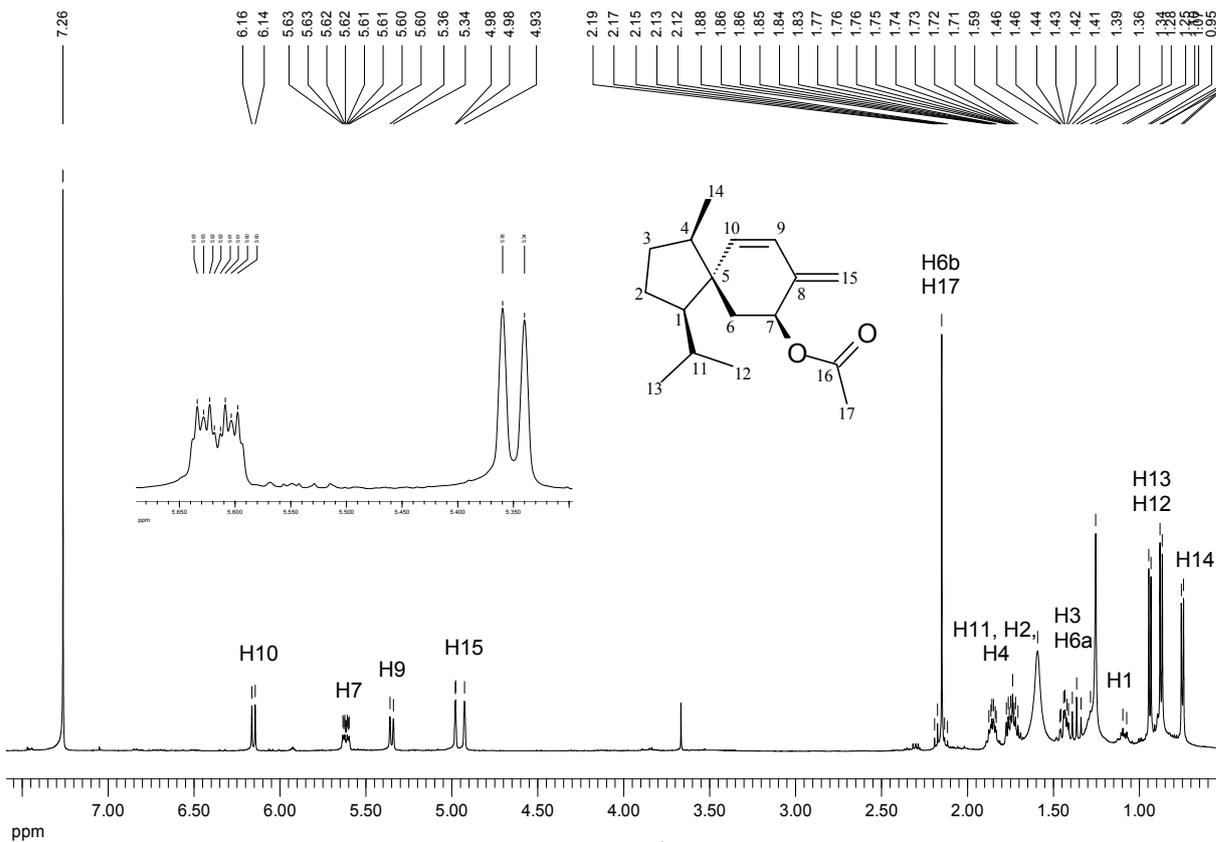


Figura 42. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 4.

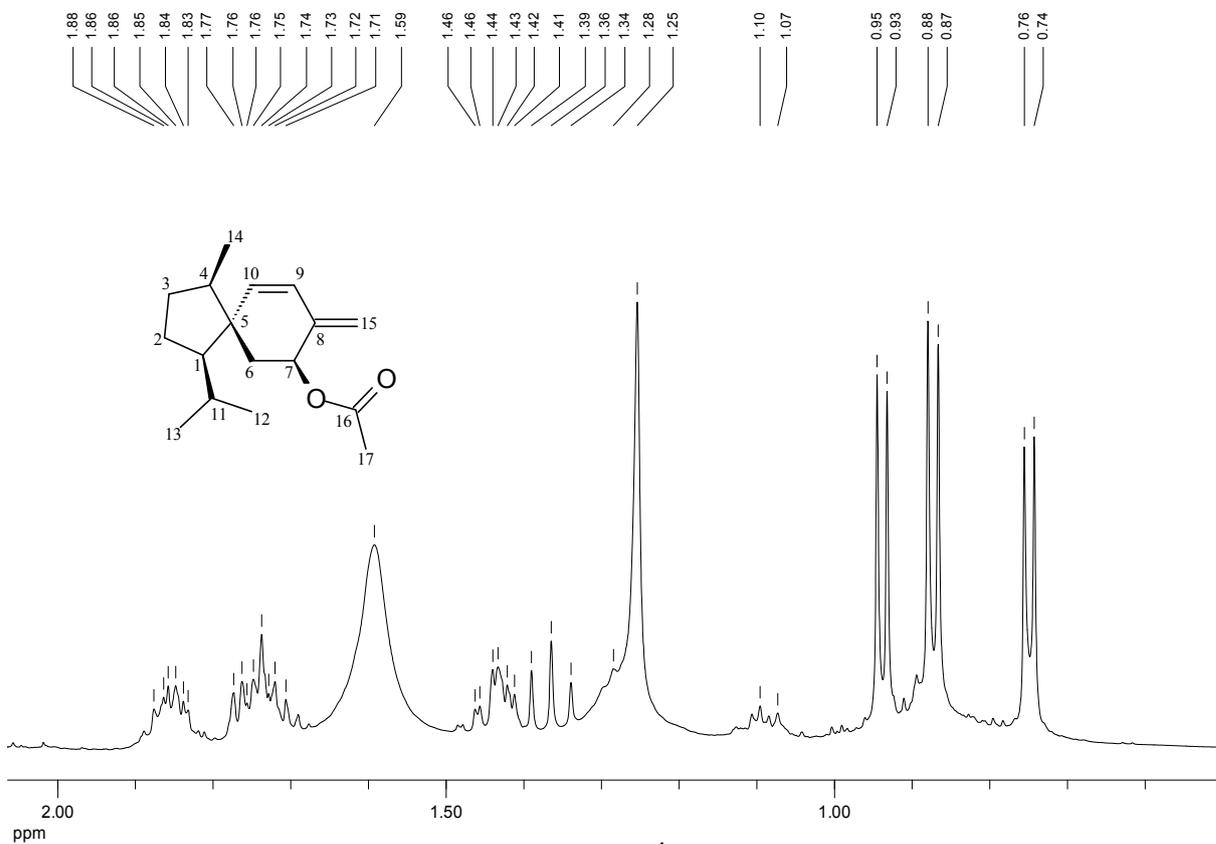
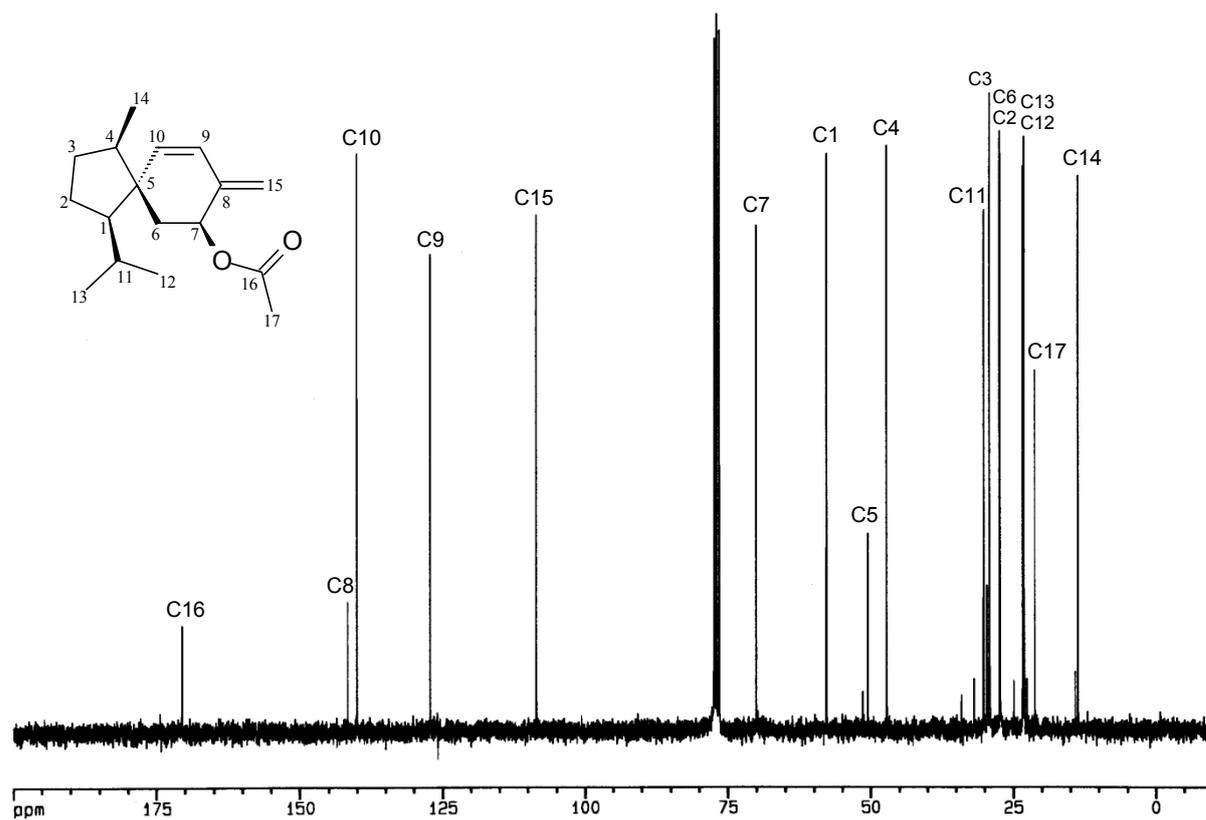
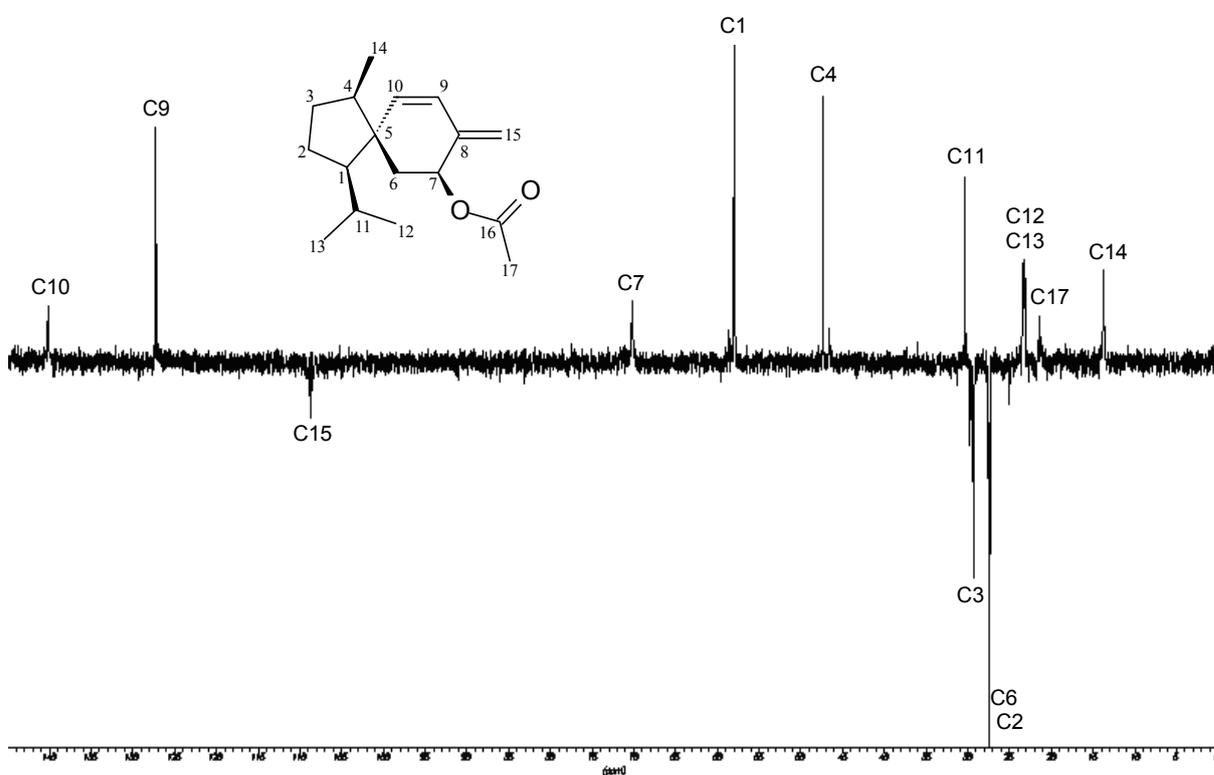


Figura 43. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 4.

Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 4.Figura 45. Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de 4.

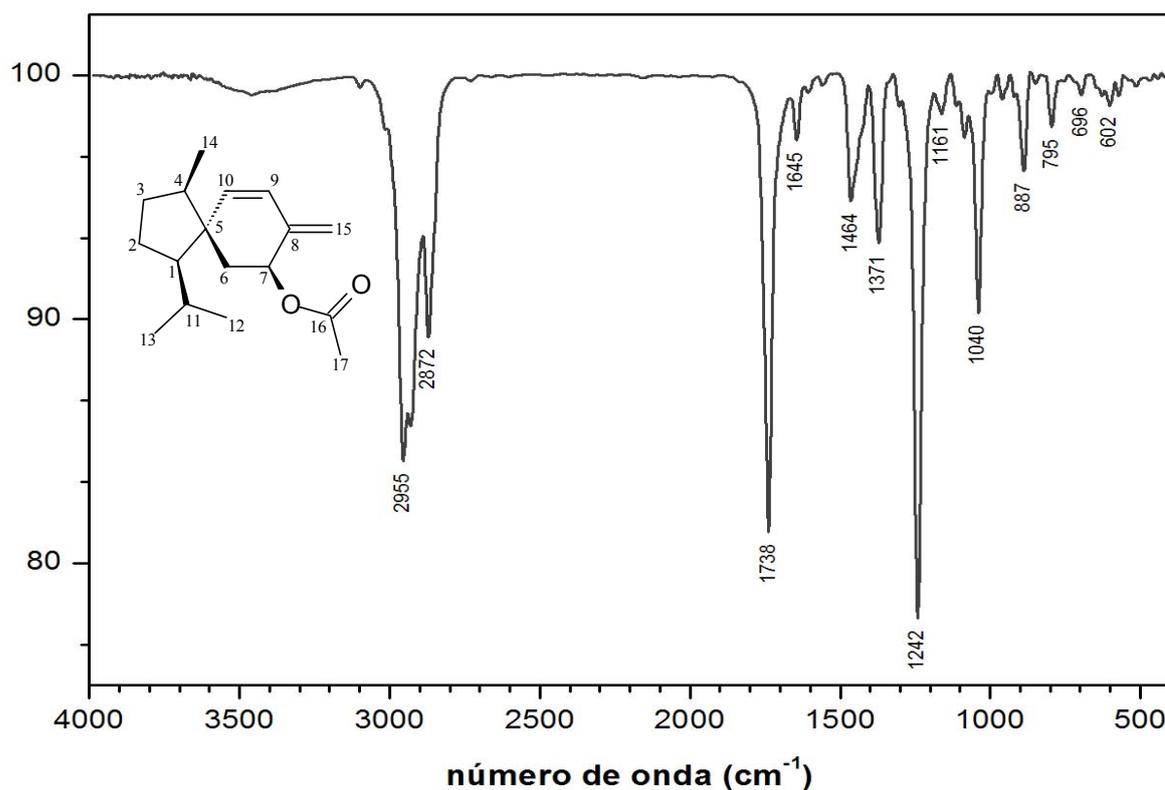


Figura 46. Espectro no infravermelho (solução, CDCl₃) de 4.

O espectro de massas (Figura 47) obtido (m/z 262) está consistente com sua fórmula molecular (C₁₇H₂₆O₂). O pico base em m/z 43 refere-se ao íon acetato (Figura 48).

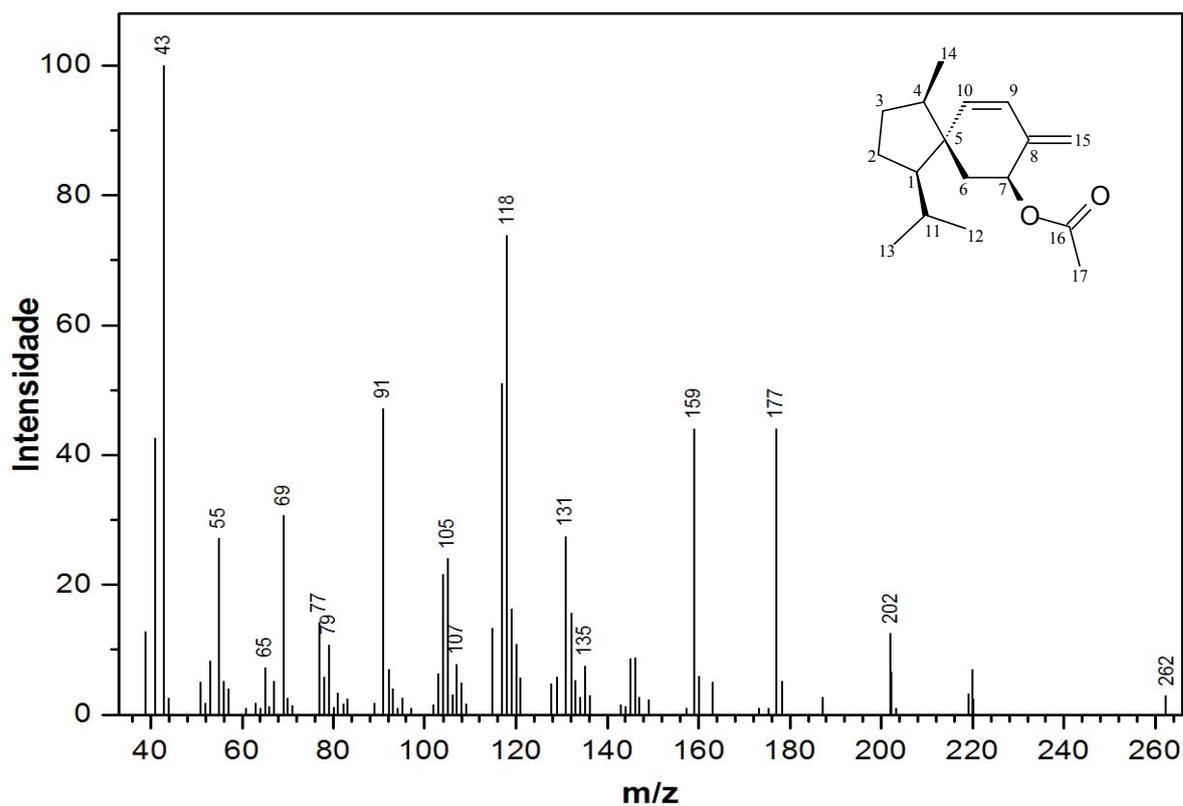


Figura 47. Espectro de massas de 4.

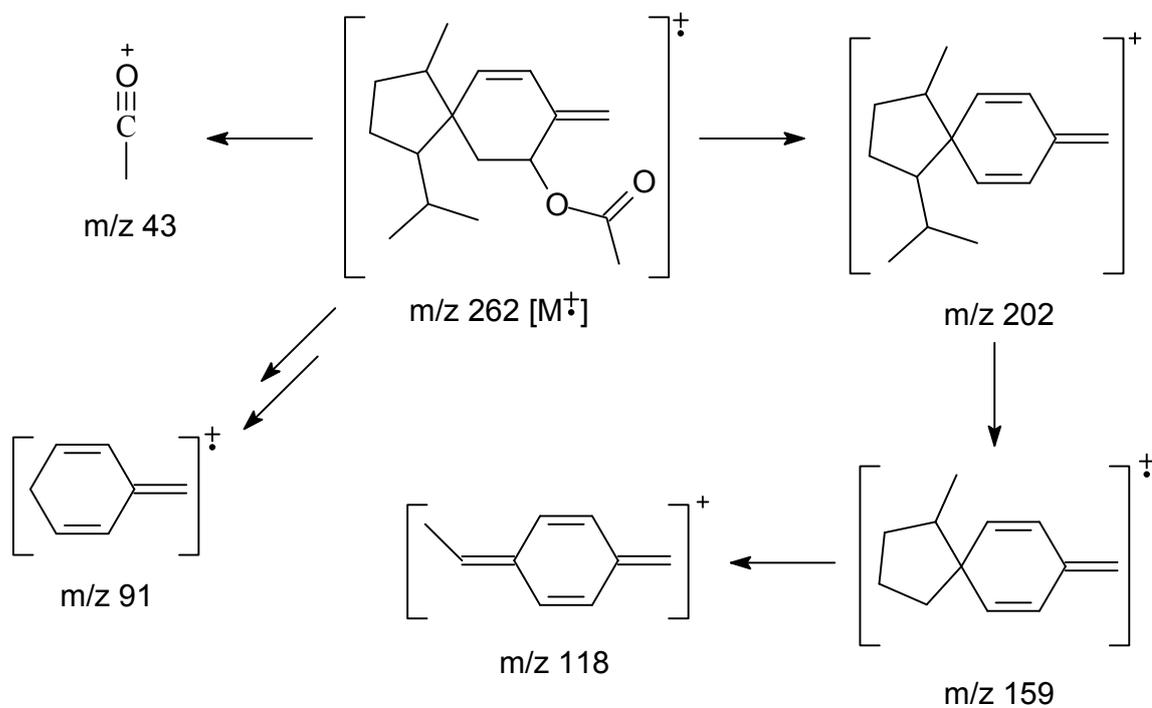


Figura 48. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas do composto 4.

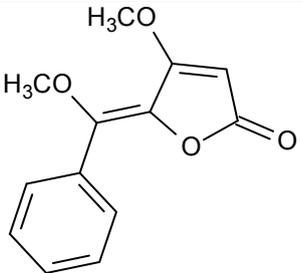
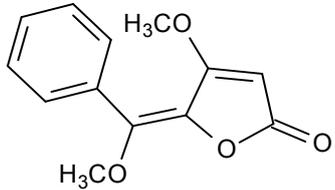
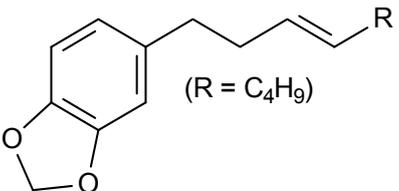
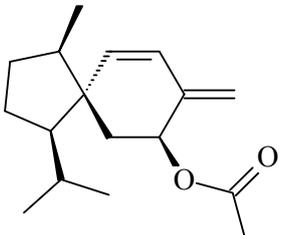
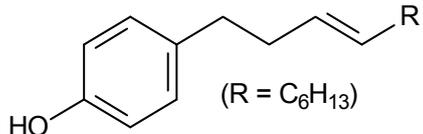
4.1.2. Metabólitos secundários das raízes, caules, folhas e frutos de *P. malacophyllum*

Com a finalidade de obter um perfil metabólico das diversas partes (raízes, caules e frutos) de *Piper malacophyllum* os extratos metanólicos foram analisados inicialmente por cromatografia planar em sílica. Essa análise revelou grande semelhança qualitativa entre os extratos das diversas partes e o extrato das folhas (fração M1), que havia sido estudado anteriormente (Lago *et al.*, 2005) (Figura 13). Uma análise com melhor resolução foi feita por CG (Figura 49). Para o cromatograma do extrato das folhas utilizou-se a fração M1. Os dados foram analisados e registrados segundo valores de tempo de retenção (t_R), percentual relativo das substâncias e espectros de massas que permitiram a identificação dos constituintes isolados e caracterizados (Tabela 16).

Pôde-se observar que os extratos das raízes, caules, folhas e frutos não apresentaram diferenças qualitativas substanciais (Figura 49). Constatou-se que as raízes, caules e frutos de *P. malacophyllum* produzem o alquenilfenol **6** como constituinte principal. Nas raízes é praticamente o único metabólito, ao contrário das folhas, onde predominaram os piperolídeos **1** e **2**.

Resumidamente, os metabólitos secundários predominantes nas raízes, caules, folhas e frutos, são predominantemente resultantes de processos mediados por policetídeo sintases (PKS) ou de biossíntese mista sempre associada a essa via.

Tabela 16. Análise dos extratos das raízes, caules, folhas e frutos de *P. malacophyllum*.

Compostos	Estruturas	t _R (min)	Partes da planta (%)*
1		35,15	Raízes (8,5) Caules (11,0) Folhas (40,5)
2		33,97	Caules (4,0) Folhas (22,1)
3		28,08	Caules (10,6) Folhas (8,0) Frutos (11,8)
4		26,84	Folhas (1,7)
6		31,41	Raízes (90,5) Caules (49,2) Folhas (18,0) Frutos (80,8)

*Percentual relativo das substâncias.

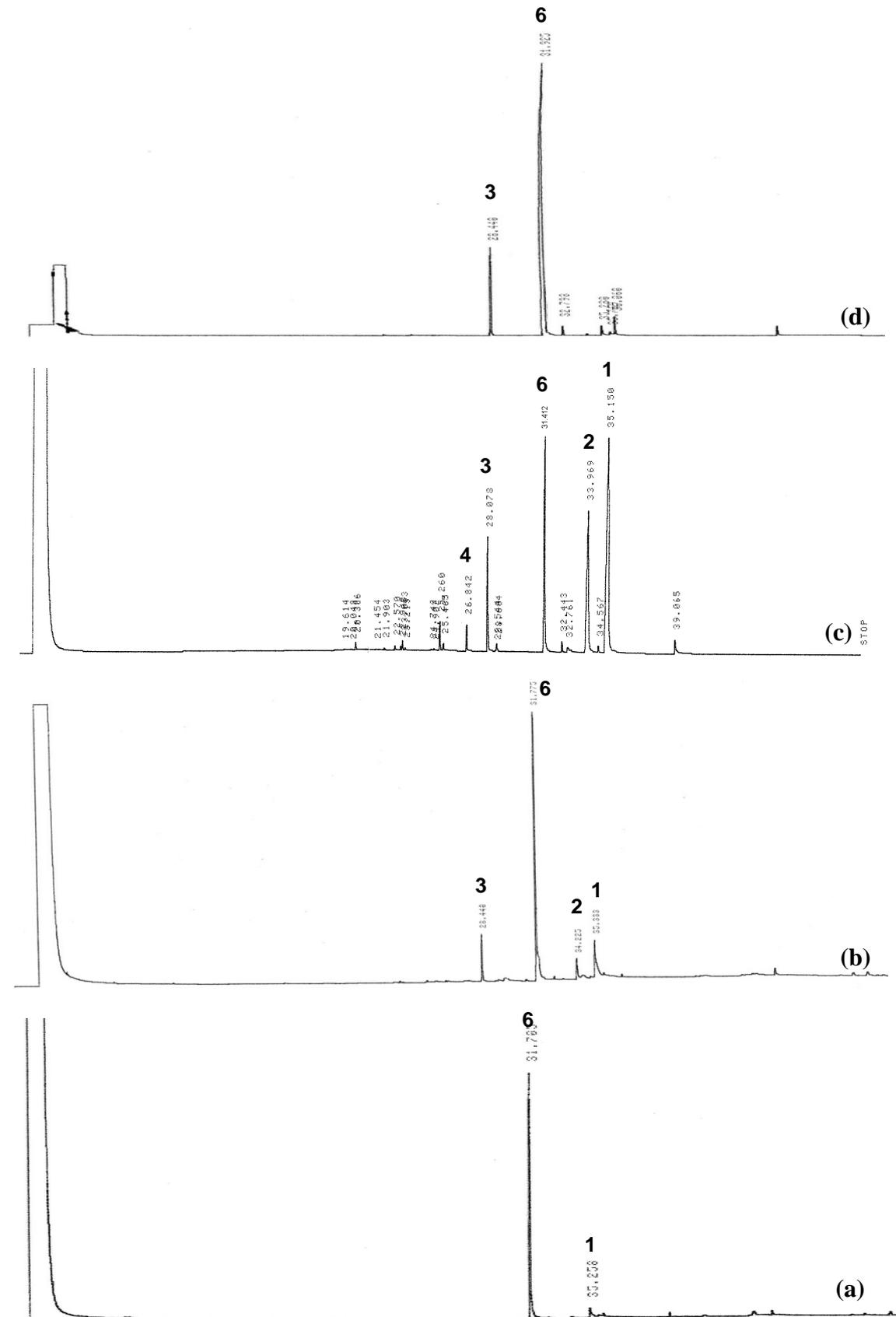


Figura 49. Cromatogramas de CG dos extratos de (a) raízes, (b) caules, (c) folhas e (d) frutos de *P. malacophyllum*.

4.1.3. Composição do óleo essencial das folhas de *P. malacophyllum*

Inúmeras espécies de *Piper* são aromáticas e como consequência seus óleos essenciais tem sido objeto de constantes estudos. Os óleos essenciais destas plantas são constituídos por uma ampla diversidade de constituintes químicos como monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanóides, aldeídos, cetonas e álcoois de cadeia longa (Rawat *et al.*, 1989). Propriedades antimicrobiana (Oyedeki *et al.*, 2005), antioxidante (Sacchetti *et al.*, 2005), antifúngica, inseticida e larvicida (Sousa *et al.*, 2008b) têm sido reportadas para os óleos essenciais de *Piper*.

O índice de Kovats é utilizado como critério para identificação de substâncias presentes em óleos essenciais desde 1950. Kovats estabeleceu que o índice de retenção de uma substância com determinado número de carbonos situar-se-ia entre os índices de retenção de duas parafinas de uma série homóloga que possuíssem números semelhantes de carbonos. Desta forma ele estabeleceu que o tempo de retenção da amostra tivesse uma relação logarítmica com os tempos de retenção das parafinas (Kovats, 1958), segundo a equação:

$$IK = 100n + 100 \frac{\log t_{R' \text{ ajust}} - \log t_{R' n}}{\log t_{R' n+1} - \log t_{R' n}}$$

Sendo que IK = Índice de Kovats, $t_{R' \text{ ajust}}$ = tempo de retenção ajustado da amostra desconhecida, $t_{R' n}$ e $t_{R' n+1}$ = tempo de retenção ajustados dos padrões anterior e posterior no cromatograma da série homóloga; n = número de carbonos do padrão anterior.

Para o ajuste dos tempos de retenção foi utilizado o tempo de retenção do octano, visto que nenhuma amostra saiu entre C8 e C9. Este tempo é descontado do tempo de retenção da amostra no cromatograma (Tabela 17 e Figura 50). Assim:

$$t_{R'} = t_R - t_{RC8}$$

onde TR = tempo de retenção do hidrocarboneto C8.

Tabela 17. Tempos de retenção corrigidos ($t_{R'}$) das parafinas na determinação do índice de Kovats.

Nº de carbonos (n)	$t_{R'}$ (min)	%RSD*	Nº de carbonos (n)	$t_{R'}$ (min)	%RSD*
9	1,90	0,09	17	34,54	0,02
10	4,90	0,05	18	38,27	0,01
11	8,83	0,06	19	41,81	0,02
12	13,25	0,05	20	45,21	0,01
13	17,80	0,03	21	48,44	0,01
14	22,26	0,03	22	51,57	0,01
15	26,58	0,02	23	55,16	0,01
16	30,65	0,02	-	-	-

* Três determinações para cada hidrocarboneto.

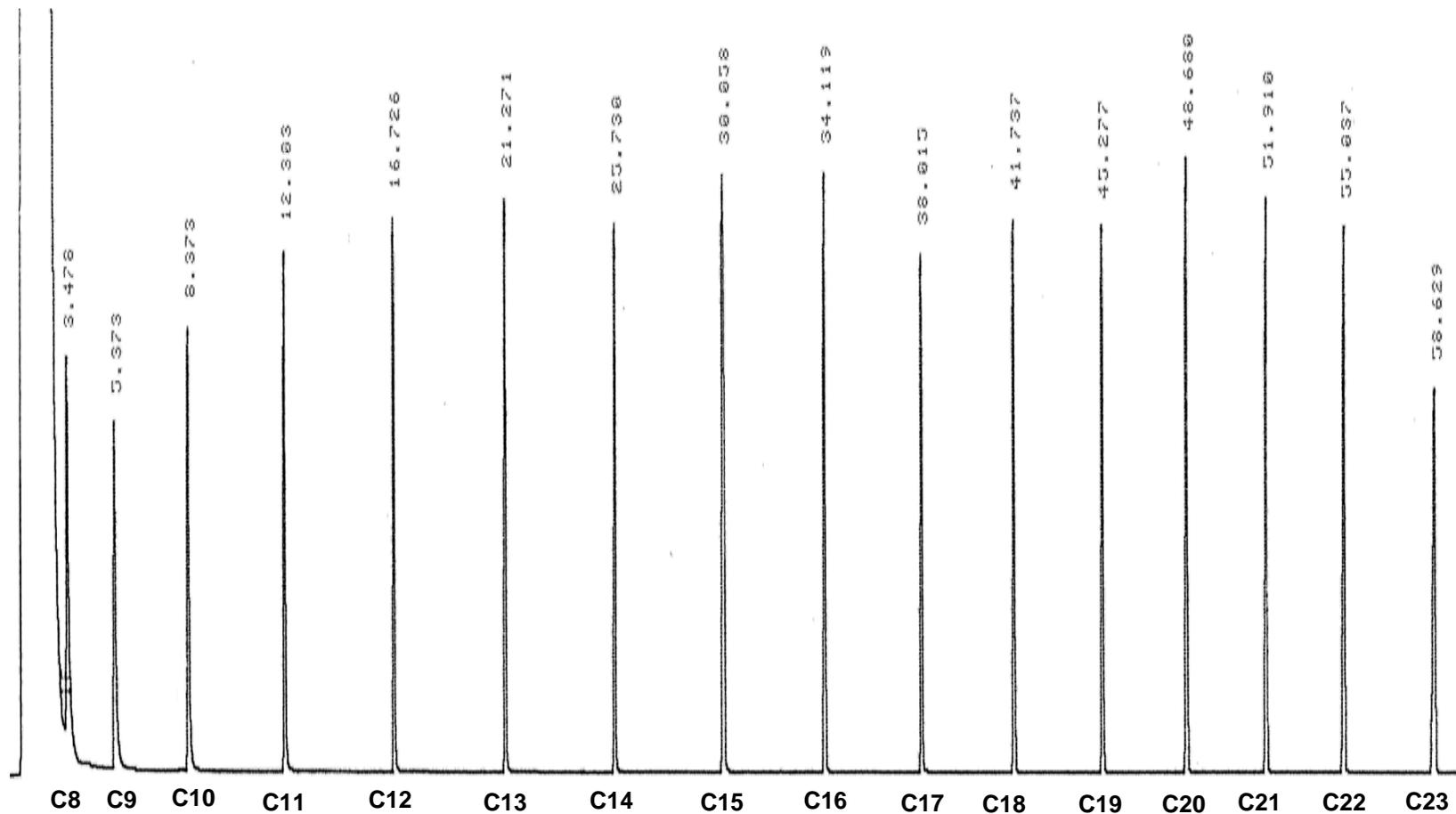


Figura 50. Cromatograma resultante da análise qualitativa por CG das parafinas utilizadas como padrão para a determinação do índice de Kovats.

Para a identificação das substâncias presentes no óleo essencial foram utilizadas técnicas de CG/EM e comparação dos índices de Kovats obtidos com tabelas de IK da literatura (Davies, 1990; Högnadóttir e Rouseff, 2003). Na Tabela 18 são mostradas as substâncias identificadas e os tempos de retenção das que não foram identificadas no óleo essencial de *P. malacophyllum*. Foi utilizada para a identificação por CG/EM a espectroteca NIST, SHIM e WILEY, disponíveis no Instituto de Química da USP. Do óleo essencial das folhas foram identificados 81,9% de sua composição, sendo o 5-[(3E)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole (60,4%) o componente majoritário, composto inédito na literatura (Figura 51). O alquenilfenol **6** (gibbilimbol B) também foi encontrado como componente do óleo essencial, contendo 4,2% da substância.

Resultado semelhante foi obtido com a análise do óleo essencial dos frutos de *Piper gibbilimum*, espécie que também possui alquenilfenóis como principais componentes. O óleo essencial obtido a partir desta *Piper* foi constituído por 74,2% dos gibbilimbols A-D (Rali *et al.*, 2007).

Tabela 18. Índices de Kovats e percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de *P. malacophyllum*.

Substância	IK	%	Identificação
n.i.	992	0,5	EM
n.i.	1100	0,6	-
β -cariofileno	1419	0,7	IK, EM
α -panasinseno	1517	1,2	IK, EM
δ -cadineno	1523	0,8	IK, EM
<i>trans</i> -nerolidol	1566	4,0	IK, EM
espatulenol	1580	3,4	IK, EM
ledol	1585	4,0	EM
óxido de cariofileno	1610	0,7	IK, EM
n.i.	1644	1,5	-
n.i.	1649	1,4	-
n.i.	1668	0,6	-
n.i.	1677	1,3	-
α -bisabolol	1687	0,4	IK, EM
acetato de shizuka-acoradienol	1741	0,9	EM, isolado
5-[(3 <i>E</i>)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxole	1802	60,4	EM, isolado
gibbilimbol B	1952	4,2	EM, isolado
n.i.	2001	4,3	-

IK = índice de kovats; EM = espectrometria de massas e espectroteca; isolado = substância isolada cuja estrutura foi determinada por RMN de ^1H e ^{13}C , IV e EM; i.n. = não identificado.

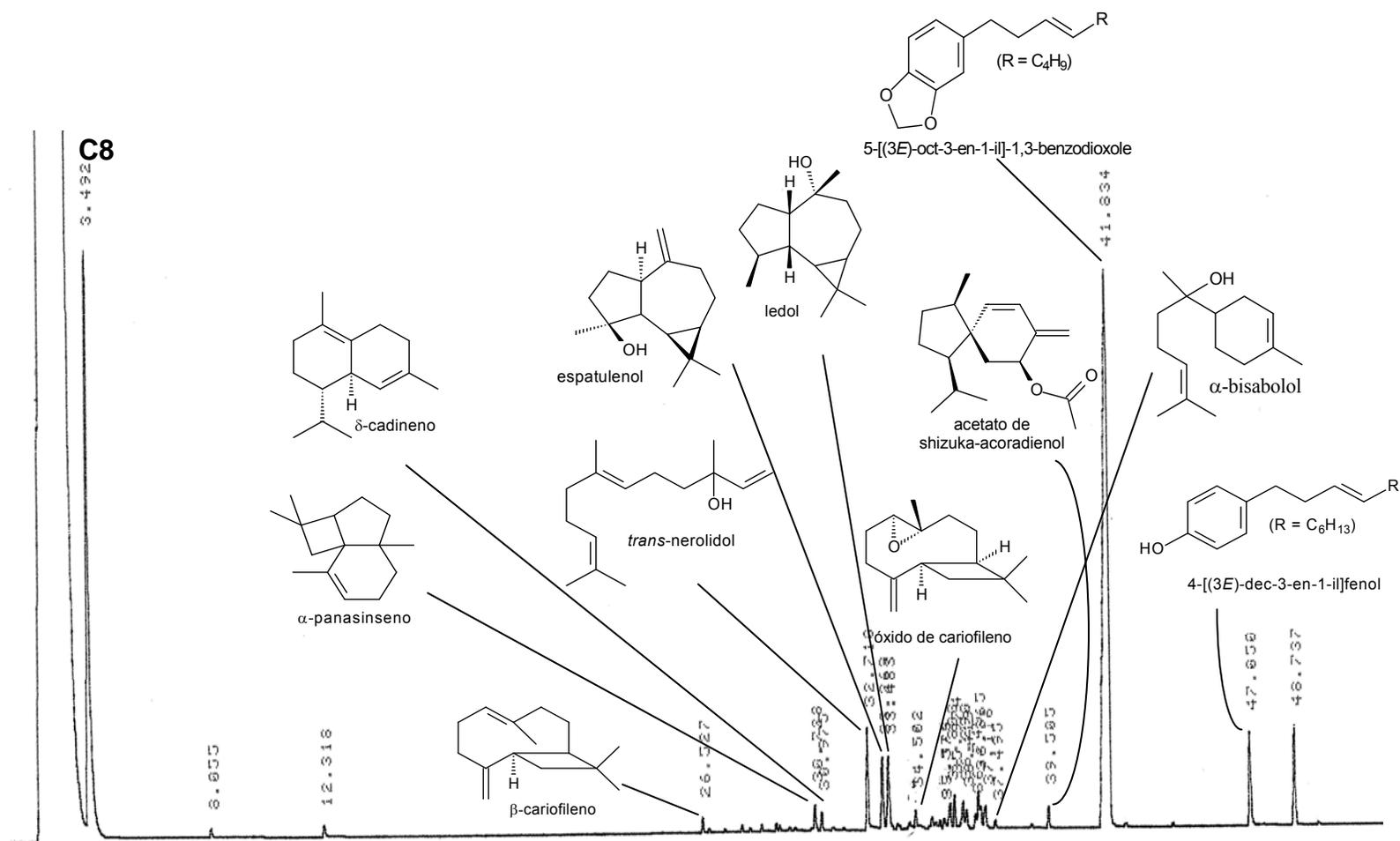


Figura 51. Cromatograma resultante da análise por CG do óleo essencial de *P. malacophyllum*.

4.1.4. Administração de precursores radioativos (acetato-[1-¹⁴C] e L-fenilalanina-[U-¹⁴C]) em folhas de *P. malacophyllum*

Os extratos obtidos para cada tempo nos experimentos de incorporação tiveram sua radiação determinada previamente à análise por CLAE (Figura 52).

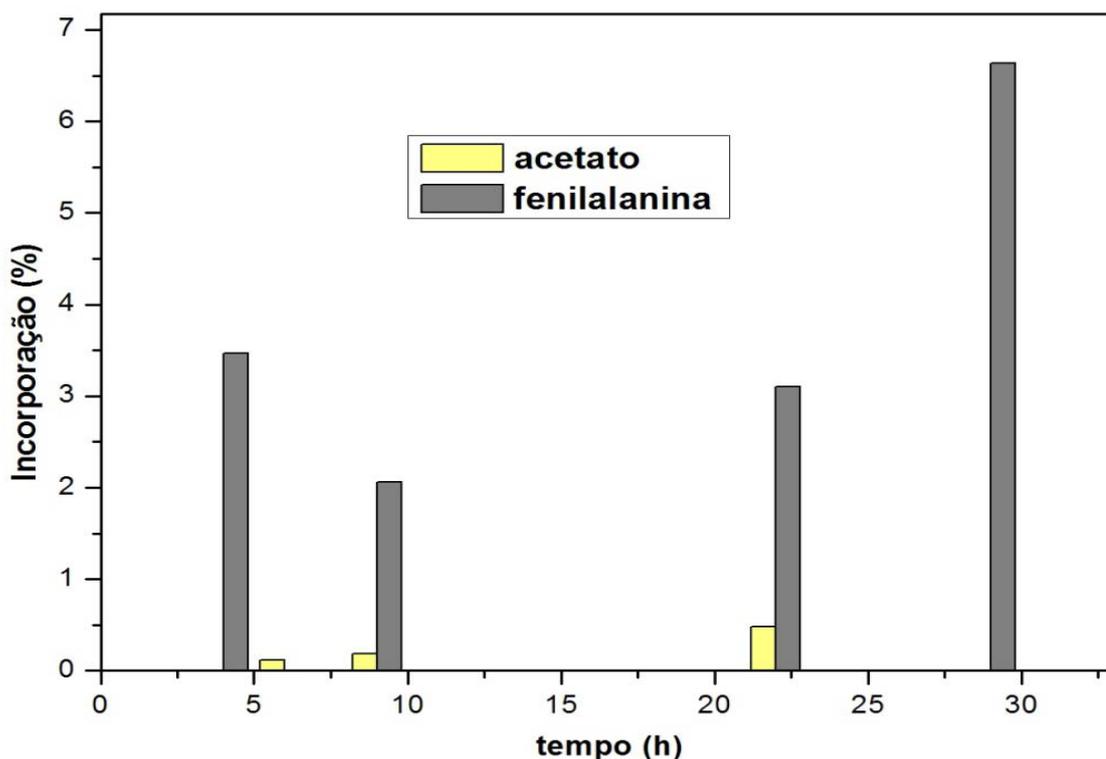


Figura 52. Porcentagem de radiação incorporada ao extrato após administração de acetato de sódio-[1-¹⁴C] e L-fenilalanina-[U-¹⁴C] em função do tempo.

Podemos notar que a porcentagem de incorporação foi proporcional com o aumento do tempo, com exceção do experimento com L-fenilalanina-[U-¹⁴C] nos tempos intermediários 9 e 21 h, visto que houve perda da solução de radioativos por capilaridade na extremidade das folhas. Devido a este fato, as plântulas foram então deixadas em ambiente saturado em H₂O. Os extratos submetidos ao CLAE foram o de 22 h para o acetato-[1-¹⁴C] e 29 h para o L-fenilalanina-[U-¹⁴C]. Podemos notar

também pela análise do gráfico (Figura 52) que houve uma incorporação maior no experimento realizado com a fenilalanina.

Utilizou-se o experimento de marcação isotópica para verificar a rota biossintética dos piperolídeos **1** e **2** e do alquenilfenol **6**. Na análise por CLAE, o piperolídeo **1** corresponde a $t_R \cong 16$ min e o **2** $t_R \cong 18,5$ min. Verificou-se que nas folhas jovens dos indivíduos da *P. malacophyllum* estudadas houve predominância do alquenilfenol **6** ($t_R \cong 48$ min).

Os experimentos realizados com o acetato de sódio-[1- ^{14}C] (Figura 53) e *L*-fenilalanina-[U- ^{14}C] (Figura 54) permitiram observar a incorporação de radioatividade somente no alquenilfenol **6**. Nestes experimentos não foi possível observar a incorporação da fenilalanina e acetato nos piperolídeos, que pode ser devido as baixas concentrações produzida pela folha estudada destes indivíduos de *P. malacophyllum* ou serem produzidos por outra rota biossintética. Através dos resultados obtidos foi possível sugerir que o alquenilfenol **6** é formado pela reação de condensação de malonato com o ácido cinâmico ou *p*-cumárico, seguido por uma etapa de descarboxilação (Figura 55). Outra possibilidade seria a condensação entre malonil com ácido benzóico, esse resultante da β -oxidação do ácido cinâmico.

Novos experimentos utilizando acetato e *L*-fenilalanina marcados com ^{13}C devem ser realizados para que as etapas intermediárias sejam elucidadas, bem como estudos relativos à presença de enzimas do tipo PKS.

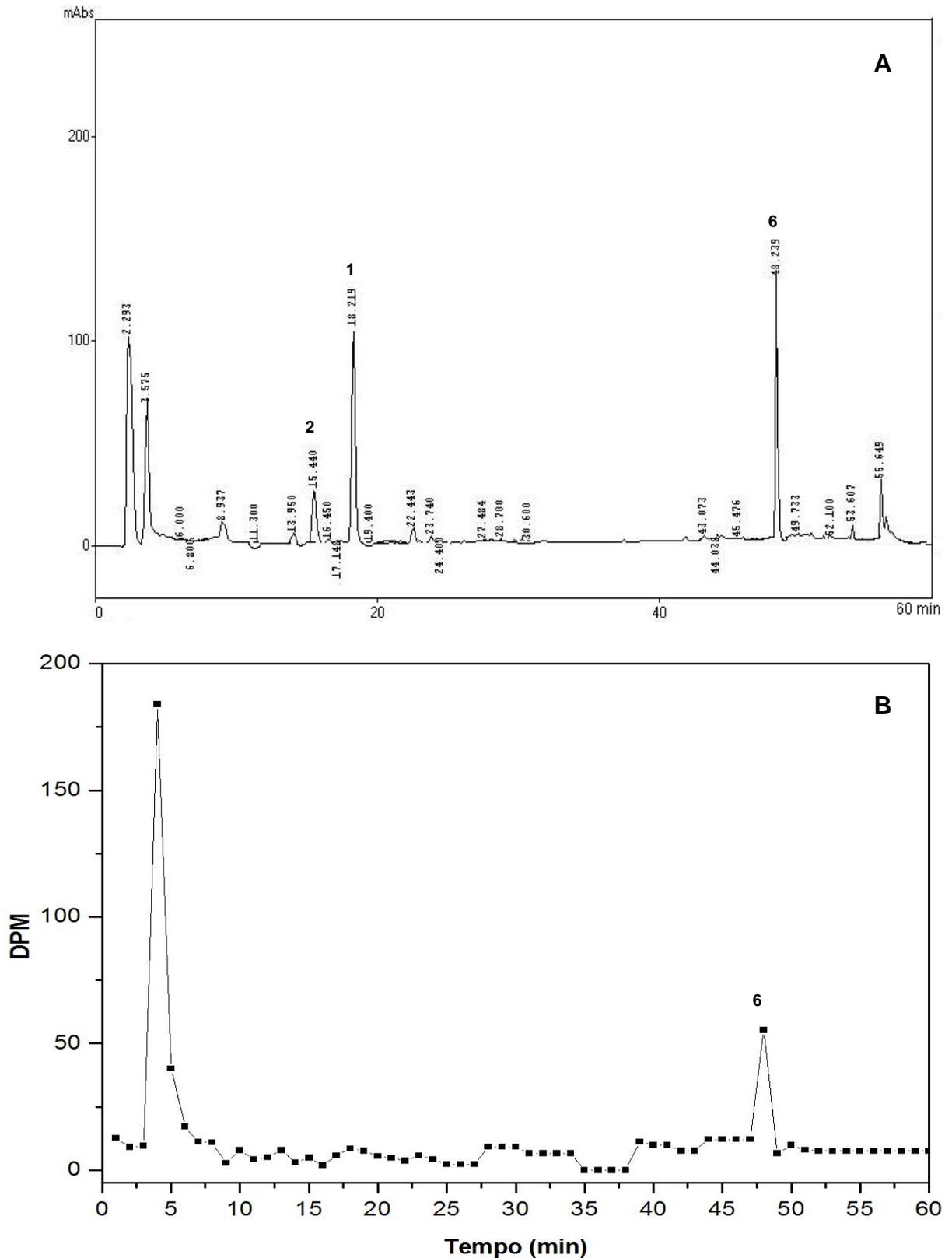


Figura 53. A) Cromatograma obtido por CLAE, com detecção a 254 nm e B) Radiocromatograma do extrato de folha de *P. malacophyllum* referentes ao experimento com acetato de sódio- $1-^{14}C$ no tempo de 22 h.

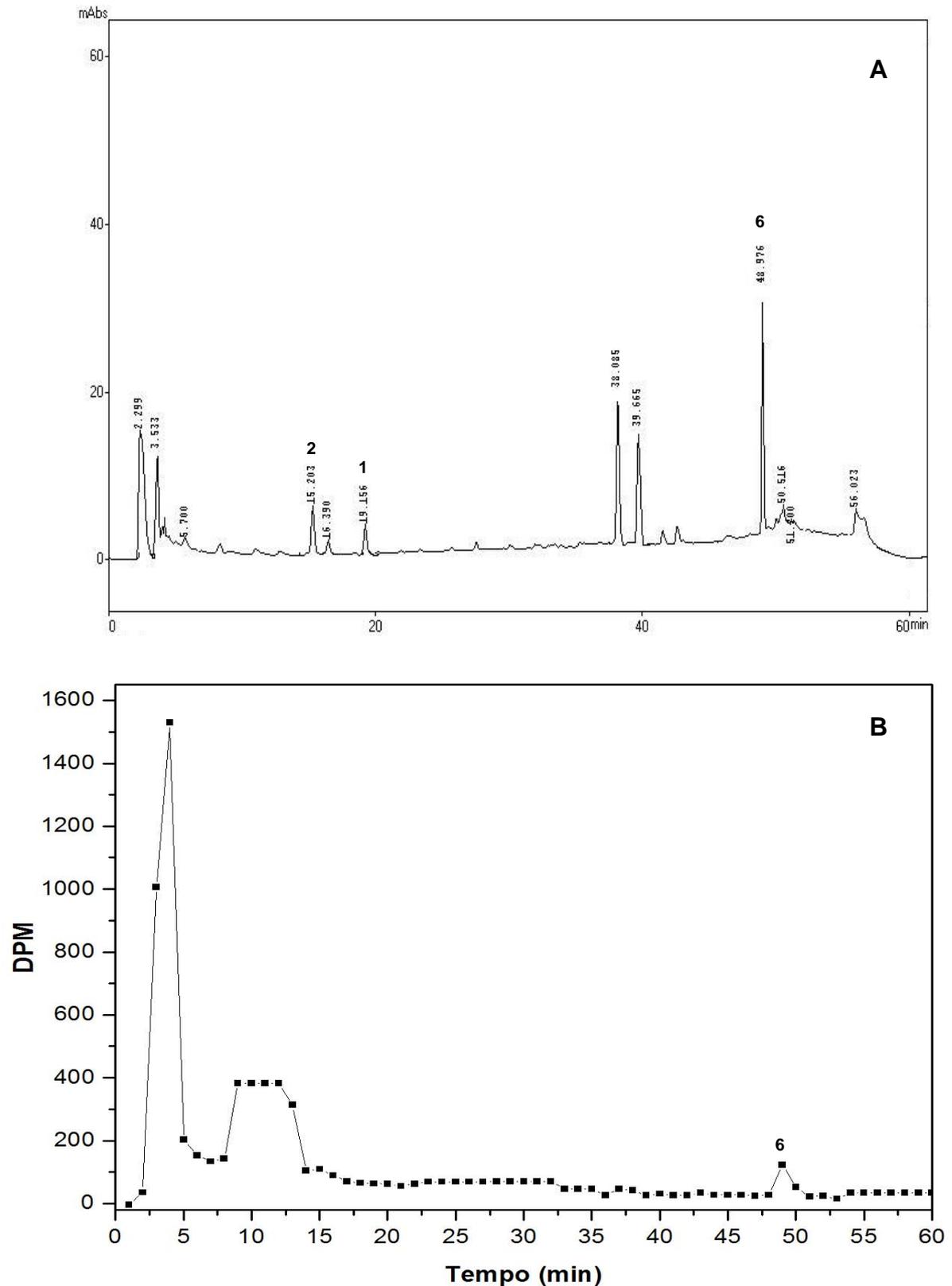


Figura 54. A) Cromatograma obtido por CLAE, com detecção a 254 nm e B) Radiocromatograma do extrato de folha de *P. malacophyllum* referentes ao experimento com acetato de *L*-fenilalanina-(U-¹⁴C) no tempo de 29 h.

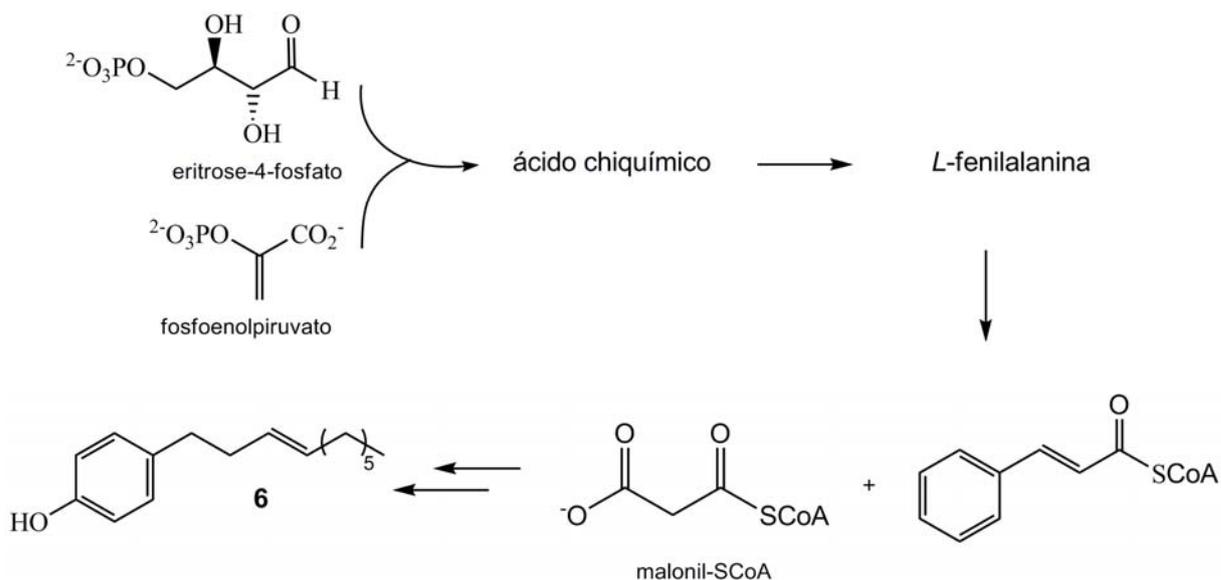


Figura 55. Proposta biossintética para a formação do gibbilimbol B.

4.2. Desenvolvimento e validação de um método em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para a quantificação e determinação de butenolídeos em *P. malacophyllum*

4.2.1. Desenvolvimento do método

Os experimentos iniciais foram conduzidos com etanol, metanol e acetonitrila no eletrólito de corrida para melhorar o desempenho da análise dos butenolídeos por MEKC. O eletrólito continha 10% (v/v) do solvente orgânico, 20 mmol L⁻¹ de SDS e 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio pH 9,2. Após definir o solvente orgânico, a resolução dos butenolídeos foi estudada em detalhe variando os parâmetros: concentração do dodecil sulfato de sódio (SDS), concentração de acetonitrila (ACN) e a concentração do tetraborato do sódio (TBS). No estudo proposto, uma série de experimentos consecutivos foram realizados, onde cada fator (variáveis) foi variado

simultaneamente de acordo com as regras do fatorial 2^3 (dois níveis e três fatores) (Barros Neto *et al.*, 2007).

Os três parâmetros foram variados em dois níveis: concentração do SDS (10-20 mmol L⁻¹); concentração de TBS (10-20 mmol L⁻¹) e concentração de ACN (10-20 % v/v). O nível mais alto dos parâmetros foi definido como "+" e o nível mais baixo como "-". A matriz para os três parâmetros e os dois níveis (+,-) é mostrada na Tabela 19. De acordo com o fatorial 2^3 , oito experimentos foram realizados para os três parâmetros e um experimento adicional em um nível intermediário (contendo ACN 15% (v/v), SDS 15 mmol L⁻¹ e TBS 15 mmol L⁻¹ pH 9,2). O ensaio escolhido foi o que apresentou melhor resolução dos butenolídeos.

Tabela 19. Matriz para os três parâmetros e os dois níveis (fatores na escala de códigos e as variáveis).

Ensaio	Fatores			Respostas	
	SDS	ACN	TBS	Rs	t _m
1	+	-	-	1,44 ± 0,05	4,16 ± 0,01
2	+	+	-	1,61 ± 0,05	4,08 ± 0,01
3	-	-	-	0,86 ± 0,05	3,10 ± 0,01
4	-	+	-	0,53 ± 0,04	2,77 ± 0,01
5	+	-	+	1,17 ± 0,01	4,14 ± 0,05
6	+	+	+	1,13 ± 0,04	3,51 ± 0,01
7	-	-	+	0,63 ± 0,11	3,19 ± 0,07
8	-	+	+	0,24 ± 0,01	2,88 ± 0,01
9	0	0	0	1,16 ± 0,19	3,42 ± 0,03

Rs: resolução entre os butenolídeos

t_m: tempo de migração

A composição otimizada do eletrólito para a separação e quantificação dos butenólídeos nos extratos de *P. malacophyllum* foi um sistema micelar contendo 20 mmol L⁻¹ de SDS, 20% (v/v) de ACN e 10 mmol L⁻¹ de TBS em pH 9,2. A metodologia proposta em CE foi validada de acordo com a *United States Pharmacopeia* (2002), incluindo parâmetros tais como linearidade, limite de detecção, limite da quantificação, exatidão e precisão.

O padrão interno (cumarina) foi usado para melhorar a precisão. Os padrões internos são usados freqüentemente para minimizar flutuações do volume da injeção, erros de diluição e erros durante o tratamento da amostra. Um padrão interno pode substancialmente melhorar a precisão de determinações da área do pico, especialmente se o erro da injeção é a fonte dominante (Altria, 1996). A Figura 56 ilustra a separação dos butenólídeos e do padrão interno.

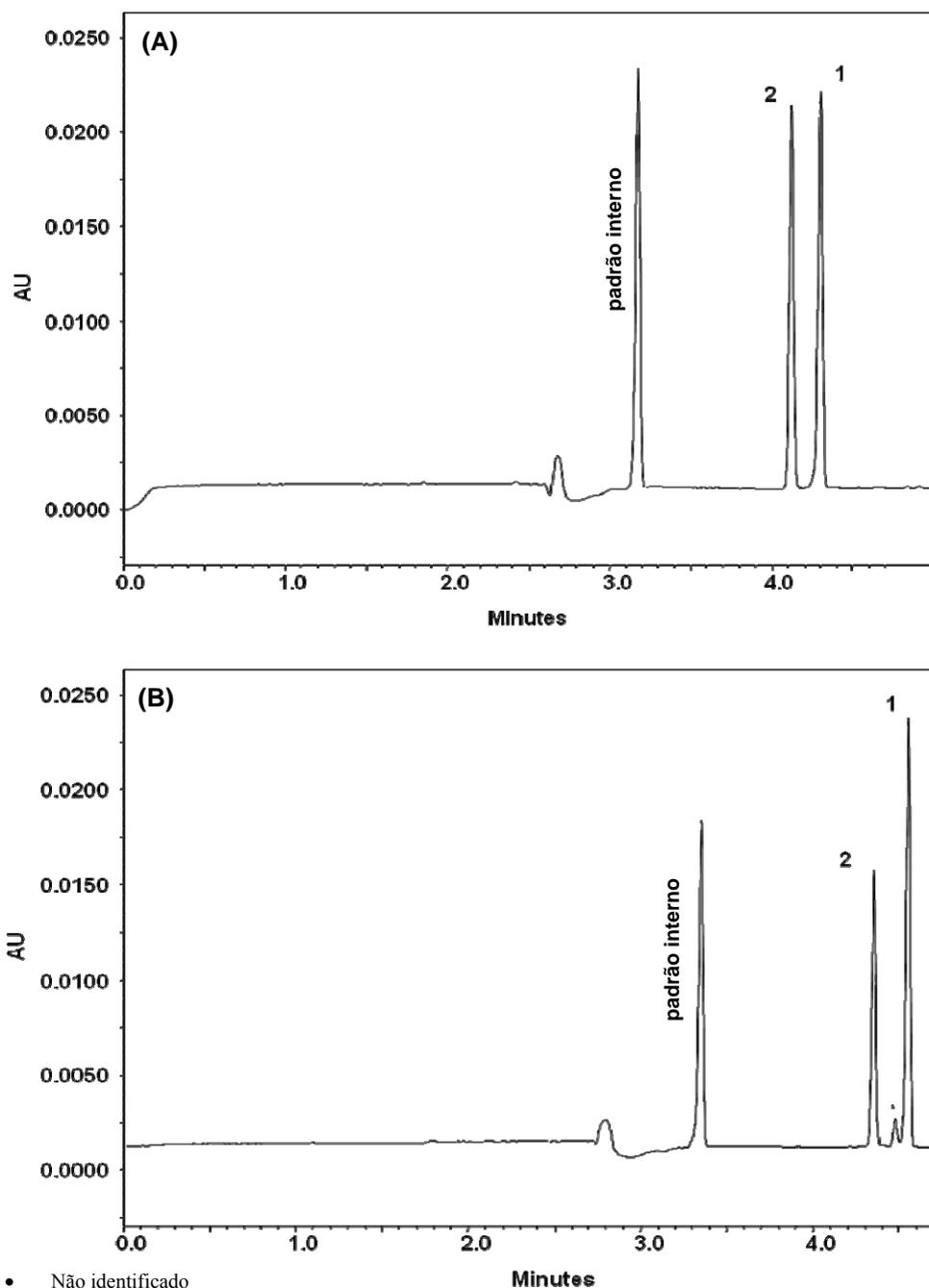


Figura 56. Análise dos butenolídeos em extrato de *P. malacophyllum*: A) Solução padrão de 1 e 2 a $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; B) Extrato de *P. malacophyllum* contendo os butenolídeos. Em (A) e (B), cumarina a $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ usada como padrão interno. Um capilar com $40,2 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ I.D. (janela de detecção 30 cm). Solução micelar: 20 mmol L^{-1} SDS, 20% (v/v) ACN e 10 mmol L^{-1} TBS pH 9,2. Injeção: $0,5 \text{ psi/5s}$. Voltagem: $+25 \text{ kV}$. Detecção a 308 nm .

4.2.2. Validação do método

4.2.2.1. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas.

Para demonstrar a repetibilidade do método desenvolvido, dez injeções consecutivas da mistura padrão contendo $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos butenolídeos e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão interno foram feitas. A precisão foi expressa em termos da porcentagem de desvio padrão relativo (%RSD): foram inferiores a 0,12% RSD para o tempo de migração e de 1,0% RSD para a área relativa dos picos (PAR).

Para avaliar a precisão, foram empregadas soluções padrão dos butenolídeos e padrão interno. A precisão intra-ensaios foi determinada em três níveis de concentração ($30, 40$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), com três repetições cada, por meio do desvio padrão relativo (%RSD) para o PAR (razão área do pico) das determinações. Os dados apresentados (Tabela 20) indicaram uma boa precisão entre os resultados. O critério para se ter uma boa precisão exige um %RSD menor que 2,0% (Swartz e Krull, 1998).

Tabela 20. Método de validação relativo à precisão intra-ensaio.

Concentração da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	RSD para PAR (%)
30	0,13
40	0,48
50	0,32
RSD** (%)	0,31

PAR: razão área do pico (butenólídeo/padrão interno).

* três determinações para cada concentração.

** média do RSD (nove determinações).

4.2.2.2. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é definida como sendo a capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse. A calibração é um dos mais importantes estágios na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, a precisão e a exatidão não podem ser obtidas. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, assim como para a CE, uma relação de primeira ordem (linear) é observada entre a resposta do detector (y, área ou altura dos picos) e a concentração (x) do analito nas amostras, podendo ser descrita pela equação de regressão linear: $y = a + bx$, onde o parâmetro (b) é a inclinação da reta e o parâmetro (a) é a intersecção do gráfico de calibração. Idealmente (b) deve ser reprodutível de ensaio para ensaio e (a) não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve também apresentar um alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$) (Altria, 1996).

A curva analítica constitui-se de cinco pontos e cada solução (10; 20; 30; 40 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi injetada em triplicata. O método apresentou uma excelente linearidade ($R > 0,999$) entre a razão pico/área (butenólídeo/cumarina) na faixa de concentração estudada (Figura 57).

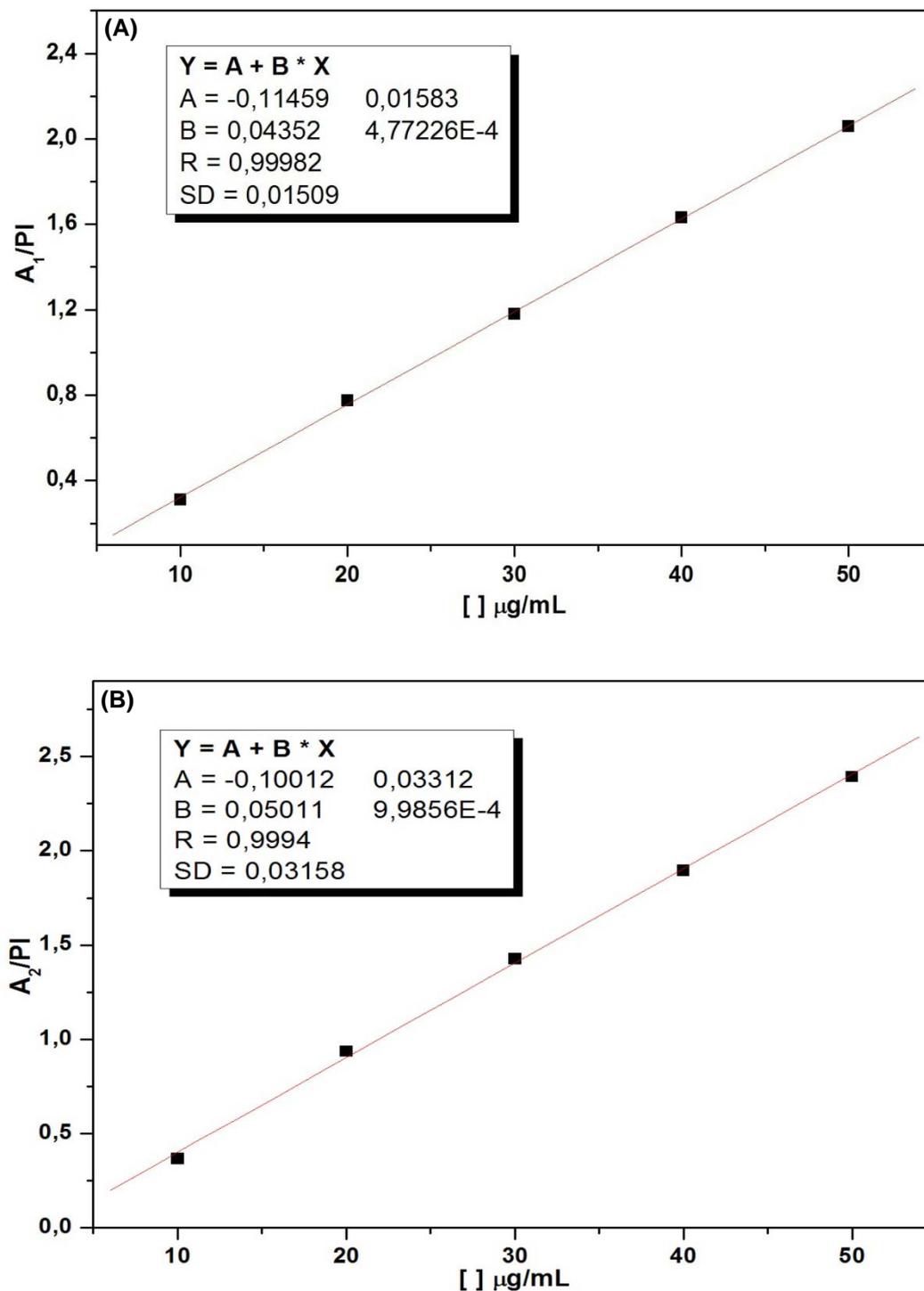


Figura 57. Curva de calibração. Faixa de concentração de 10,0 a 50,0 µg mL⁻¹ baseada na área relativa dos picos: (A) butenolídeo 1 e cumarina (30,0 µg mL⁻¹), (B) butenolídeo 2 e cumarina (30,0 µg mL⁻¹) Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ SDS, 20 % ACN e 10 mmol L⁻¹ de TBS, pH 9,2. Tensão: +25 kV, temperatura 22°C, injeção: 0,5 psi/5s e detecção em 308 nm.

4.2.2.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção revela a concentração mínima da substância de interesse presente na amostra que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade através de certo procedimento experimental. O limite de quantificação indica a concentração mínima da substância de interesse presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis por um procedimento experimental. Os critérios usados na determinação tanto LOD quanto LOQ são baseados no coeficiente de inclinação da reta, *slope* (S), da curva analítica e no desvio padrão das respostas (S.D.), de acordo com as formulas (Miller e Miller, 1988; Swartz e Krull, 1998):

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \text{ S.D.}}{S} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 \text{ S.D.}}{S}$$

O desvio padrão relativo da resposta foi determinado do erro padrão estimado na regressão linear. Os limites de detecção e quantificação foram 3,47 e 1,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o butenólídeo **1** e 6,31 e 2,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o butenólídeo **2**, respectivamente (Tabela 21)

Tabela 21. Método de validação relativo à linearidade e limites de detecção e quantificação para os butenolídeos 1 e 2.

Parâmetros	Dados estatísticos	
	1	2
Faixa de concentração* ($\mu\text{g/mL}$)	10,0 – 50,0	10,0 – 50,0
Intercepto	-0,10012	-0,11459
Slope	0,05011	0,04352
Coeficiente de correlação, r	0,9994	0,9998
Erro padrão estimado	0,0316	0,0151
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,08	1,14
Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6,31	3,47

* cinco pontos, três injeções para cada nível de concentração.

4.2.2.4. Exatidão

Na ausência de um padrão certificado para determinação dos butenolídeos, a exatidão foi avaliada através de teste de recuperação. Amostras do extrato metanólico foram dopadas com as soluções padrões dos butenolídeos nas concentrações de 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e então analisadas com CE. A exatidão do método com as recuperações para os butenolídeos variou de 98,7 a 101,4% para faixa de concentração testada (Tabela 22).

Tabela 22. Método de validação relativo à exatidão: teste de recuperação para os butenolídeos em extratos de *P. malacophyllum*.

Amostras	Padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Padrão encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%) [*]
1	30	29,9	99,8
2	40	39,5	98,7
3	50	50,7	101,4

* média de três determinações

4.2.2.5. Análise

A metodologia validada foi aplicada na quantificação dos butenolídeos **1** e **2** nos extratos metanólicos das folhas de *P. malacophyllum* (Tabela 23). Diferenças qualitativas foram encontradas no perfil dos butenolídeos para todas as plantas analisadas e diferenças significativas na proporção quantitativa dos compostos (**1** e **2**) para cada indivíduo. Tal diferença nos índices dos metabólitos secundários é bastante comum, sendo devido a um grande número de fatores ambientais que afetam suas biossínteses e regulamento (Kutchan, 2001).

Tabela 23. Variação intra-específica dos butenolídeos 1 e 2 em extratos de folhas de *P. malacophyllum*.

Indivíduos	1 (mg g ⁻¹)	2 (mg g ⁻¹)
K447	14.79 ± 0.11	10.84 ± 0.02
K448	3.92 ± 0.01	2.48 ± 0.01
K449	3.19 ± 0.02	2.26 ± 0.01
K450	10.42 ± 0.04	8.38 ± 0.03
K646	6.81 ± 0.01	5.88 ± 0.03
K858	2.05 ± 0.01	1,60 ± 0.01
K882	5.07 ± 0.02	3.67 ± 0.03
K883	20.79 ± 0.30	11.09 ± 0.19
K884	22.50 ± 0.09	8.54 ± 0.04

Média de três determinações

Um novo método em MEKC para a análise dos butenolídeos em extratos de folhas de *P. malacophyllum* foi desenvolvido e validado em relação à precisão da injeção, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Os presentes resultados mostraram que a eletroforese capilar (CE) é uma excelente técnica analítica alternativa para a determinação quantitativa dos butenolídeos em extrato de *Piper*, onde as amostras analisadas tiveram %RSD menor que 1%.

4.3. Síntese de compostos análogos de piperolídeos

Para a síntese dos γ -arilidenobutenolídeos derivados dos piperolídeos (ou butenolídeos), potencialmente fungicidas, utilizou-se como material de partida a 4-metoxifuran-2(5H)-ona (**24a**), disponível comercialmente (Figura 58). O siloxifurano (**24b**) é um reagente estável para a síntese (**24c**) e também funciona como um grupo

fundamental para a síntese na qual vários γ -arilidenobutenolídeos podem ser obtidos através de reação de condensação aldólica com o aldeído aromático apropriado. O composto **24b** é produzido a partir da siliilação do butenolídeo **24a**. Os compostos **24b** e **24c** não foram isolados.

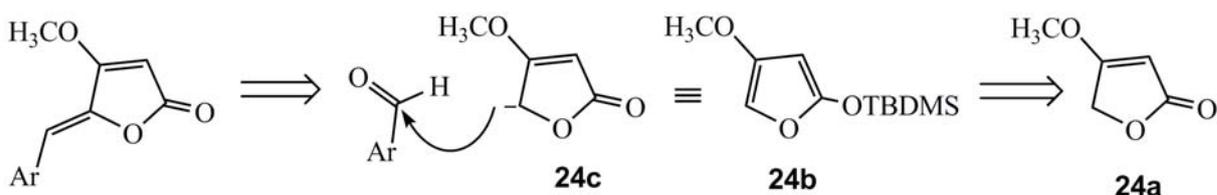


Figura 58. Análise retróssintética para a síntese de análogos aos piperolídeos.

Apesar da estratégia de obtenção dos γ -arilidenobutenolídeos via lactonização dos ácidos γ -alquinólicos ser estereosseletiva, esta abordagem não permite a síntese destes compostos em uma única etapa. Além disto, as condições de reação são comparativamente mais drásticas, não sendo adequadas para a síntese dos derivados dos piperolídeos contendo variação no grupamento γ -alquilidênico. Portanto, para a síntese foi utilizada a alquilidenação do pré-formado heterocíclico de cinco membros contendo oxigênio, como os 2-oxifuranos e γ -lactonas. Oxifuranos e γ -lactonas são usados principalmente como nucleófilos e um grande número de produtos naturais contendo a parte alquilidênica tem sido sintetizados utilizando-se esta estratégia sintética (Boukouvalas *et al.*, 1994; Boukouvalas *et al.*, 1998; Bellina *et al.*, 2001a; Kar *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007a; Teixeira *et al.*, 2007b; Xu *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008).

Assim, a síntese dos butenolídeos foi conduzida utilizando-se a metodologia descrita por Boukouvalas *et al.* (1998) (Figura 59), que substituiu as três etapas da síntese relatada anteriormente (Boukouvalas *et al.*, 1994) por uma única etapa. O

tratamento da 4-metoxifuran-2(5*H*)-ona (**24**) com o aldeído aromático na presença do *tert*-butildimetilsililtrifluorometanossulfonato (TBDMSOTf) e diisopropiletilamina (DIPEA) em DCM, seguida pela β -eliminação mediada pela adição do 1,8-diaza-biciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) conduziu a formação dos γ -arilidenobutenolídeos. Uma proposta mecanística para formação destes compostos está descrita na Figura 60. A eliminação do grupo *tert*-butildimetilsililoxi conduziu à formação dos γ -arilidenobutenolídeos com alta (*Z*)-seletividade procedendo provavelmente via mecanismo E1-cb (Plewe e Schmidt, 1989; Boukouvalas *et al.*, 1994; Shing *et al.*, 1995; Pohmakotr *et al.*, 1998). A formação preferencial dos compostos com estereoquímica *Z* pode ser explicada pela presença do grupo metoxílico na posição 4 no butenolídeo (Von der Ohe e Bruckner, 2000) (Figura 61). A formação preferencial dos estereoisômeros *Z* foi recentemente relatada para sistemas semelhantes (Bellina *et al.*, 2001a; Kar *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007a; Xu *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008).

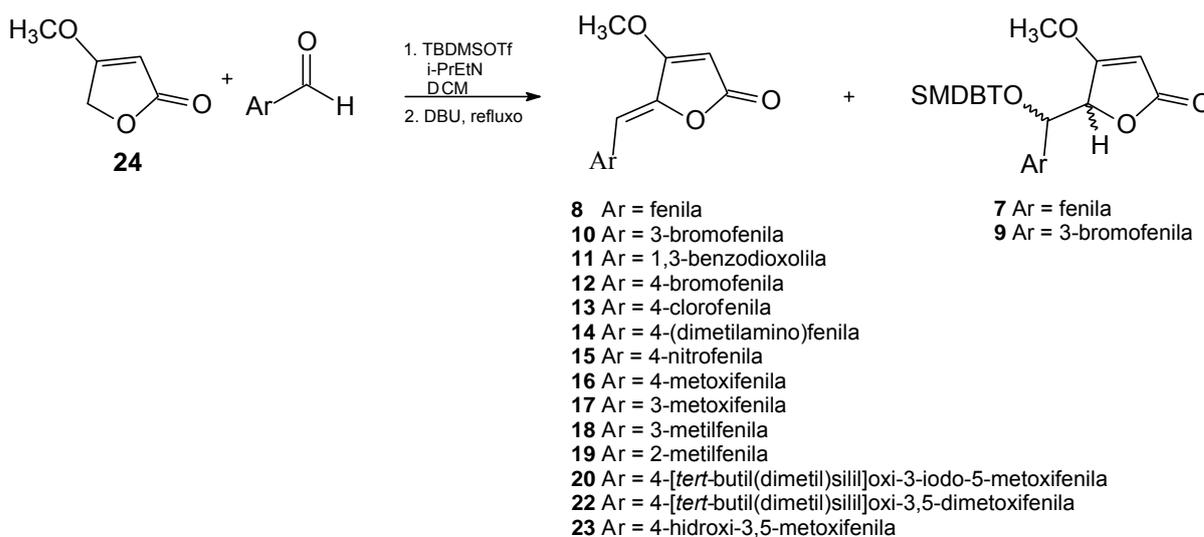


Figura 59. Reação para a obtenção dos compostos análogos aos piperolídeos.

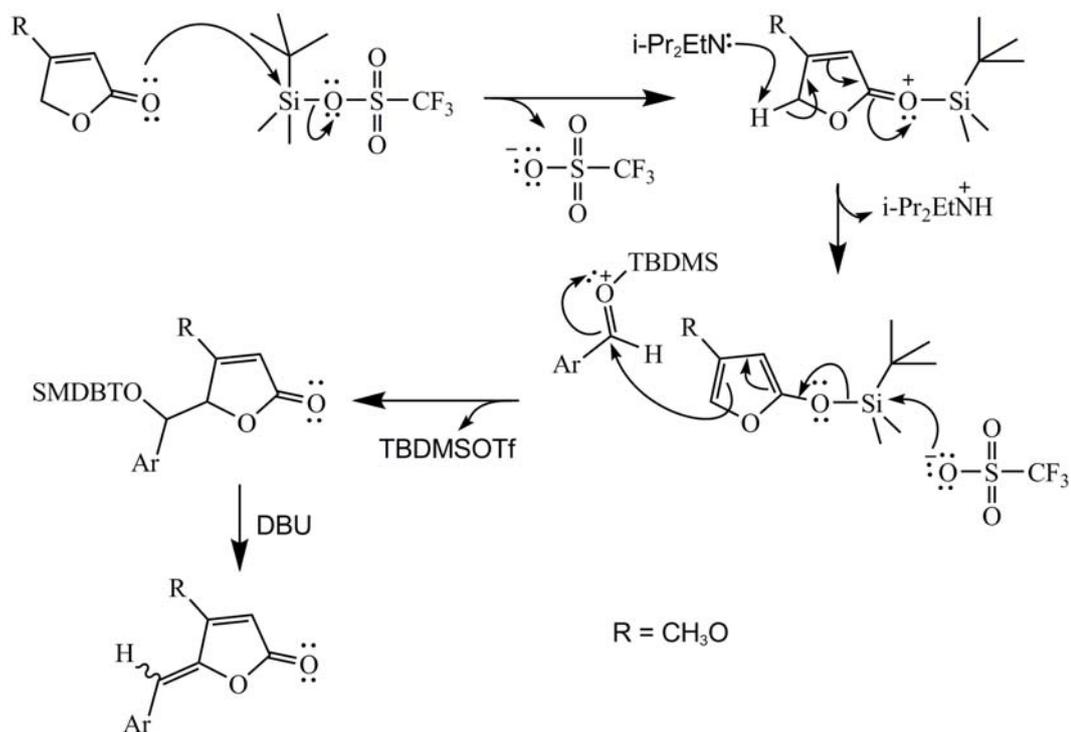


Figura 60. Proposta de mecanismo para a síntese dos γ -arilidenobutenolídeos.

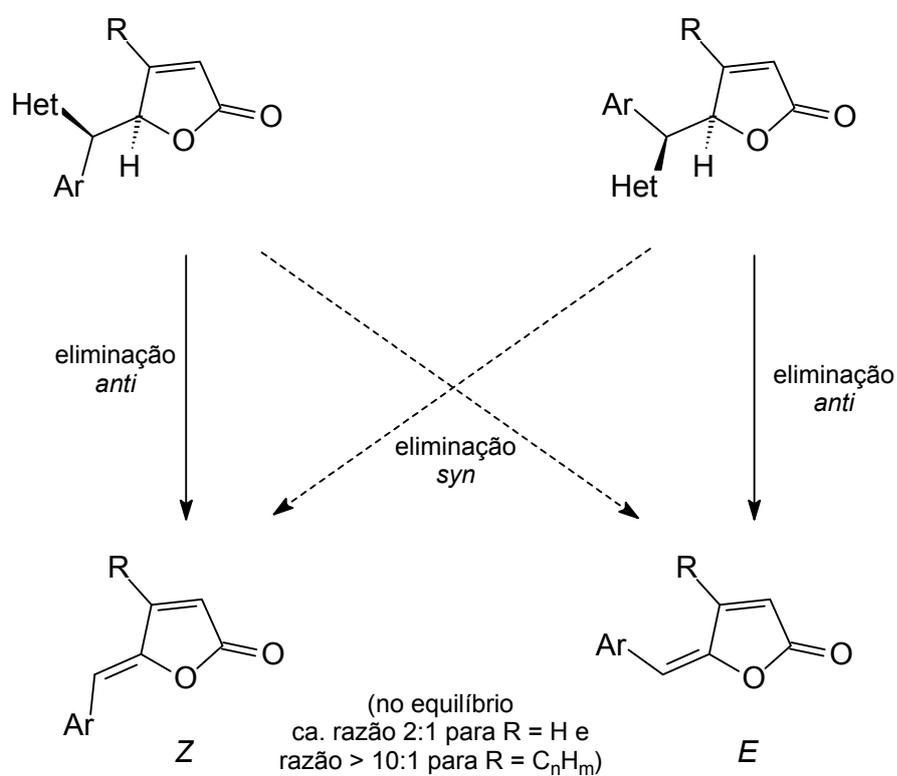


Figura 61. Síntese de γ -arilidenobutenolídeos via β -eliminação.

O composto **23** foi obtido como um sólido amarelo após a remoção do grupo protetor *tert*-butildimetilsilil (TBDMS) utilizando-se uma mistura de 1:1 de MeCN/HF (Figura 62).

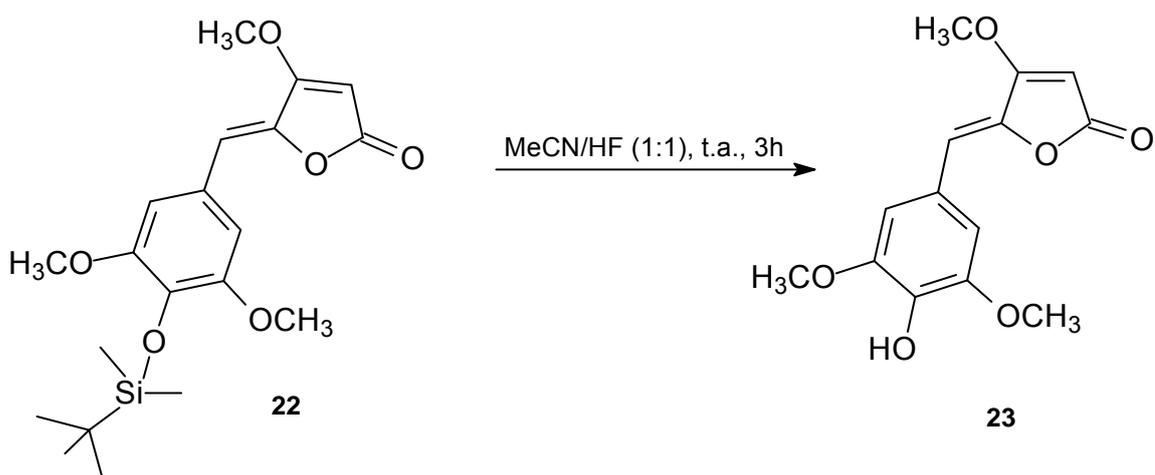


Figura 62. Reação para a preparação do composto **23**.

O primeiro indício de formação dos produtos deu-se pela análise em cromatografia em camada delgada, que indicou a formação de um composto sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm). Embora as condições reacionais não tenham sido otimizadas, em geral as reações foram completadas dentro de quatro horas após a adição do DBU sob condições de refluxo. Os métodos de purificação, características e rendimentos dos compostos sintetizados são mostrados na Tabela 24.

Tabela 24. Métodos de purificação, características e rendimentos dos compostos sintetizados.

Compostos	Métodos de purificação	Solventes (proporção)	Características	Rendimentos (%)
7	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	26
8	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	73
9	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	21
10	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	59
11	Recristalização	Hexano/DCM	Sólido amarelo	55
12	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	28
13	Recristalização	Hexano/DCM	Sólido branco	66
14	Recristalização	Hexano/DCM	Sólido alaranjado	77
15	Recristalização	Hexano/DCM	Sólido vermelho	87
16	CC	Hexano/AcOEt (2:1)	Sólido amarelo	85
17	CC	Hexano/AcOEt (2:1)	Sólido amarelo	77
18	CC	Hexano/AcOEt (2:1)	Sólido branco	69
19	CC	Hexano/AcOEt (2:1)	Sólido branco	58
20	CC	Hexano/AcOEt (2:1)	Sólido amarelo	29
21	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido branco	50
22	CC	Hexano/DCM (1:2)	Sólido amarelo	23
23	-	-	Sólido amarelo	95

CC = cromatografia em coluna.

O aldeído **21** foi formado pela reação de proteção do grupo OH do aldeído de partida com o TBDMSOTf. A confirmação da estrutura deu-se inicialmente pela análise de seu espectro no IV (Figura 63). A banda intensa referente ao estiramento da carbonila de aldeídos aromáticos pôde ser observada em 1682 cm^{-1} .

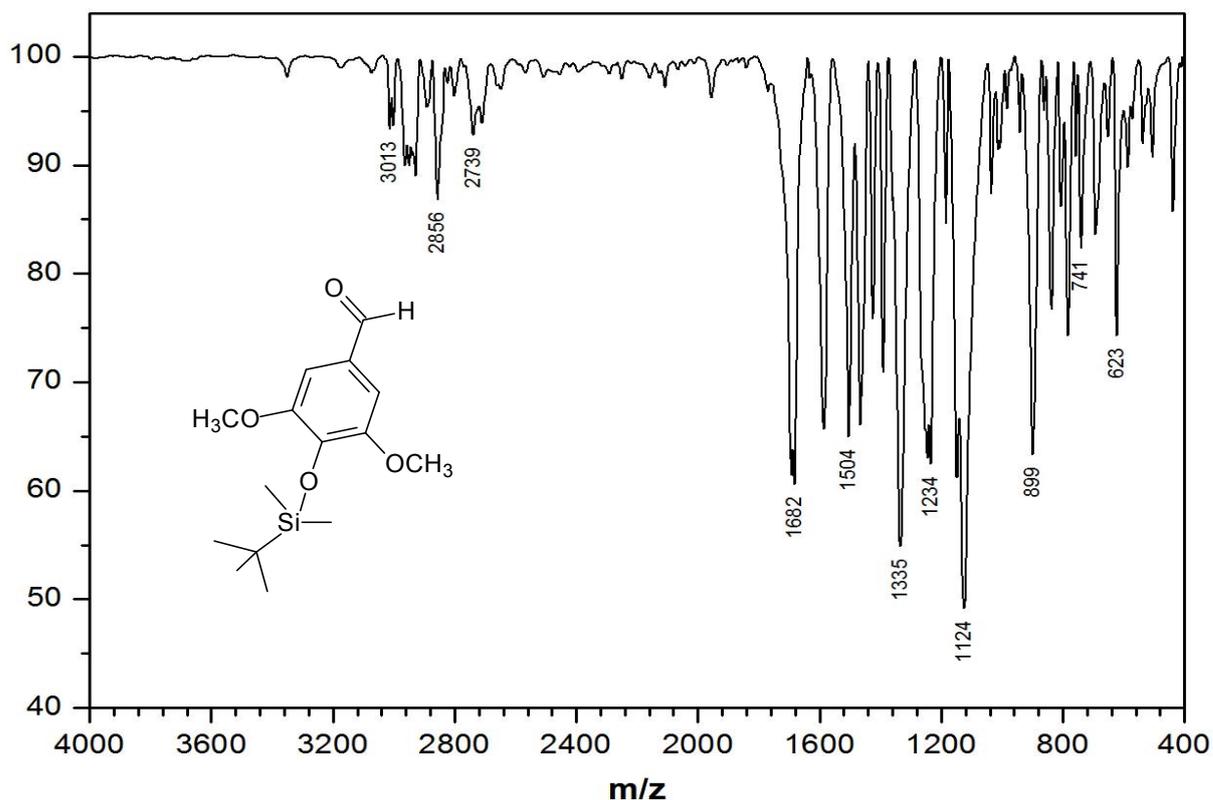
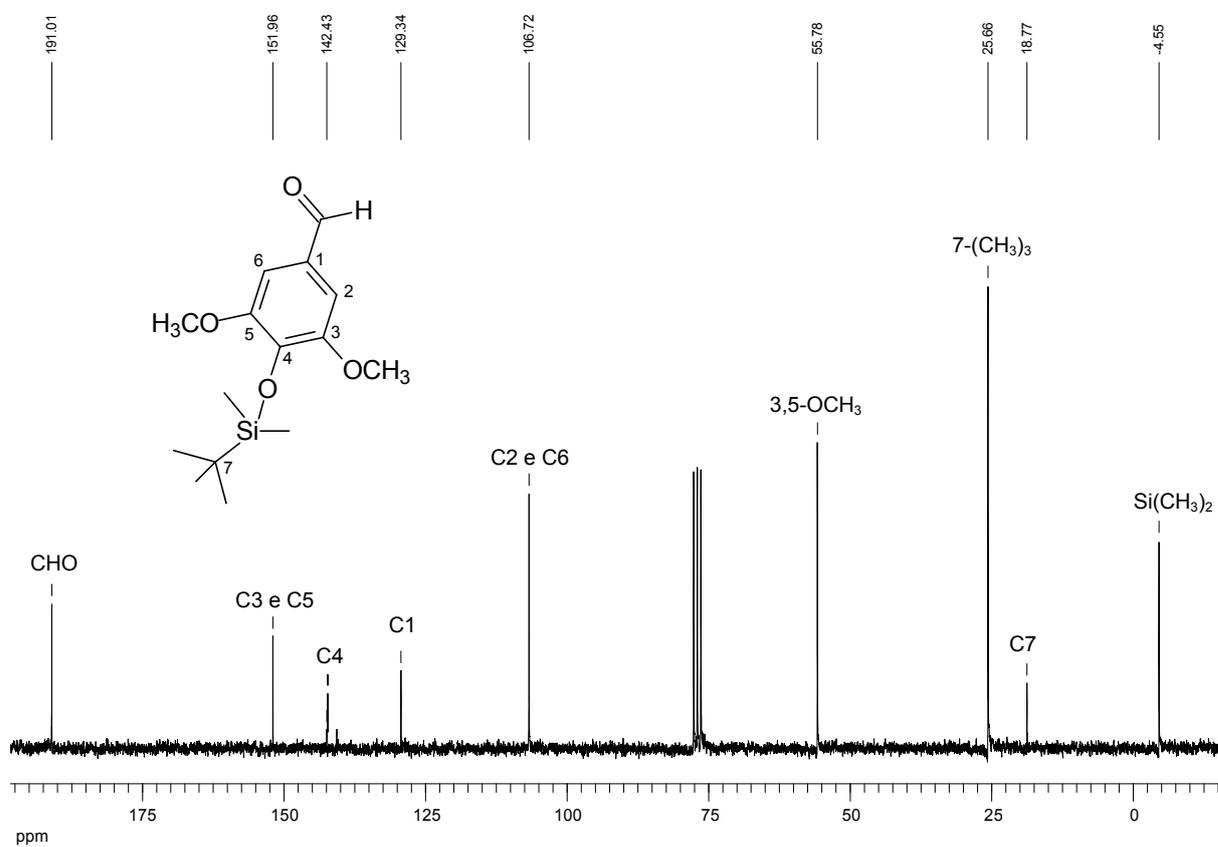
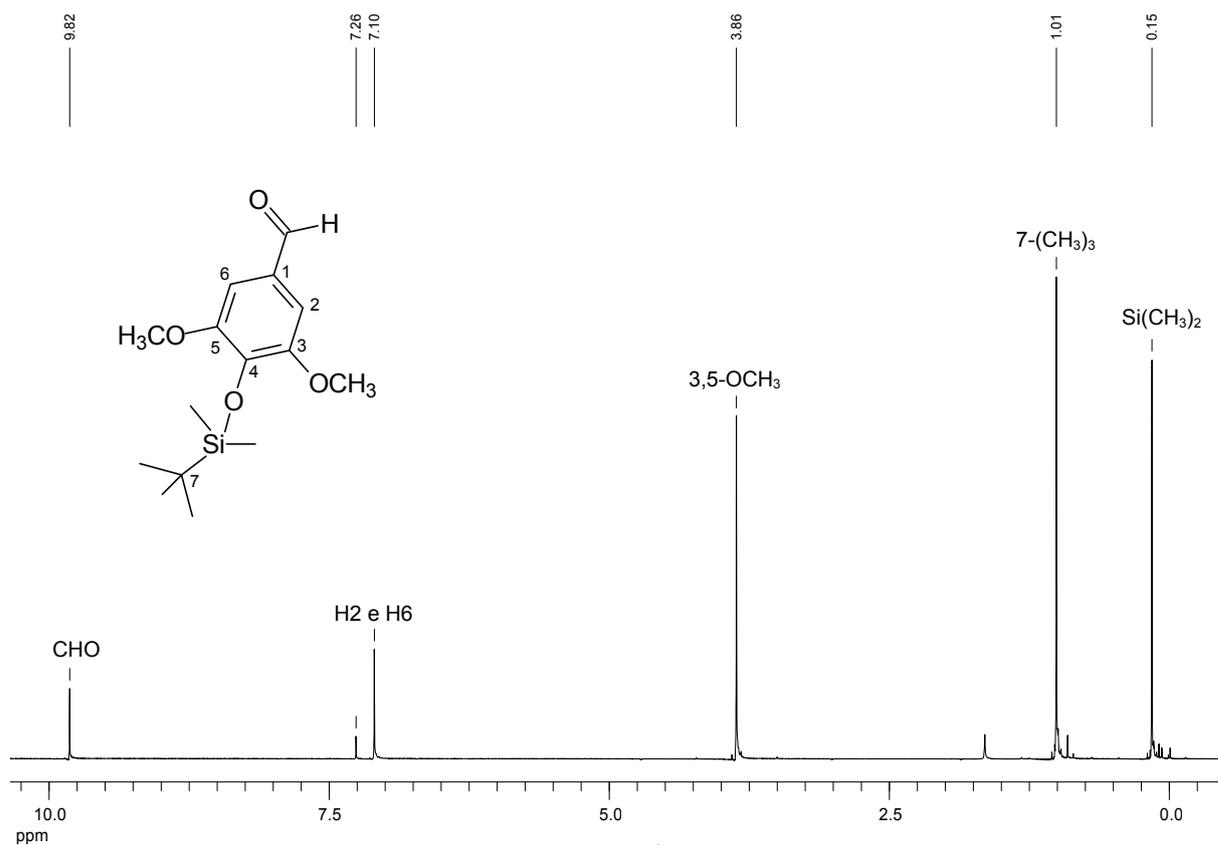


Figura 63. Espectro no IV (KBr) de 21

Nos espectro de RMN de ^1H de **21** (Figura 64), observou-se a presença de um simpleto em δ 0,15 referente ao grupo $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, um simpleto em δ 1,01 referente ao grupo $13\text{-(CH}_3)_3$, um simpleto em δ 3,86 referente as metoxilas presentes nos carbonos C9 e C11, um simpleto em δ 7,10 referente aos hidrogênios aromáticos H2 e H6 e o simpleto em δ 9,82 referente ao hidrogênio do aldeído. No caso do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 65) a formação do aldeído é confirmada pela presença do sinal em δ 191,0; devido ao grupo $\text{C}=\text{O}$ de aldeído e pela presença dos sinais referentes ao grupo protetor TBDMS, em δ -4,6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18,8 (C13) e 25,7 ($13\text{-(CH}_3)_3$).



No espectro de massas (Figura 66) do composto **21** não foi observado o pico do íon molecular esperado em m/z 296, mas um sinal em m/z 295 referente à eliminação de H ($M - 1$). Os íons fragmentários principais observados no espectro de massa são apresentados na Figura 67.

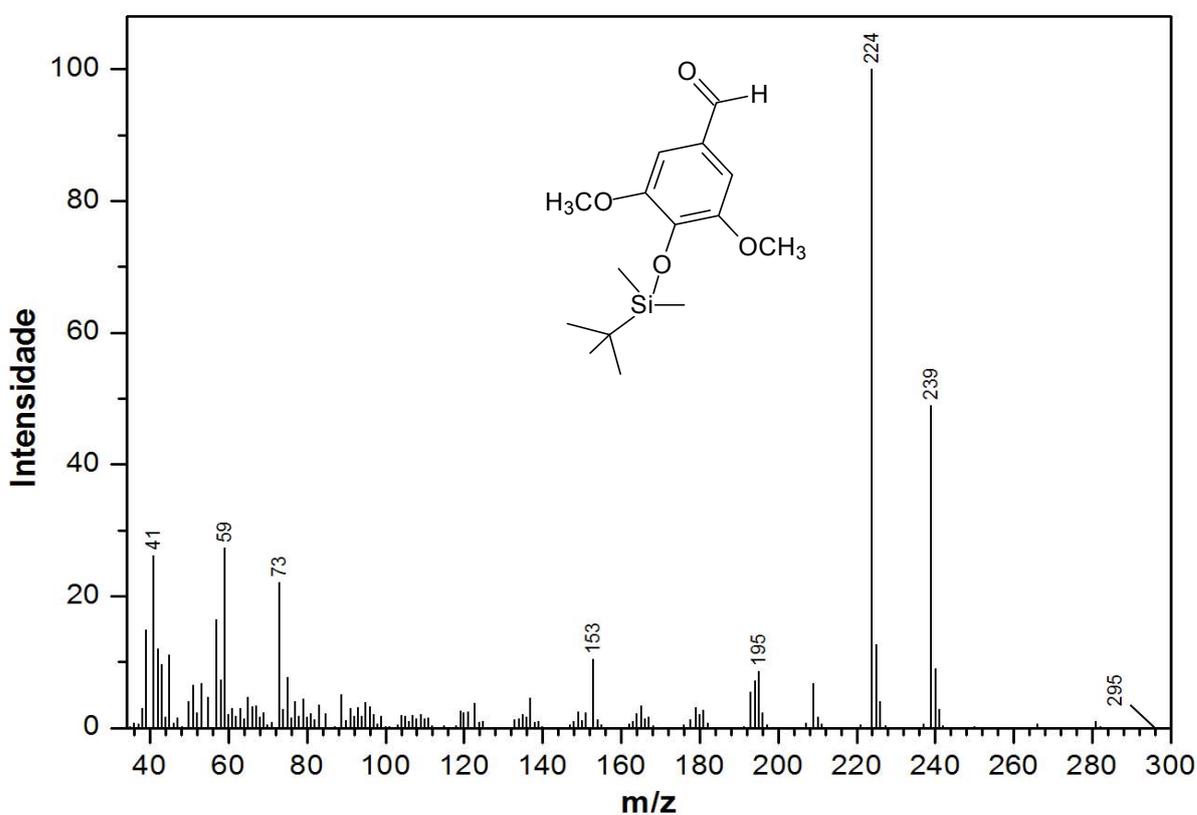


Figura 66. Espectro de massas de **21**.

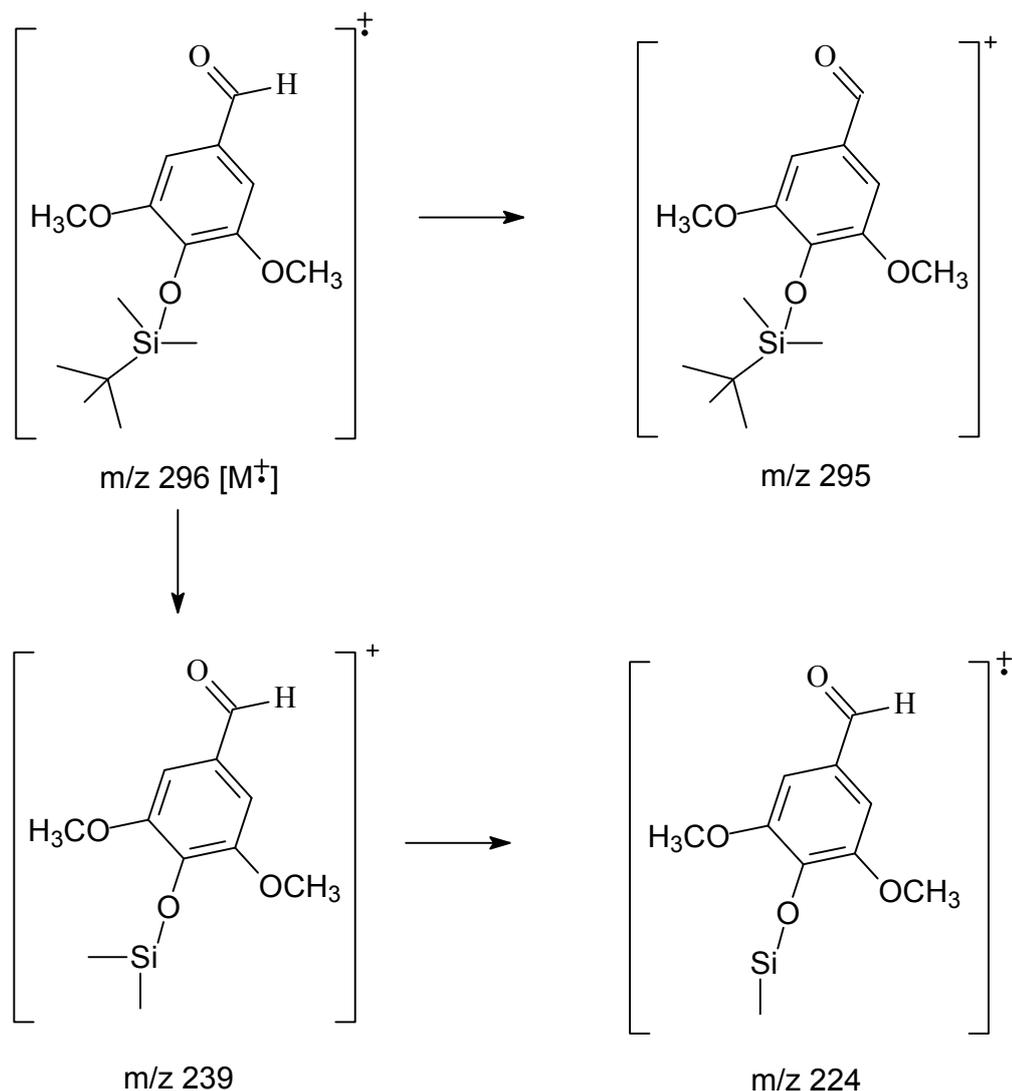


Figura 67. Principais fragmentações de massas referentes ao aldeído 21.

Os espectros no IV dos γ -arilidenobutenolídeos (Figura 68 a Figura 81) obtidos a partir da lactona **24** apresentaram todos os mesmo padrões de sinais. Nos espectros no infravermelho destes compostos, foram observadas bandas intensas referentes ao estiramento da carbonila de γ -lactona α,β -insaturadas entre 1745 e 1798 cm^{-1} (Tabela 25), bem como as bandas devido ao estiramento da ligação C-O de éteres e lactonas na região 1100-1300 cm^{-1} , e as bandas referentes ao estiramento C-H de anéis aromáticos na região de 3000-3100 cm^{-1} .

Tabela 25. Bandas no IV referentes ao estiramento CO de grupos carbonílicos dos γ -arilidenobutenolídeos.

Compostos	ν_{CO} (cm⁻¹)
8	1759
10	1779
11	1749
12	1770
13	1798
14	1744
15	1767
16	1774
17	1761
18	1755
19	1753
20	1784
22	1759
23	1745

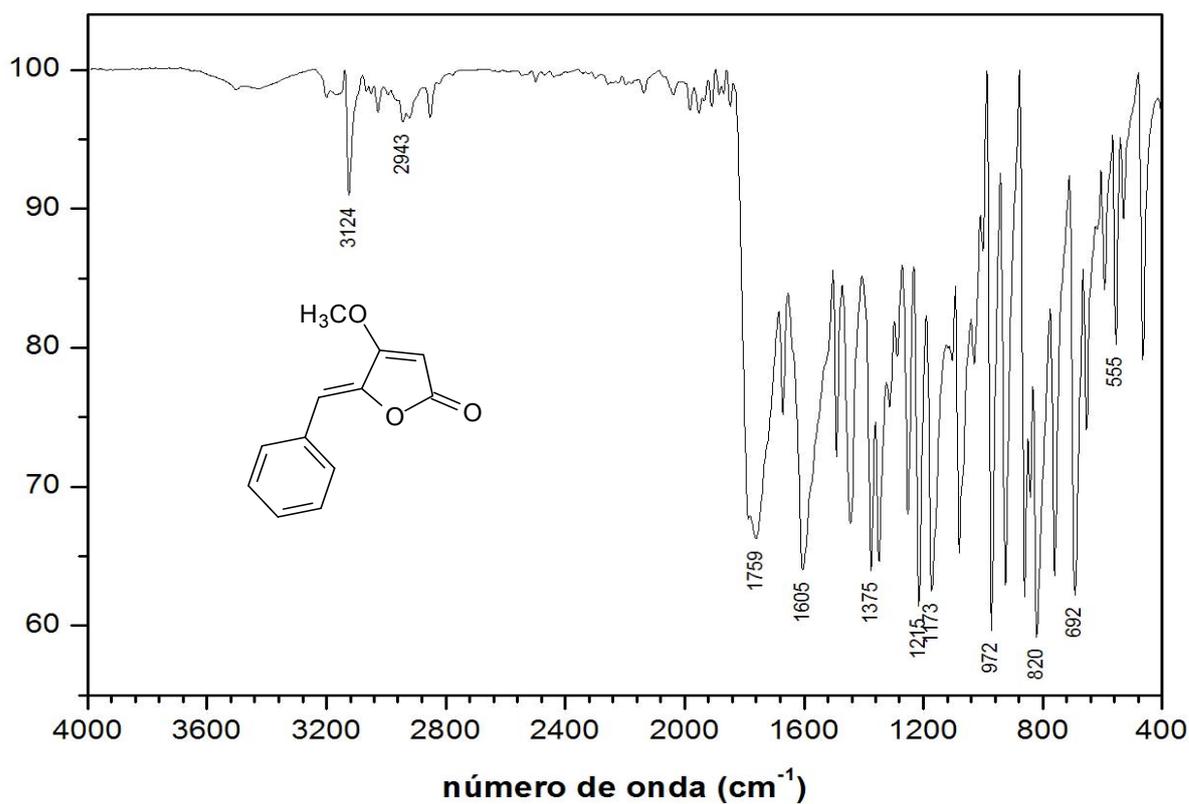


Figura 68. Espectro no IV (KBr) de 8.

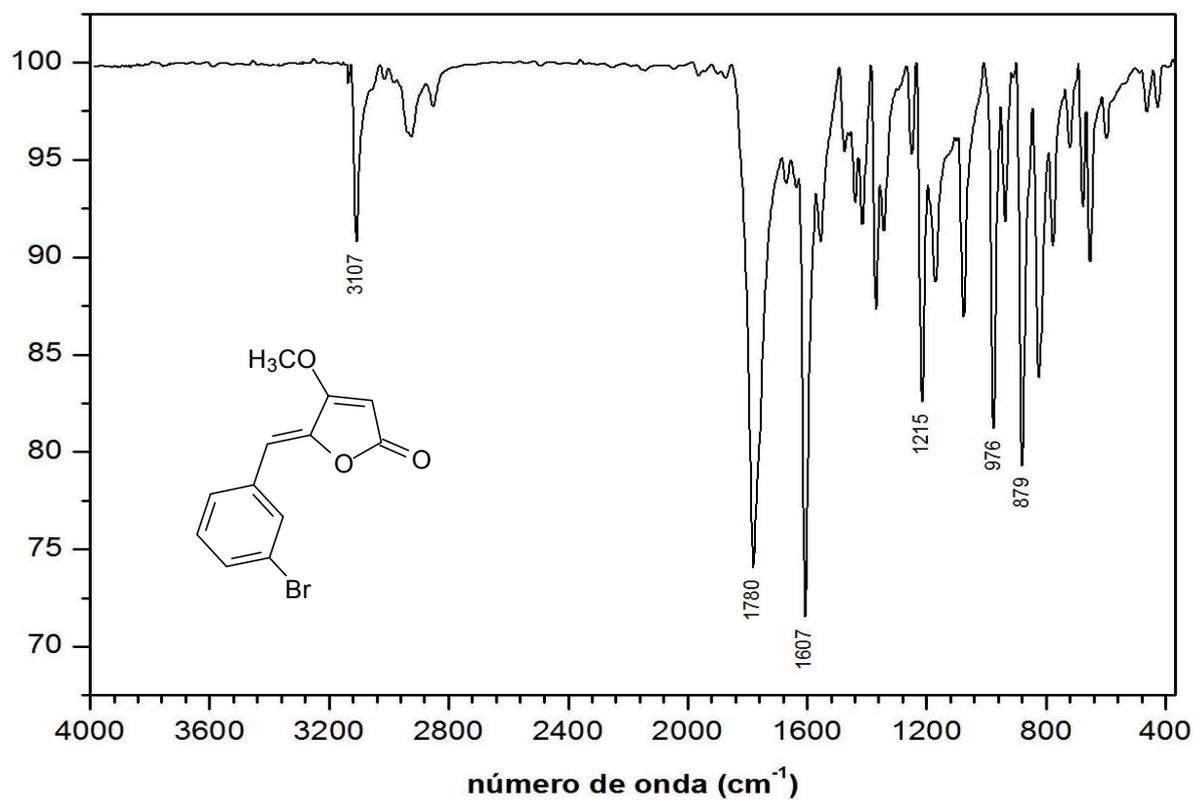


Figura 69. Espectro no IV (KBr) de 10.

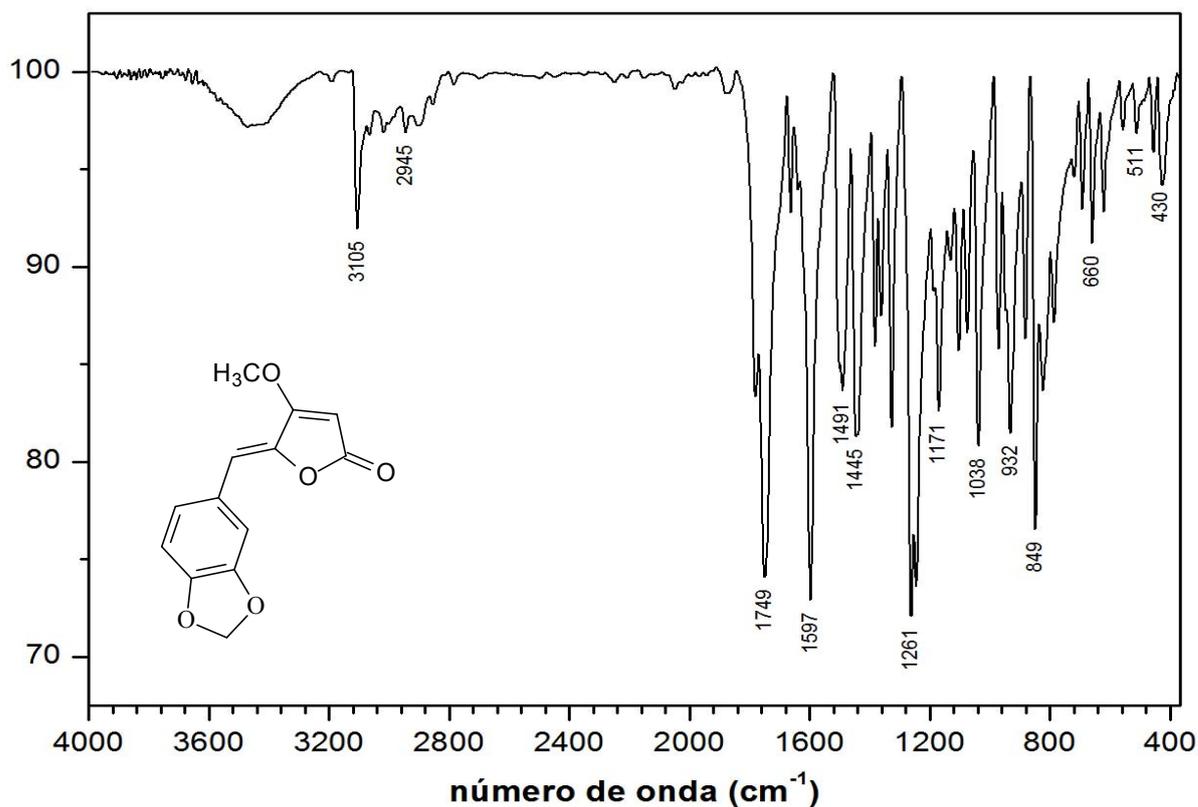


Figura 70. Espectro no IV (KBr) de 11.

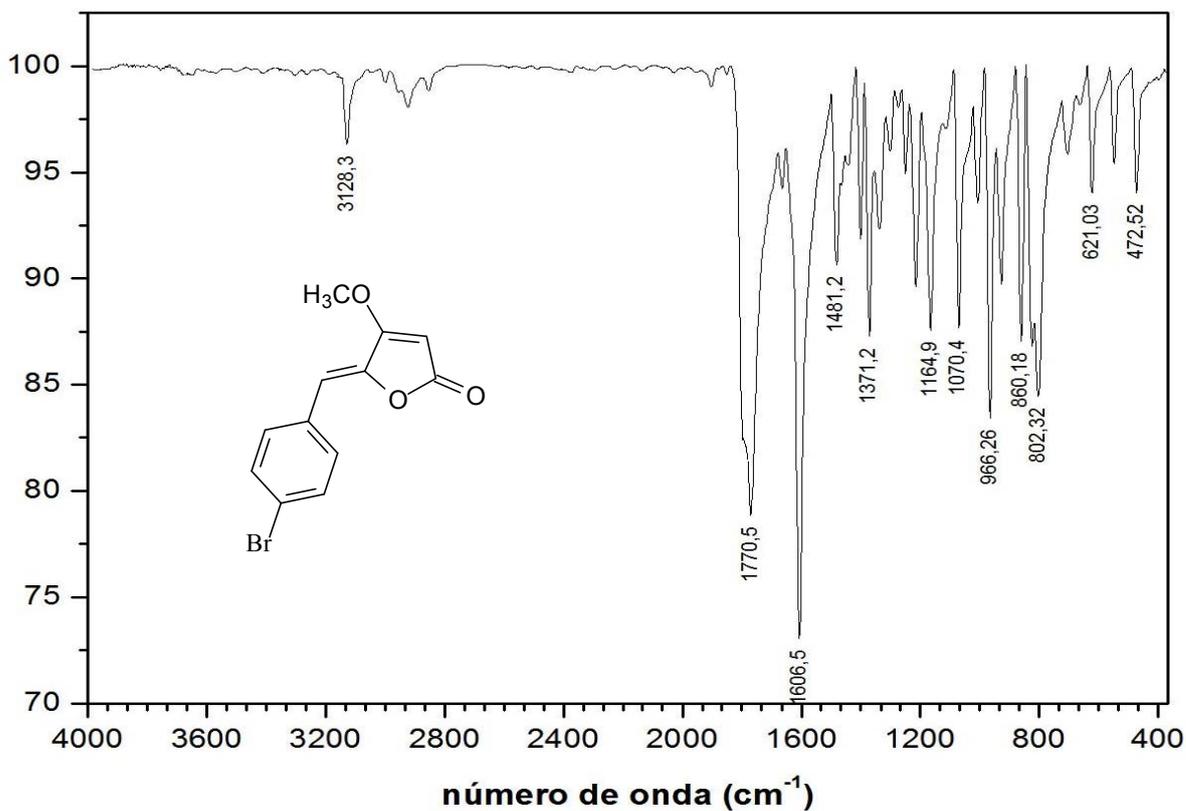


Figura 71. Espectro no IV (KBr) de 12.

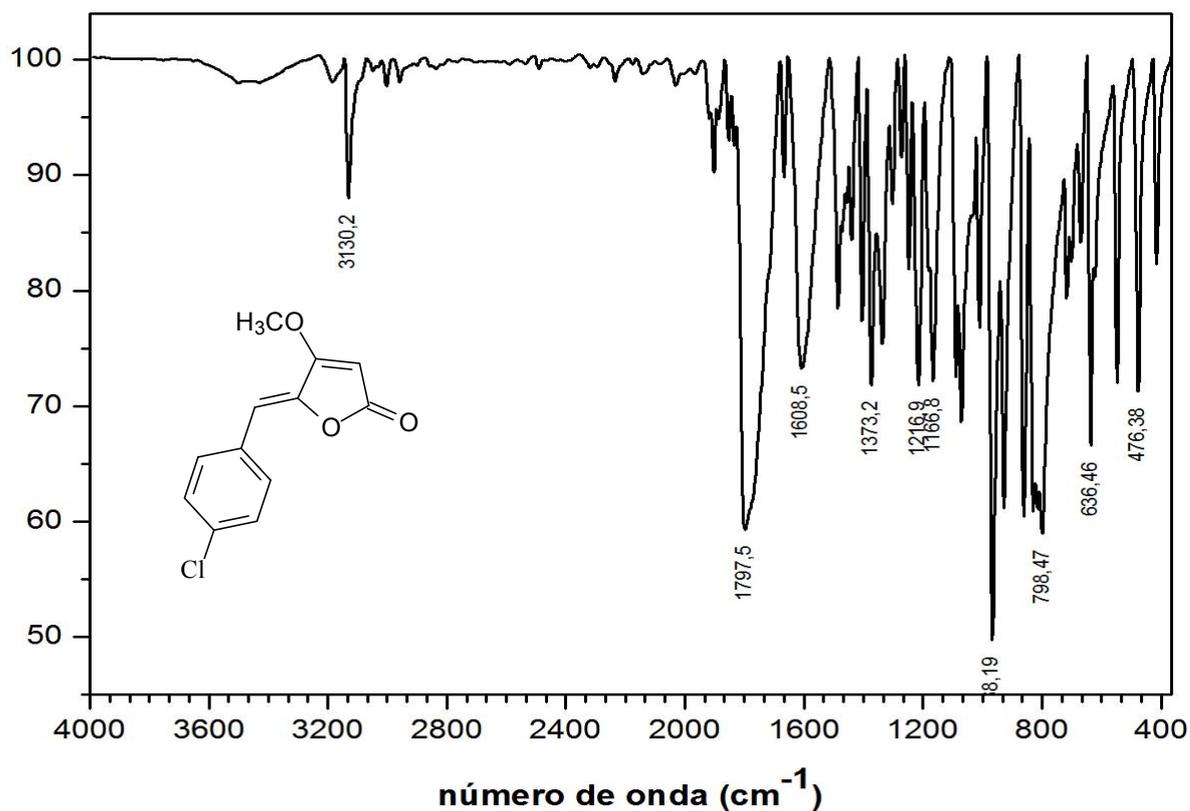


Figura 72. Espectro no IV (KBr) de 13.

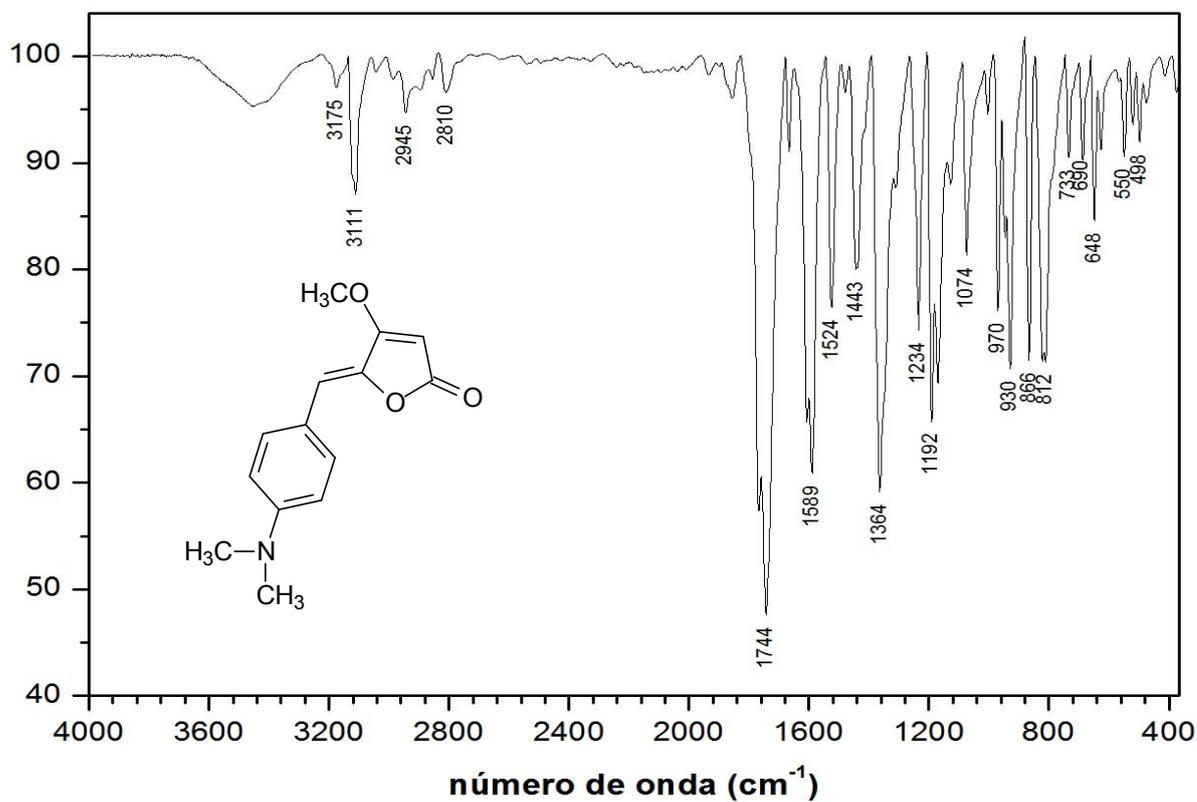


Figura 73. Espectro no IV (KBr) de 14.

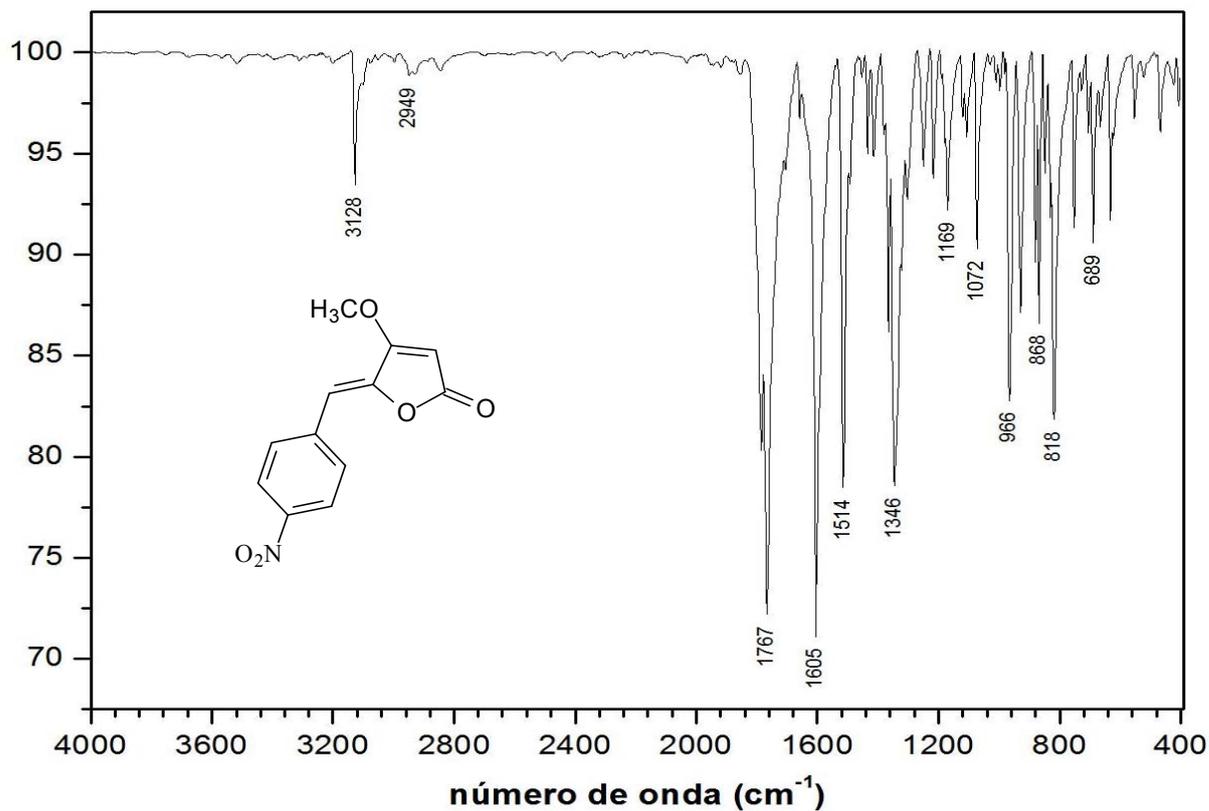


Figura 74. Espectro no IV (KBr) de 15.

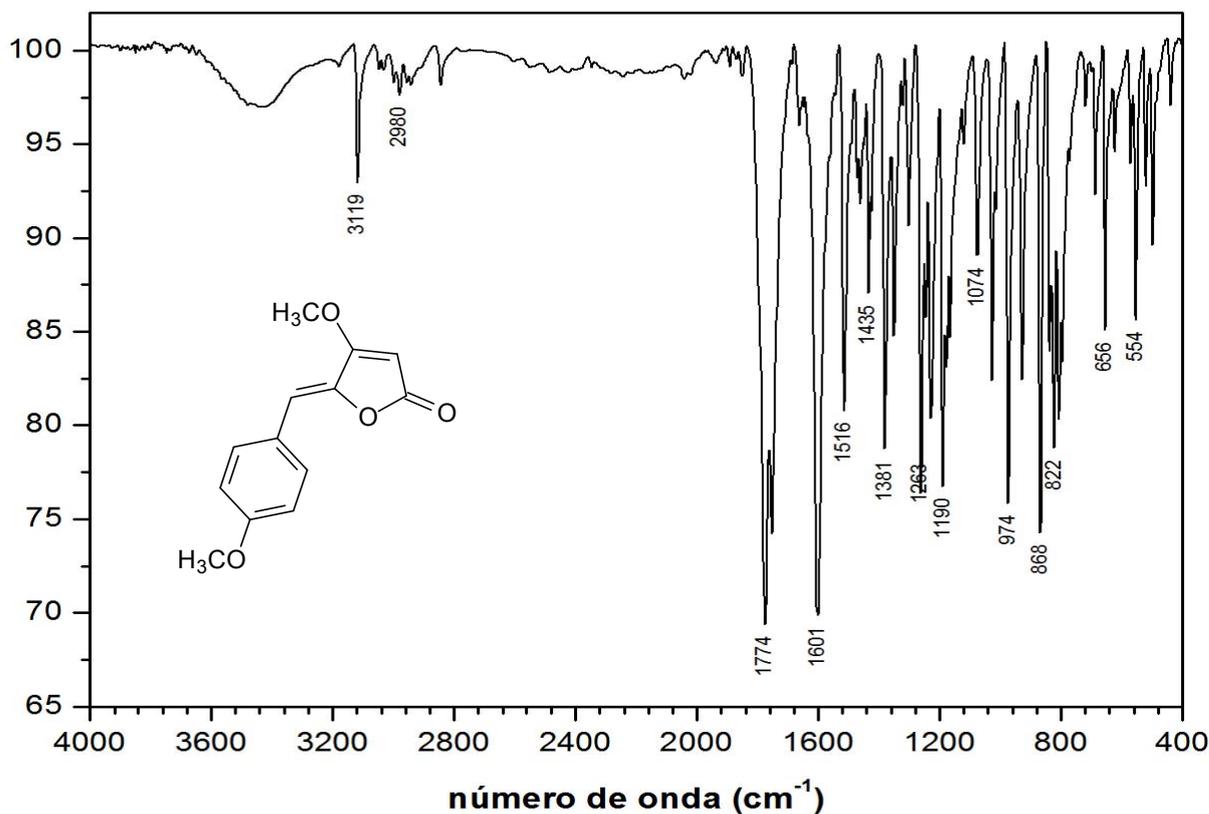


Figura 75. Espectro no IV (KBr) de 16.

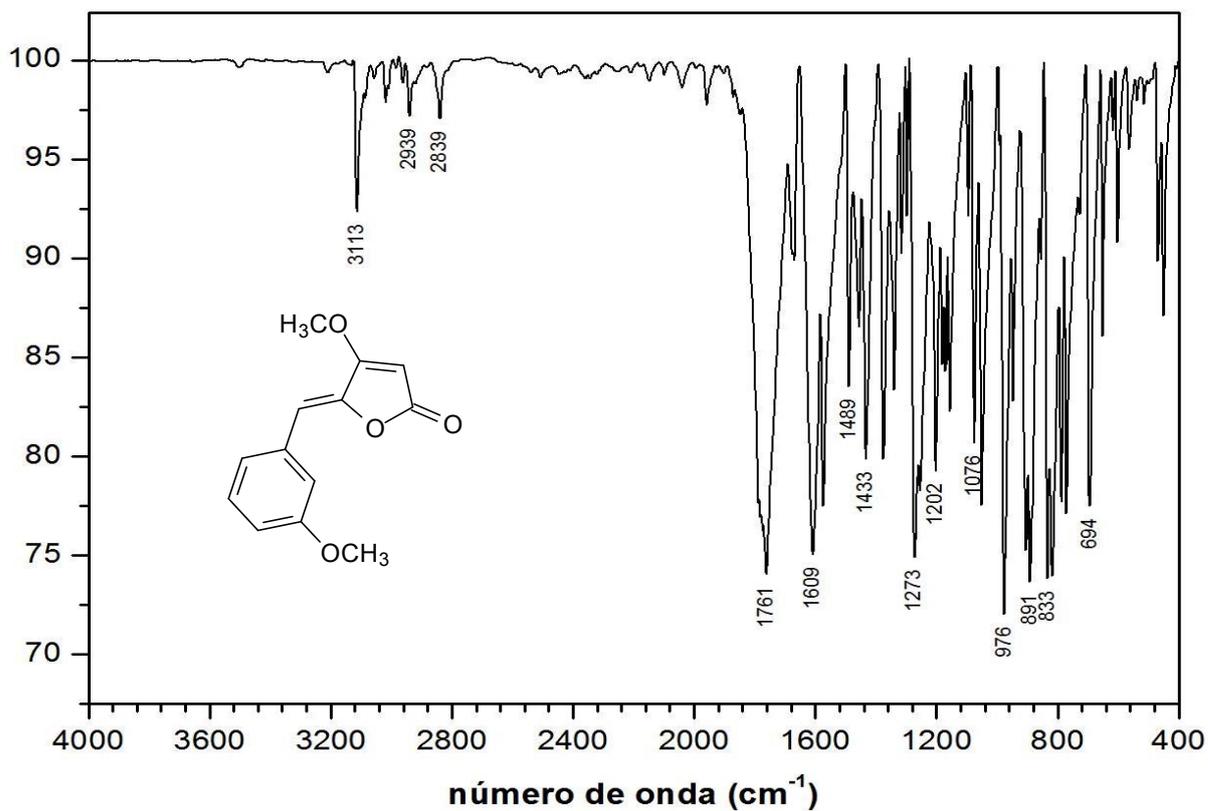


Figura 76. Espectro no IV (KBr) de 17.

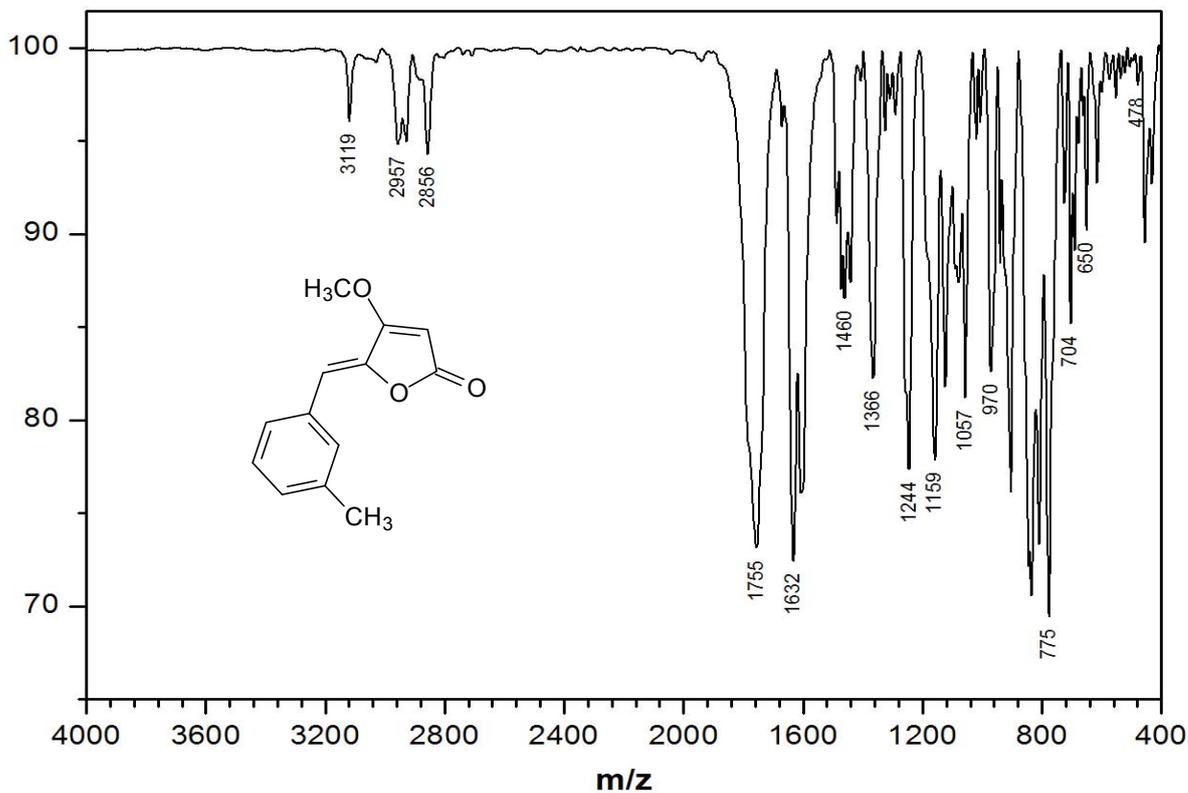


Figura 77. Espectro no IV (KBr) de 18.

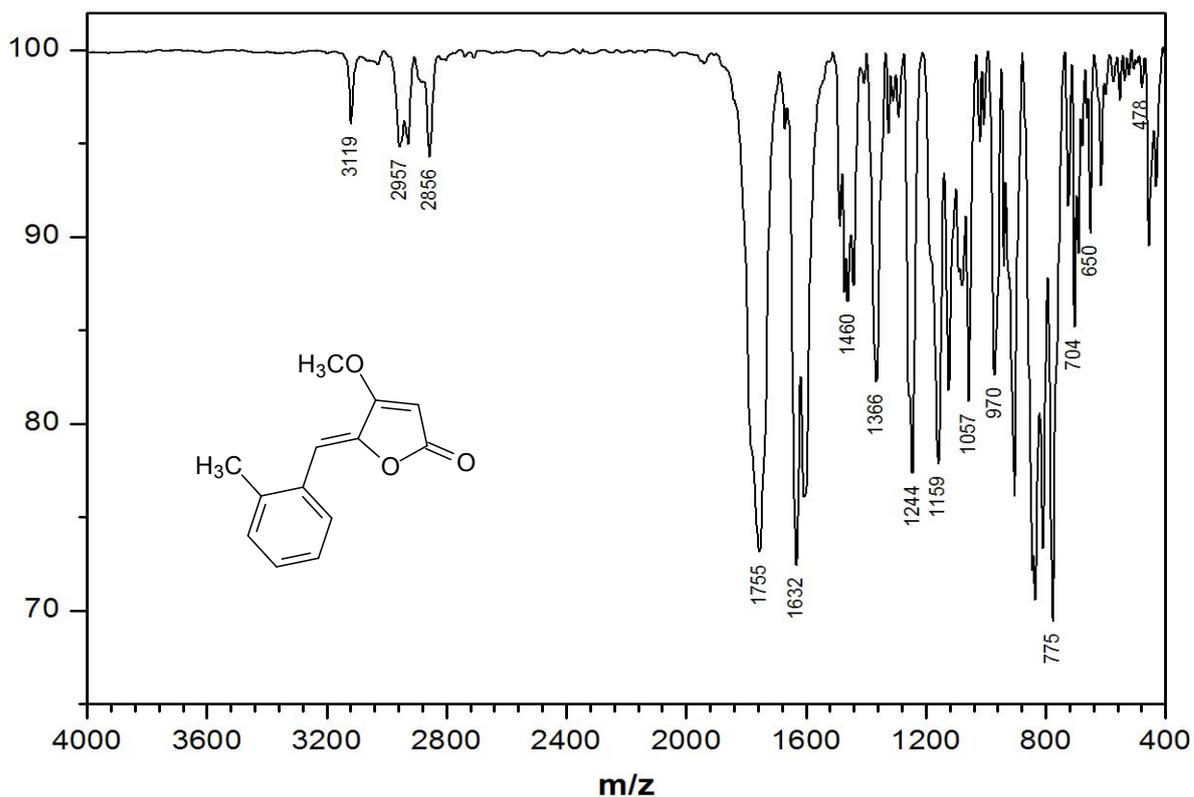


Figura 78. Espectro no IV (KBr) de 19.

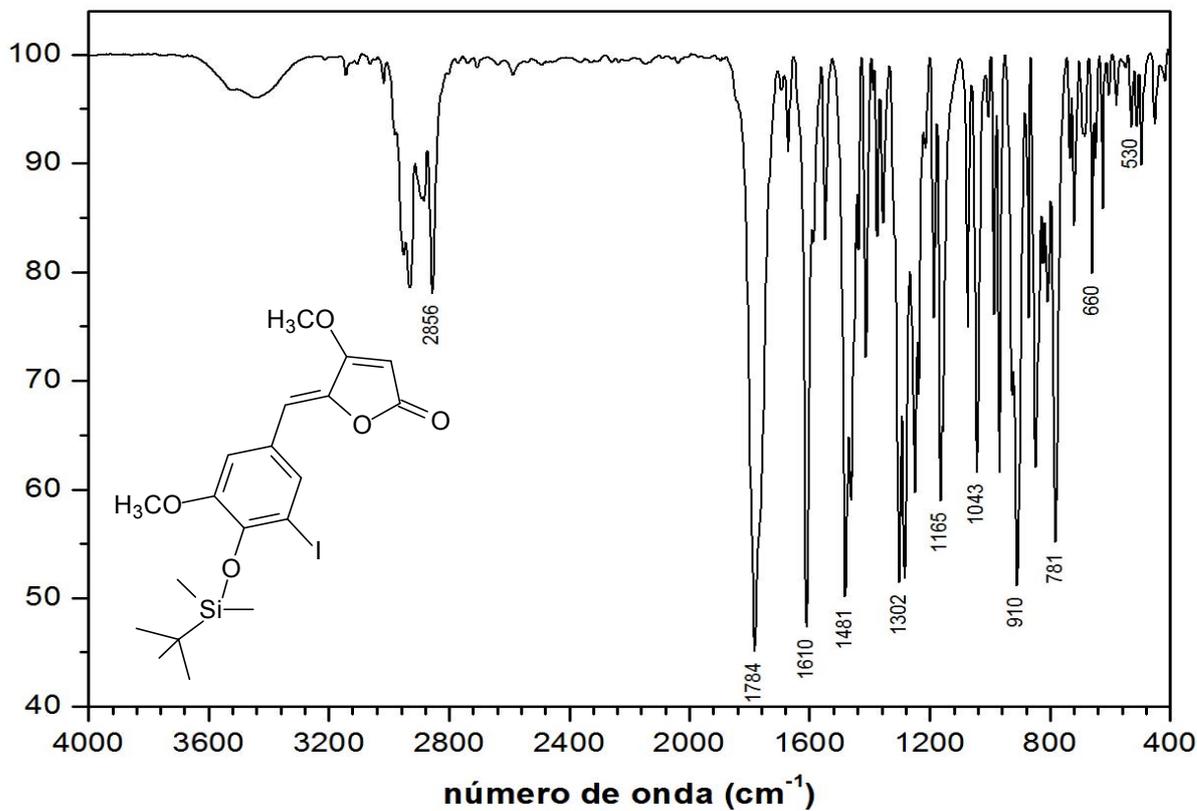


Figura 79. Espectro no IV (KBr) de 20.

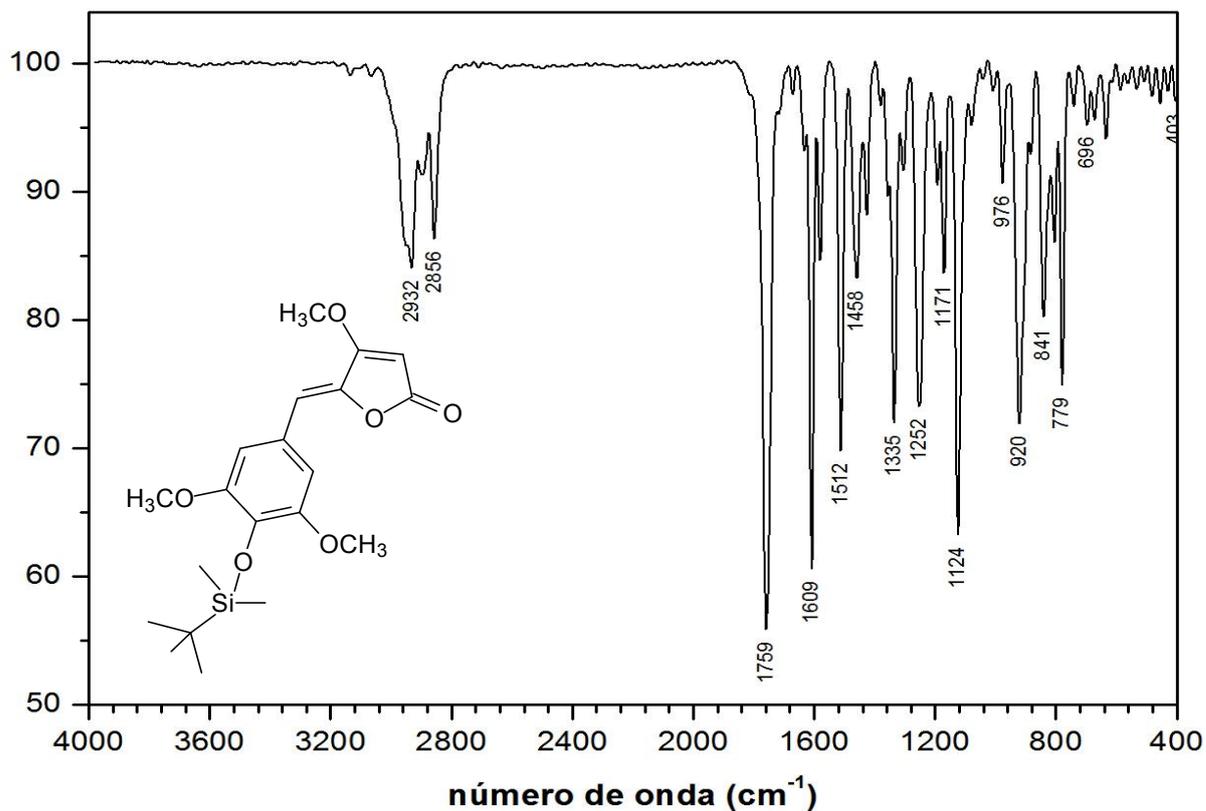


Figura 80. Espectro no IV (KBr) de 22.

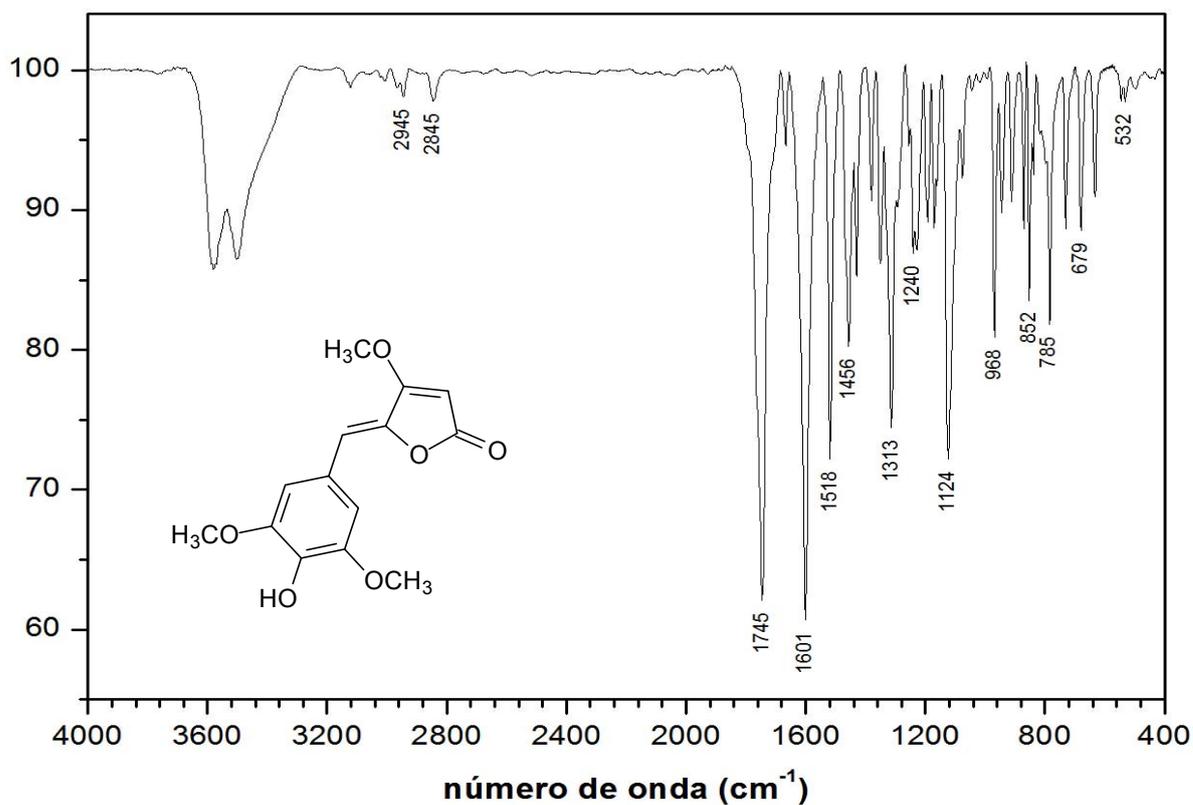


Figura 81. Espectro no IV (KBr) de 23.

Em todos os casos, a presença do pico do íon molecular foi observada nos espectros de massas (Figura 83 a Figura 96) dos γ -arilidenbutenólídeos, o qual se correlaciona com a fórmula molecular dos compostos. Com exceção dos compostos **20** e **22**, todos os outros apresentaram pico base em m/z 69 (Figura 82).

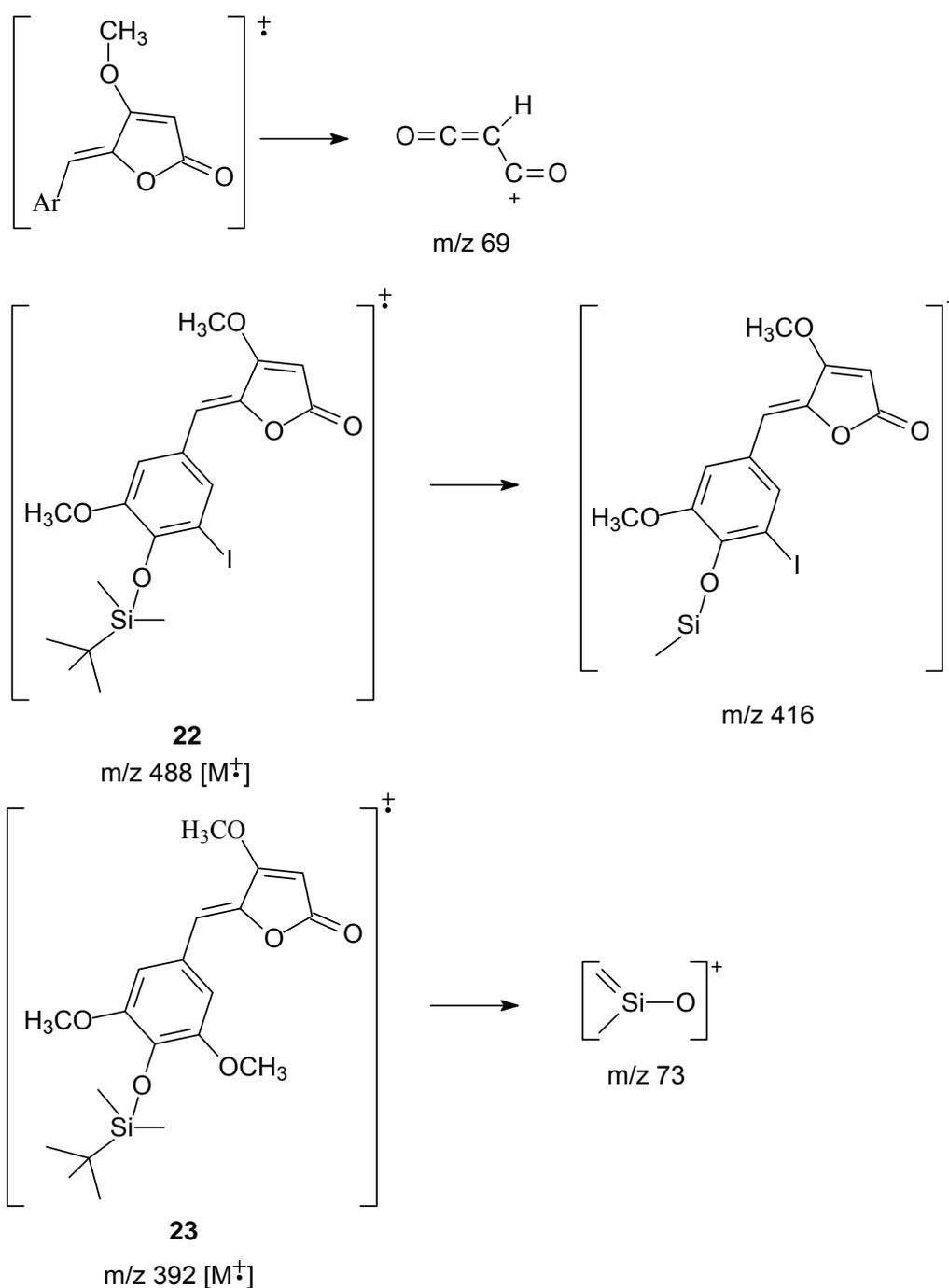


Figura 82. Propostas de fragmentações de massas dos γ -arilidenbutenólídeos relacionadas à obtenção dos picos bases.

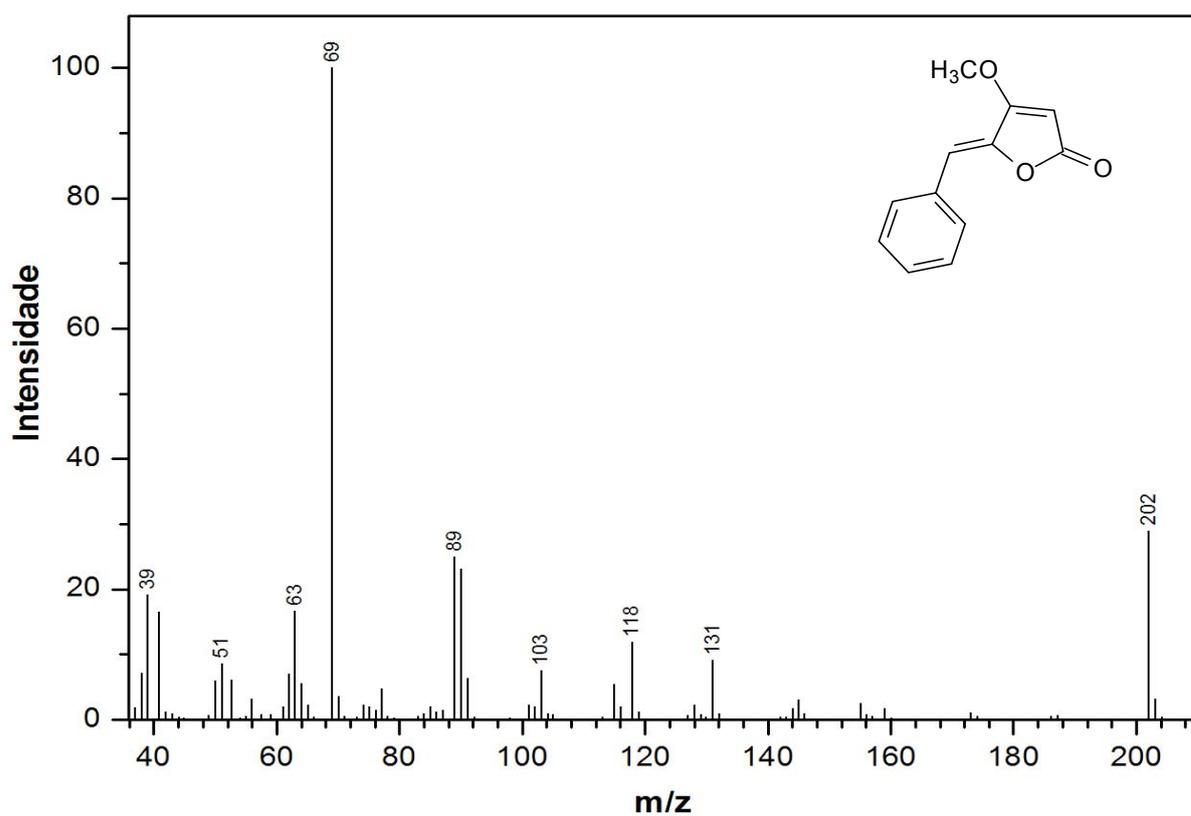


Figura 83. Espectro de massas de 8.

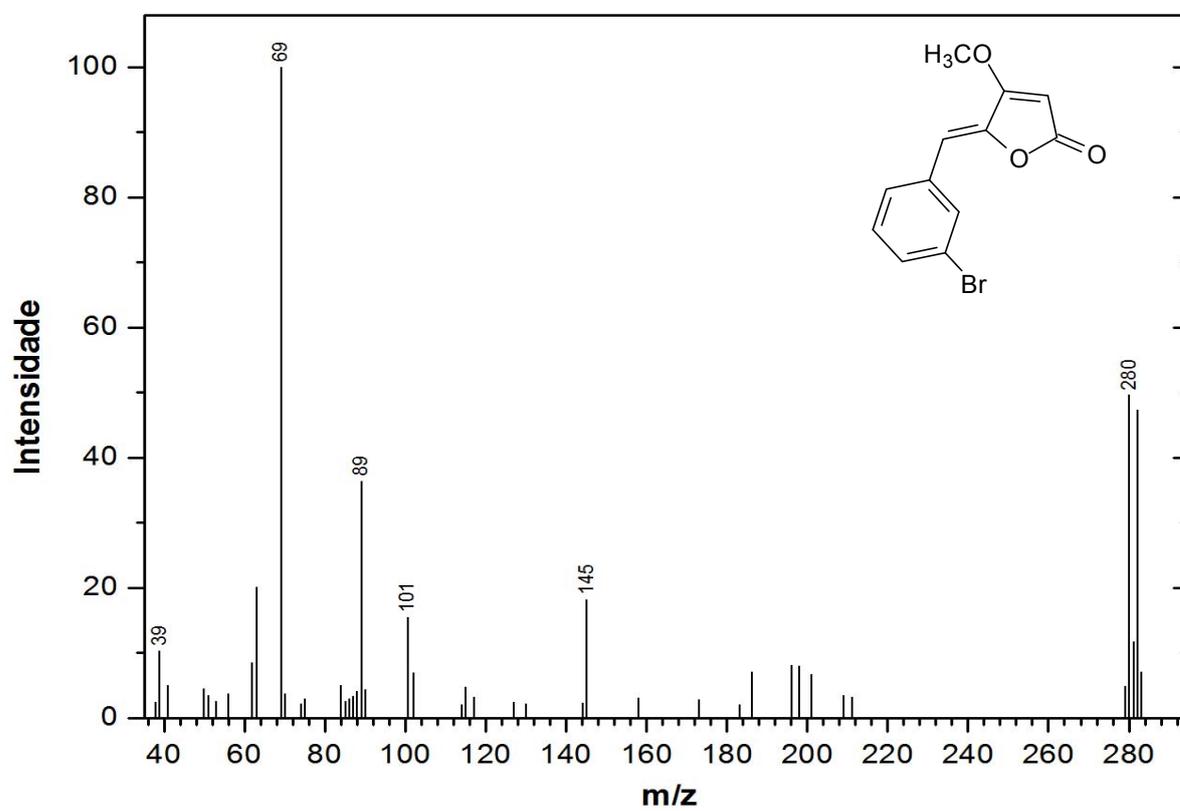


Figura 84. Espectro de massas de 10.

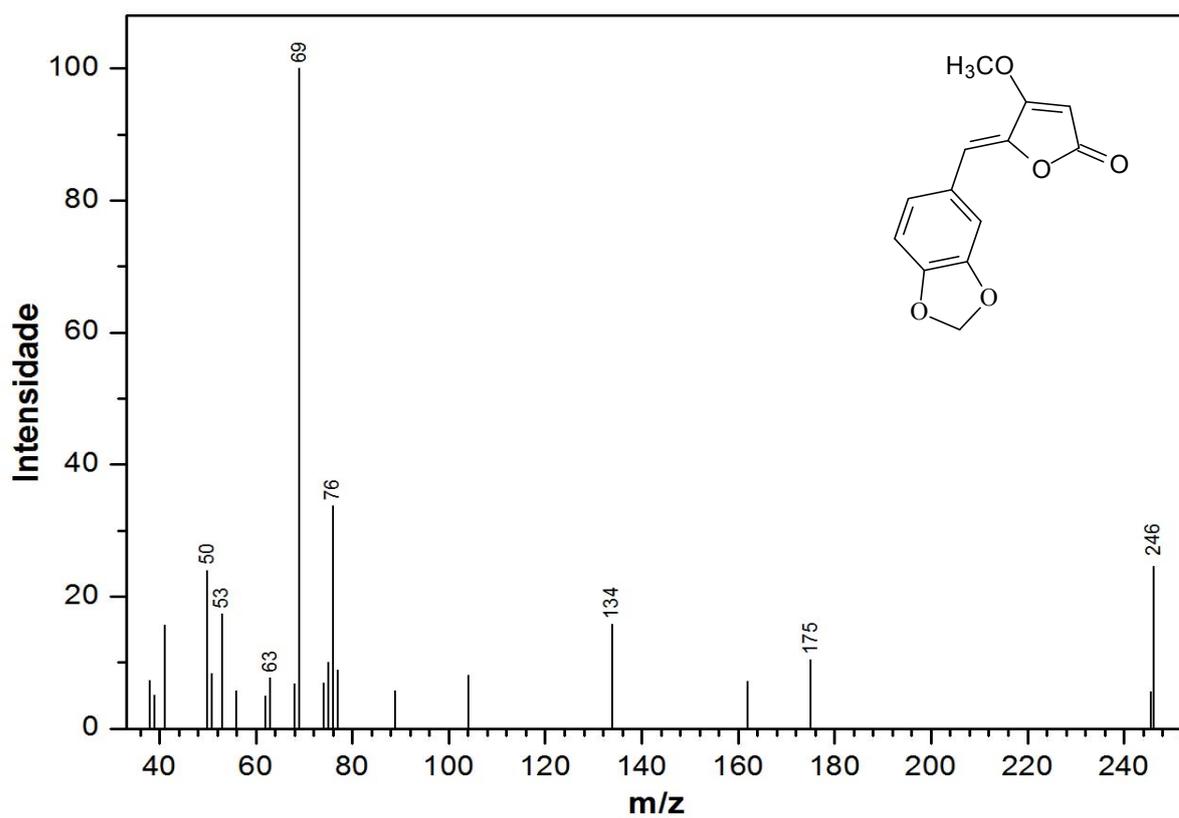


Figura 85. Espectro de massas de 11.

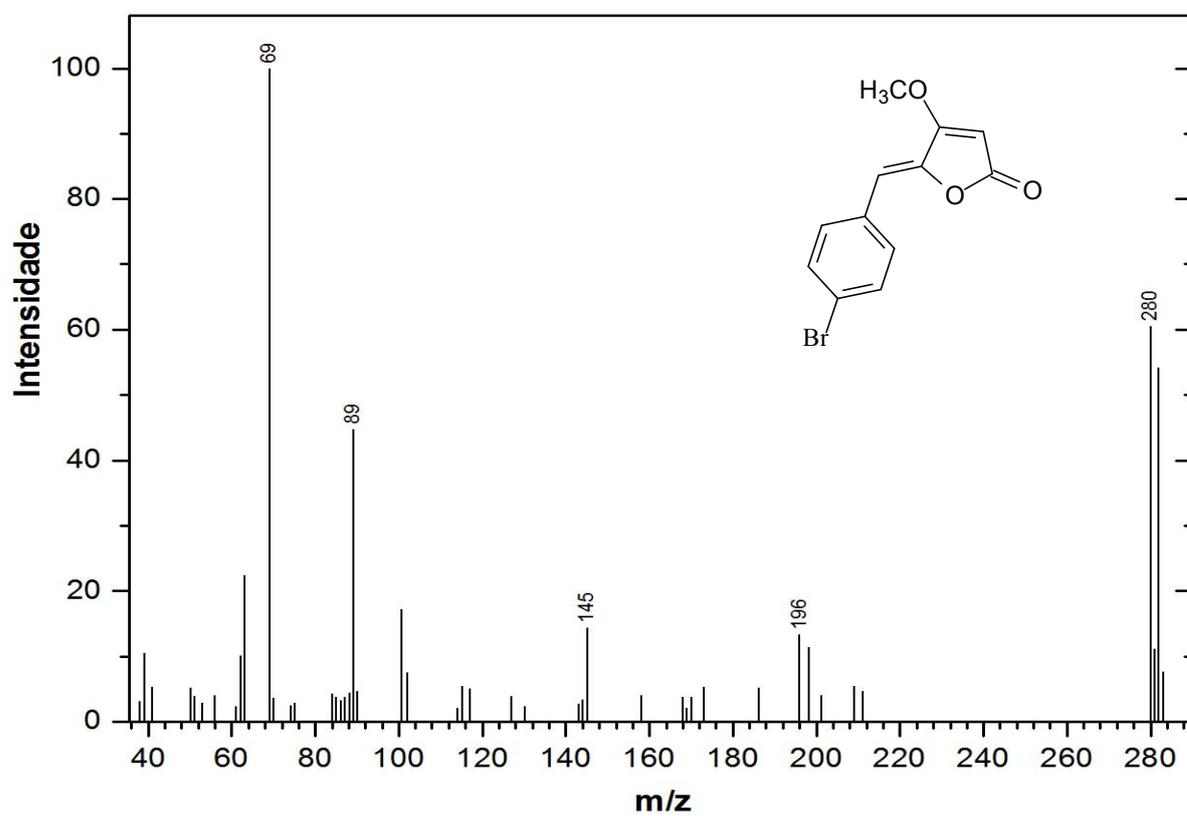


Figura 86. Espectro de massas de 12.

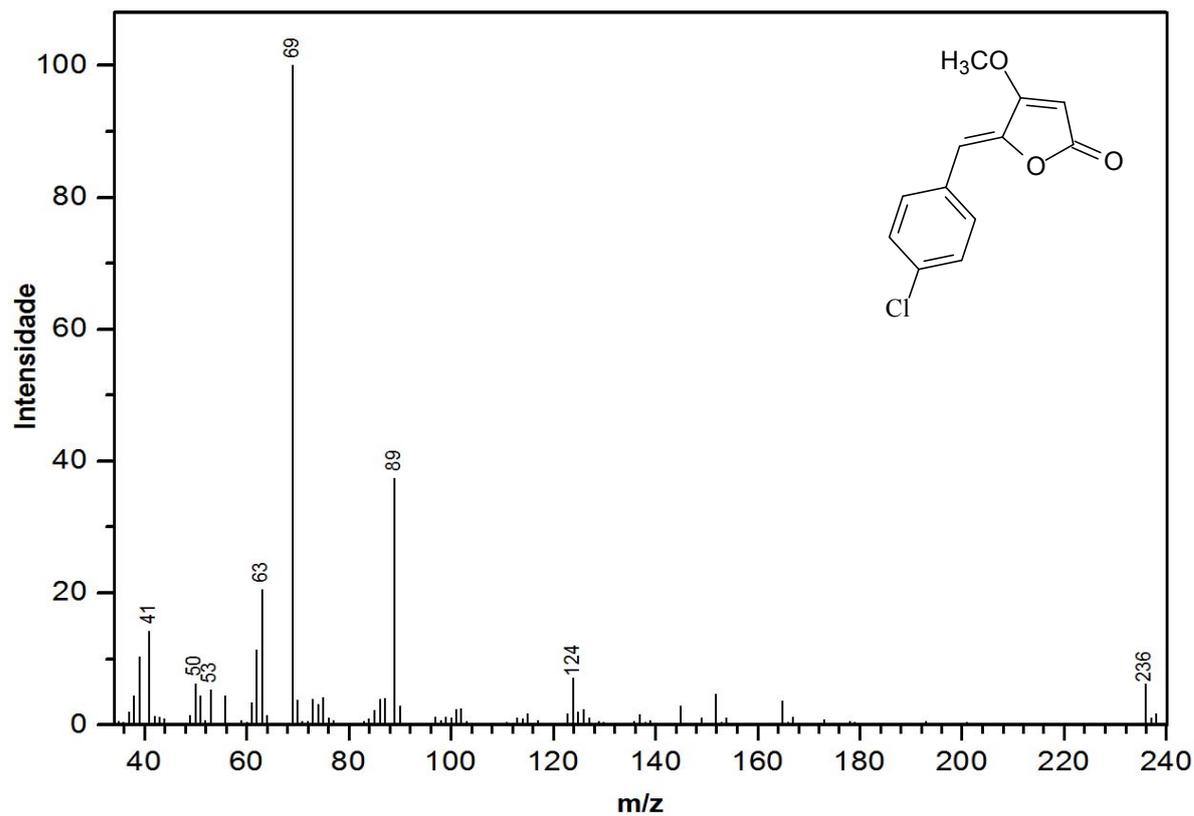


Figura 87. Espectro de massas de 13.

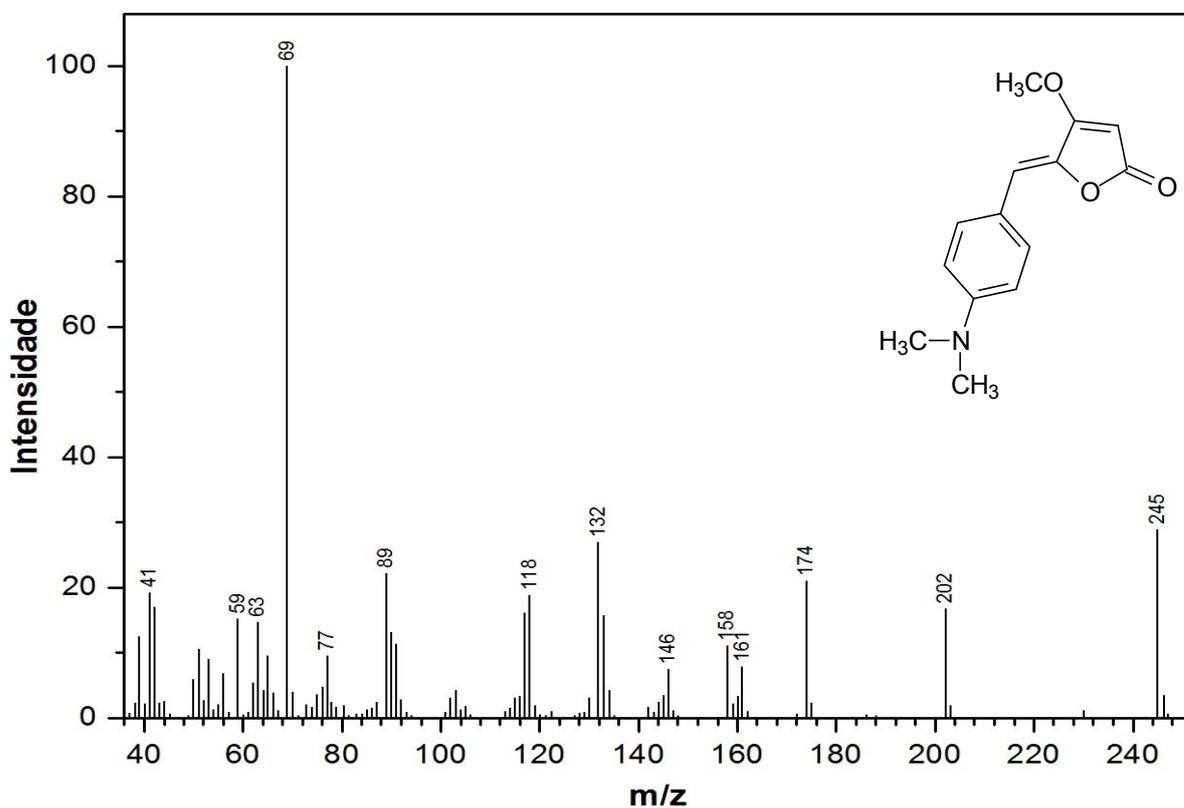


Figura 88. Espectro de massas de 14.

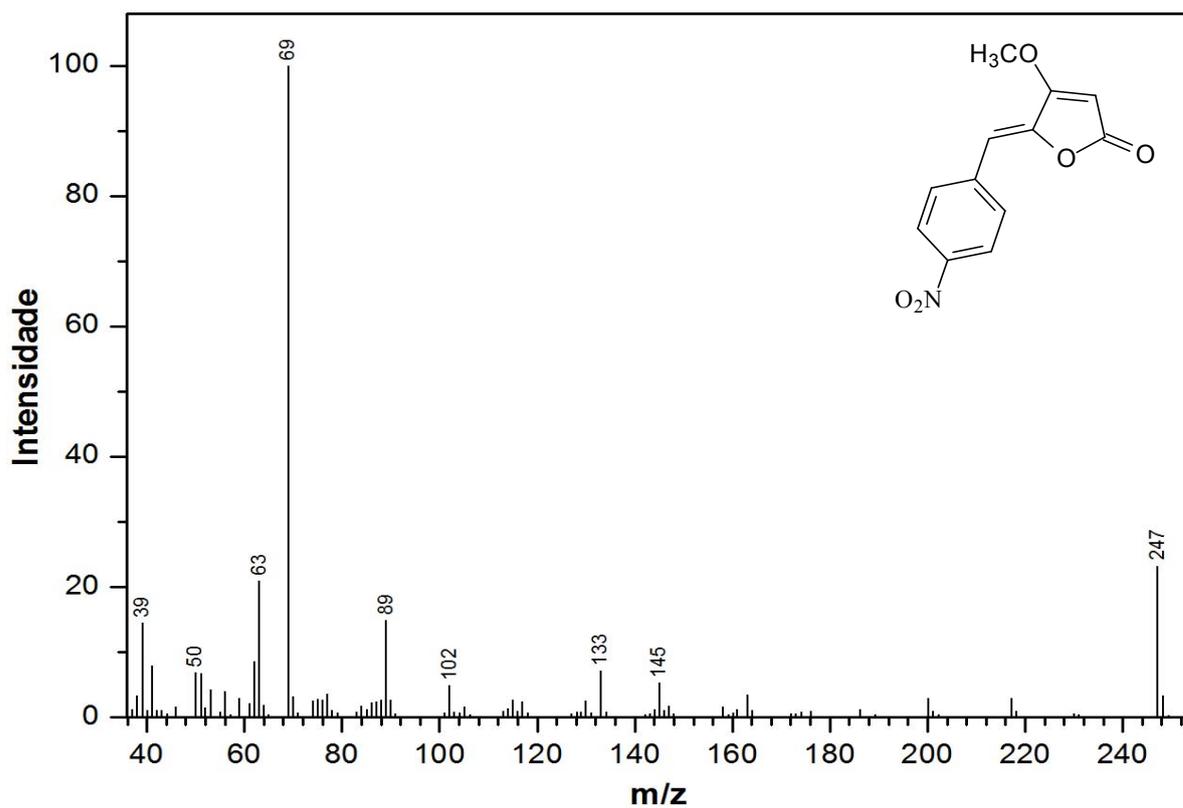


Figura 89. Espectro de massas de 15.

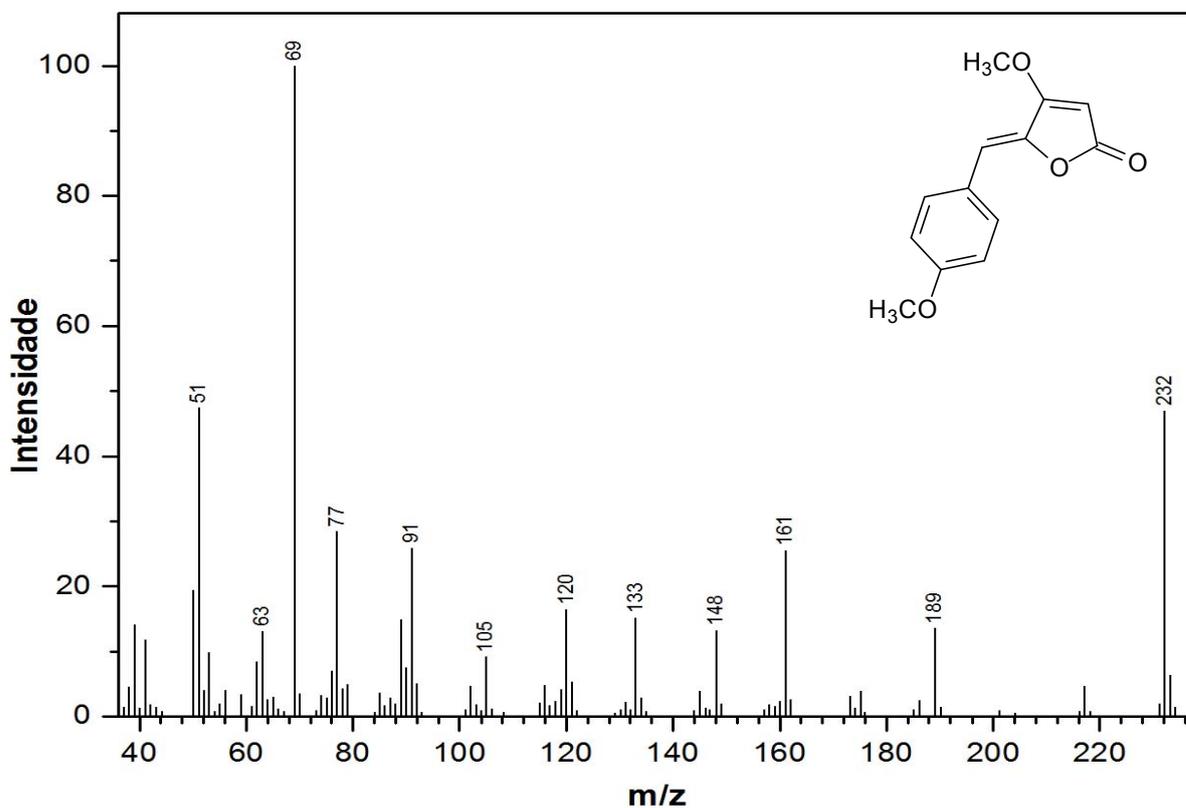


Figura 90. Espectro de massas de 16.

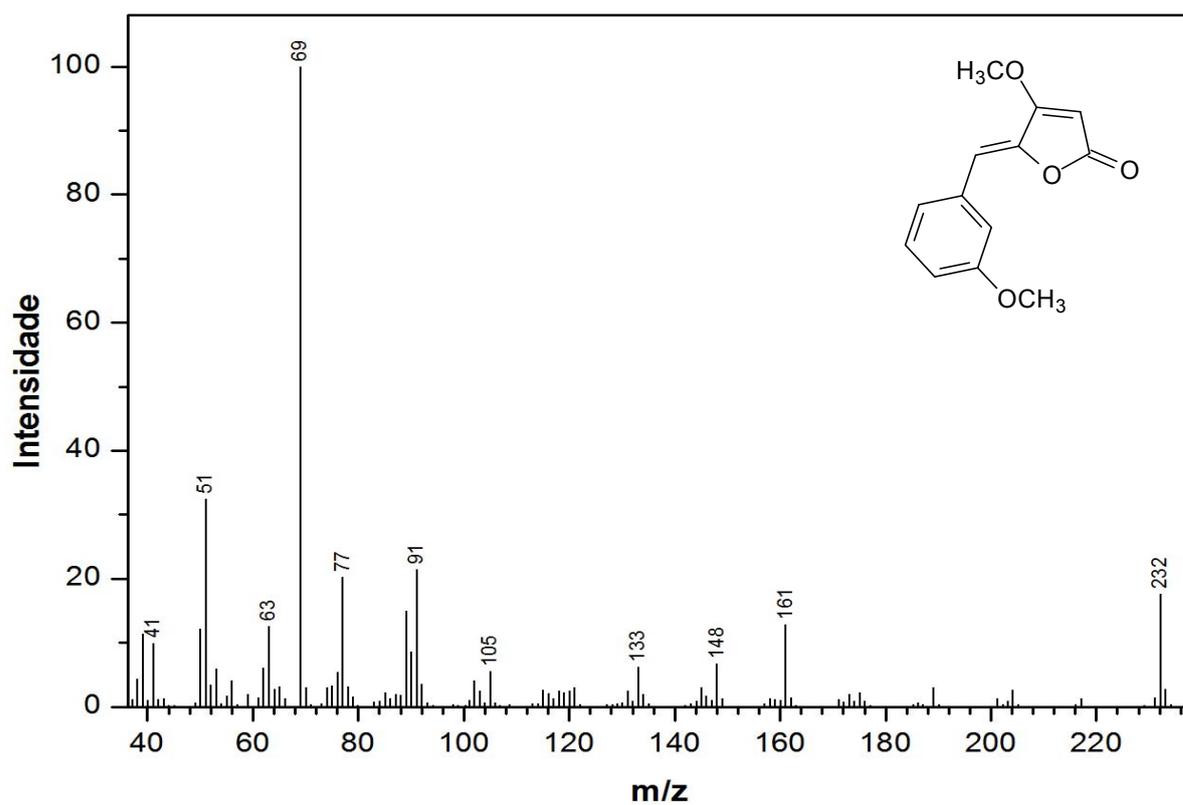


Figura 91. Espectro de massas de 17.

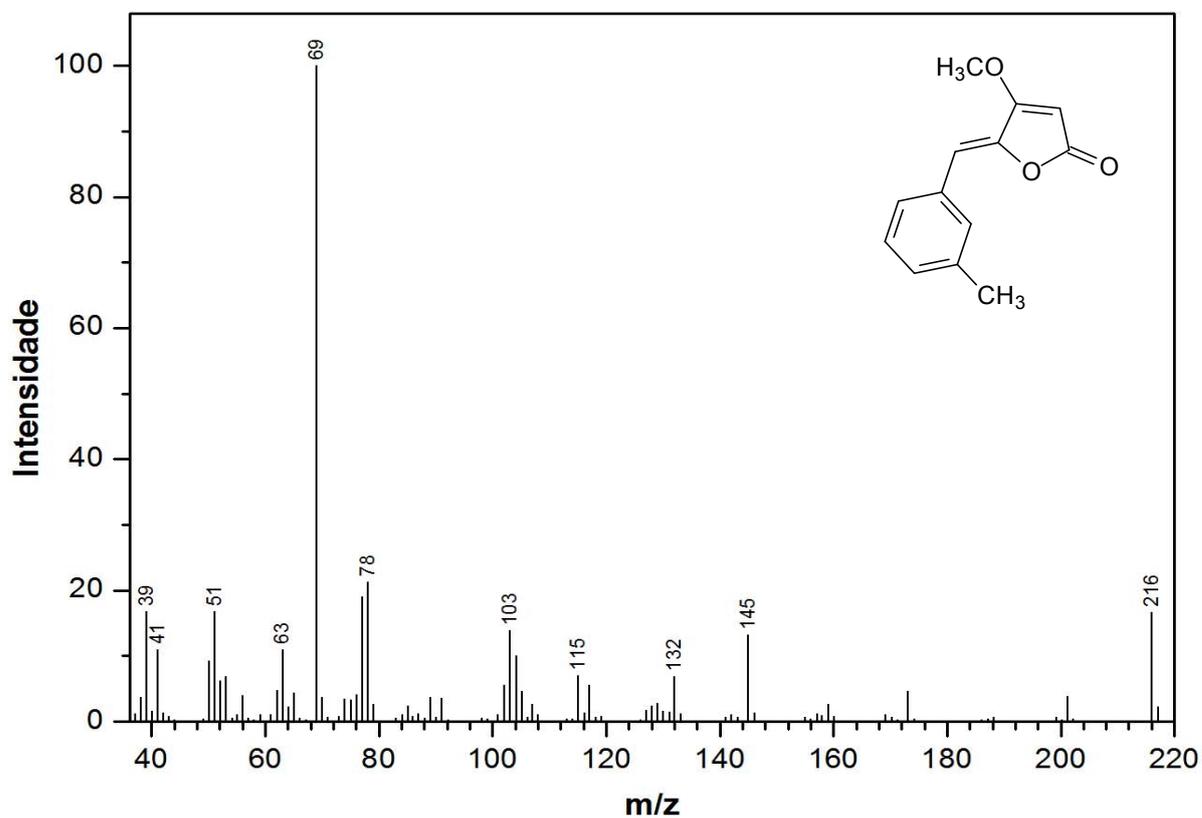


Figura 92. Espectro de massas de 18.

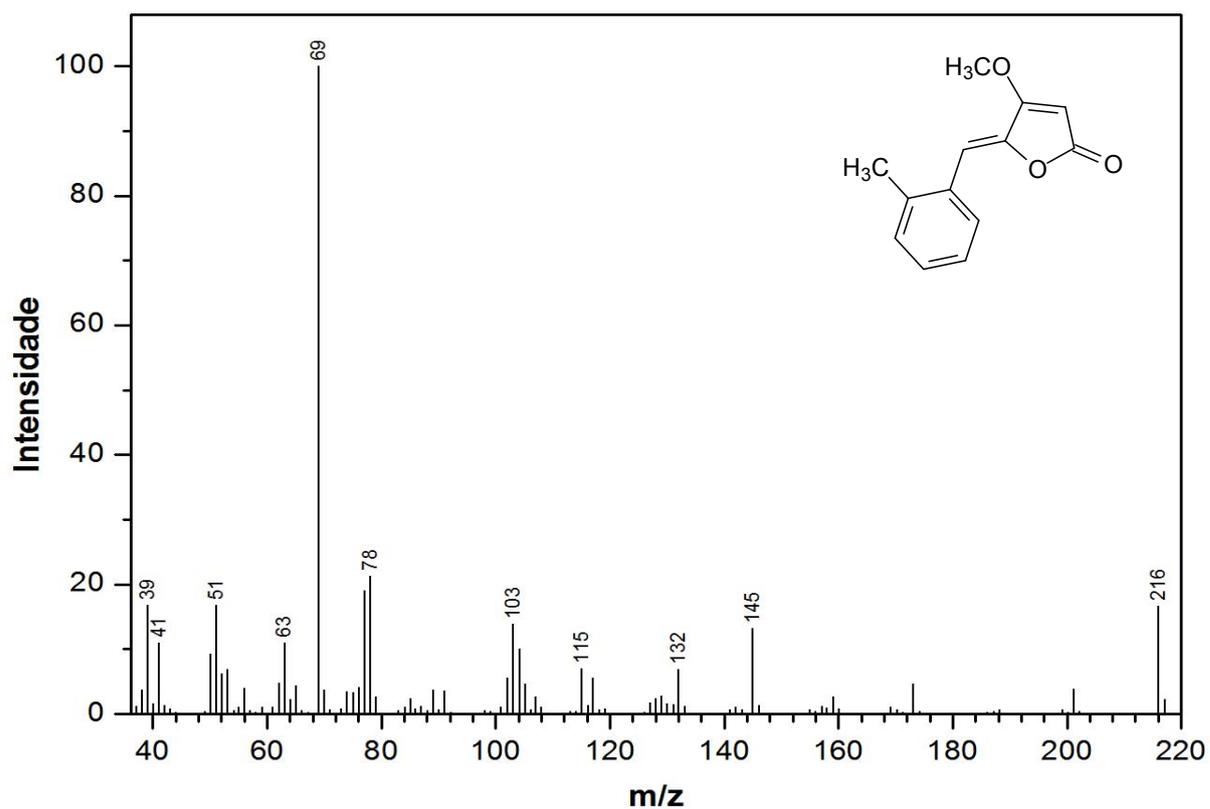


Figura 93. Espectro de massas de 19.

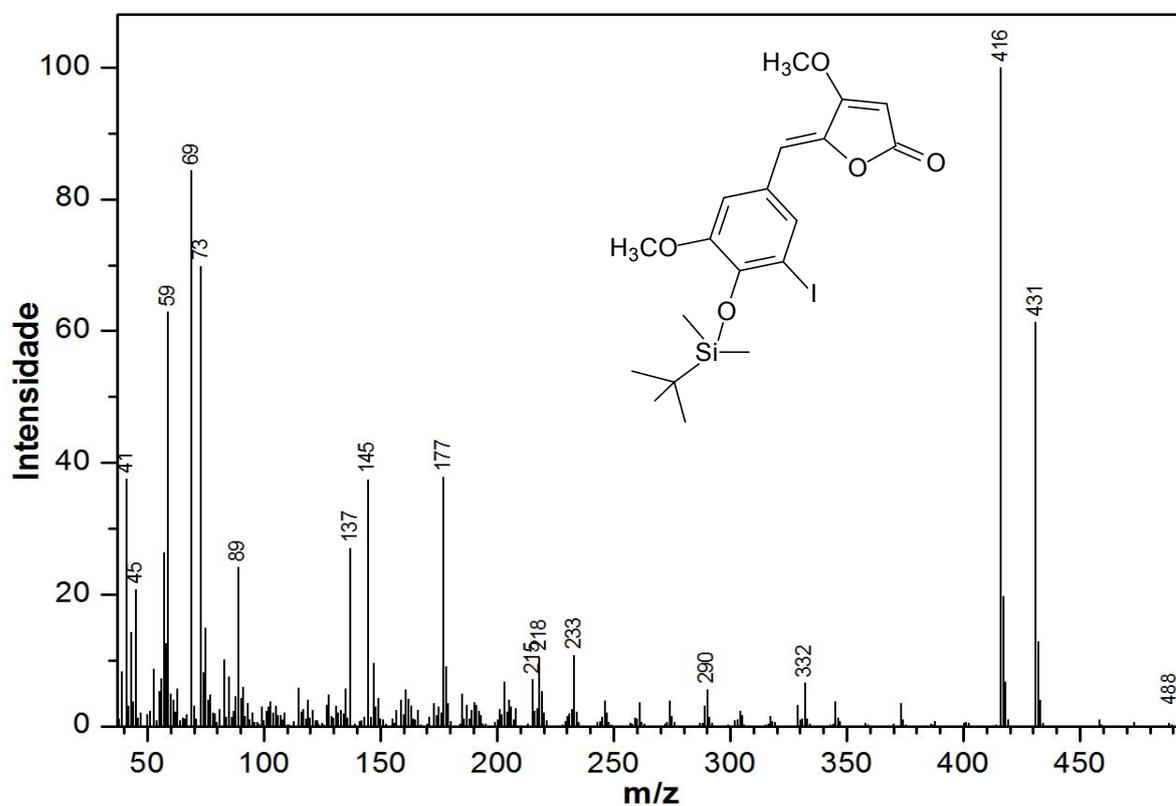


Figura 94. Espectro de massas de 20.

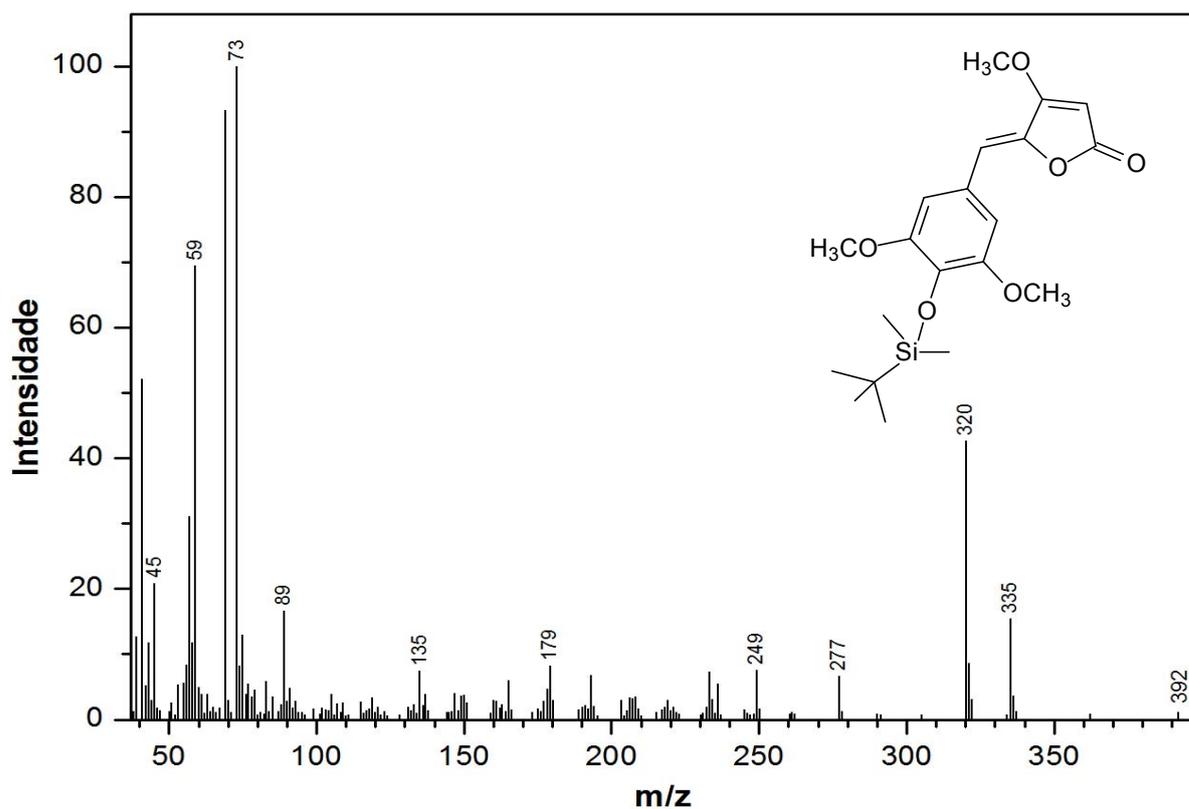


Figura 95. Espectro de massas de 22.

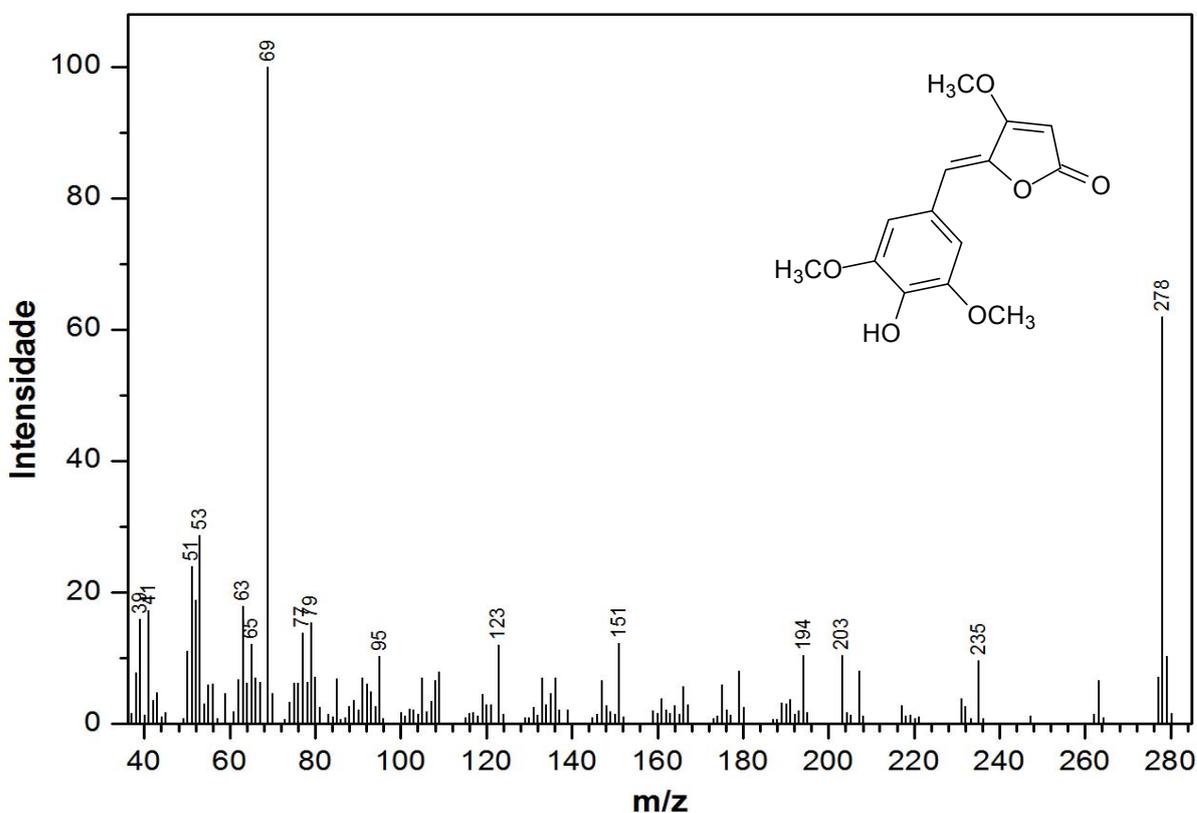


Figura 96. Espectro de massas de 23.

A classe dos γ -arilidenobutenólídeos sintetizados apresentam os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C semelhantes. Portanto, aqui será feita a discussão apenas para o composto (5Z)-5-(4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-3,5-dimetoxibenzilideno)-4-metoxifuran-2(5H)-ona (**22**).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 97) do composto **22** os sinais de ressonância mais importantes que confirmam a formação do produto são o simpleto em δ 6,14; referente ao hidrogênio H6 confirmando a formação da ligação dupla exocíclica, e os sinais em δ 0,14 e 1,00 referente ao grupo *tert*-butildimetilsilil e δ 6,97 (s, 2H, H8 e H12), referente ao hidrogênio do anel aromático. Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 98) a formação do produto é confirmada pela presença dos sinais em δ 108,5 (C6) e 140,8 (C5), referentes aos carbonos da dupla ligação exocíclica e os sinais δ -4,6 (Si(CH₃)₂); 55,8 (9,11-OCH₃); 107,9 (C8 e C12); 125,1 (C7); 136,0 (C10) e 151,6 (C9 e C11), relacionados ao anel aromático. Na Tabela 26 estão representados os sinais de RMN de ^{13}C mais importantes dos γ -arilidenobutenólídeos sintetizados. As atribuições dos hidrogênios e carbonos aromáticos estão de acordo com os dados apresentados na literatura para compostos similares (Barbosa *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2007).

Tabela 26. Principais dados de RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3) para os γ -arilidenobutenolídeos.

Compostos	δ RMN de ^{13}C				
	C2	C3	C4	C5	C6
8	168,7	88,3	171,1	142,3	107,8
10	168,2	88,6	170,9	143,1	106,0
11	168,7	88,7	171,1	140,8	107,8
12	168,4	88,4	170,9	142,6	106,4
13	168,3	88,4	170,9	142,5	106,4
14	169,4	86,8	171,2	139,1	109,0
15	167,6	89,2	170,7	139,1	104,8
16	168,9	87,6	171,1	140,7	107,7
17	168,5	88,2	171,0	142,3	107,7
18	168,8	88,1	171,1	142,0	108,0
19	168,8	88,2	171,1	142,3	104,4
20	168,5	87,9	171,0	141,2	106,5
22	168,8	87,6	171,1	140,8	107,9
23	168,8	87,6	171,1	140,8	107,5

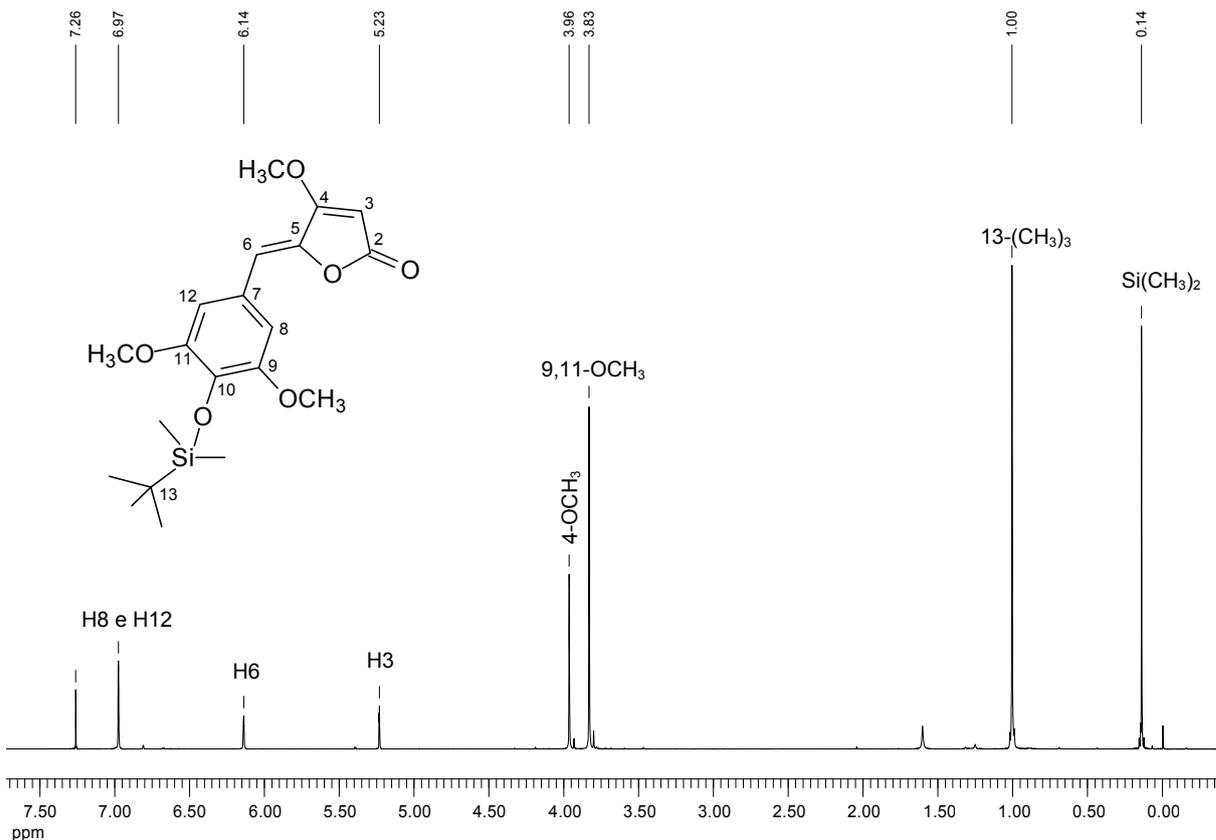


Figura 97. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 22.

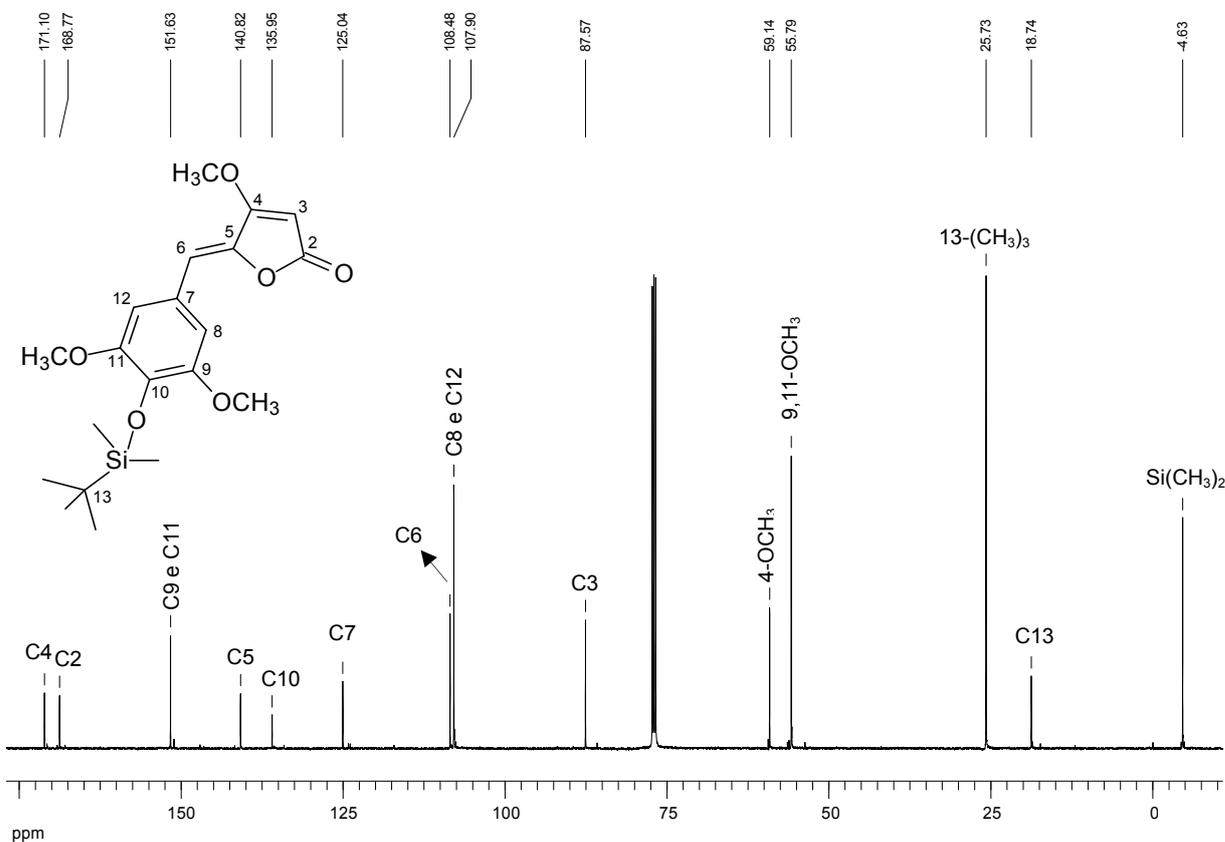


Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 22.

As atribuições para o composto **22** também foram confirmadas pela análise do espectro de RMN de duas dimensões HMBC ^1H - ^{13}C , cujas atribuições feitas a partir do espectro estão apresentadas na Figura 99. Os resultados obtidos ajudaram na atribuição dos demais compostos sintetizados.

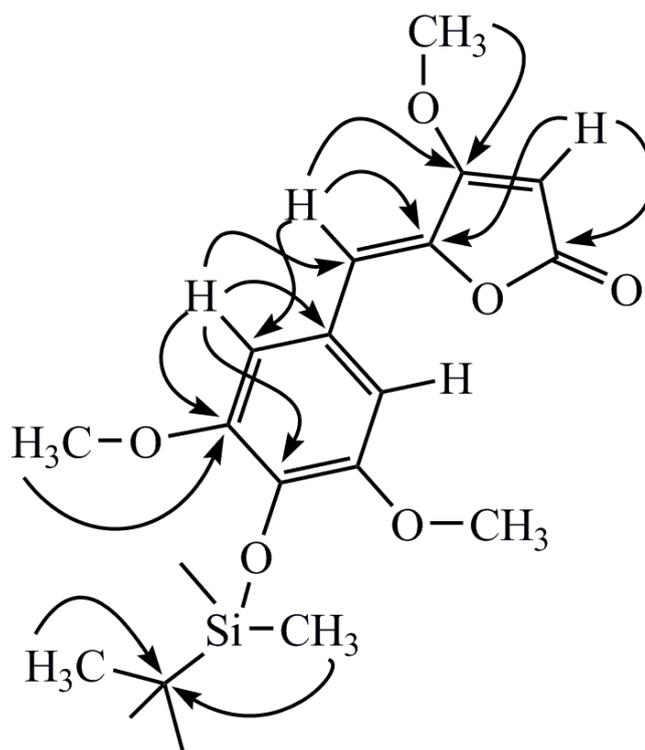
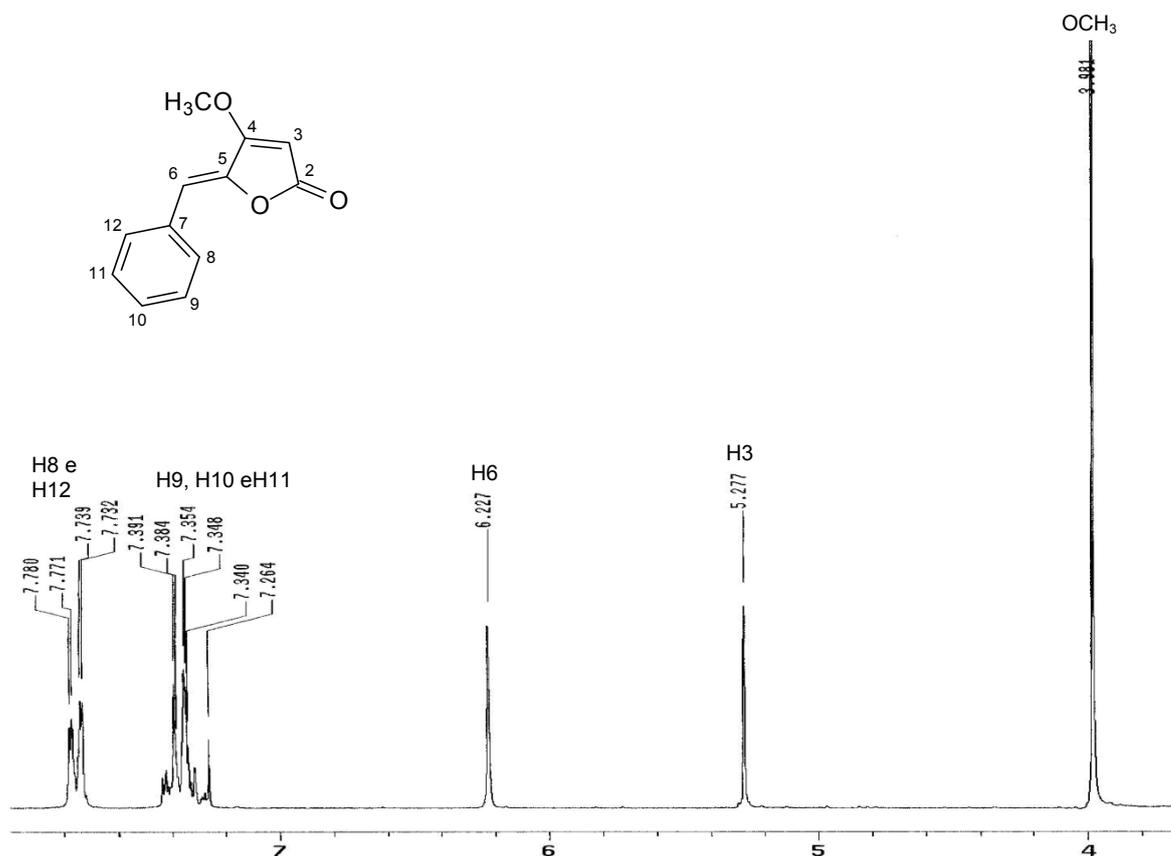
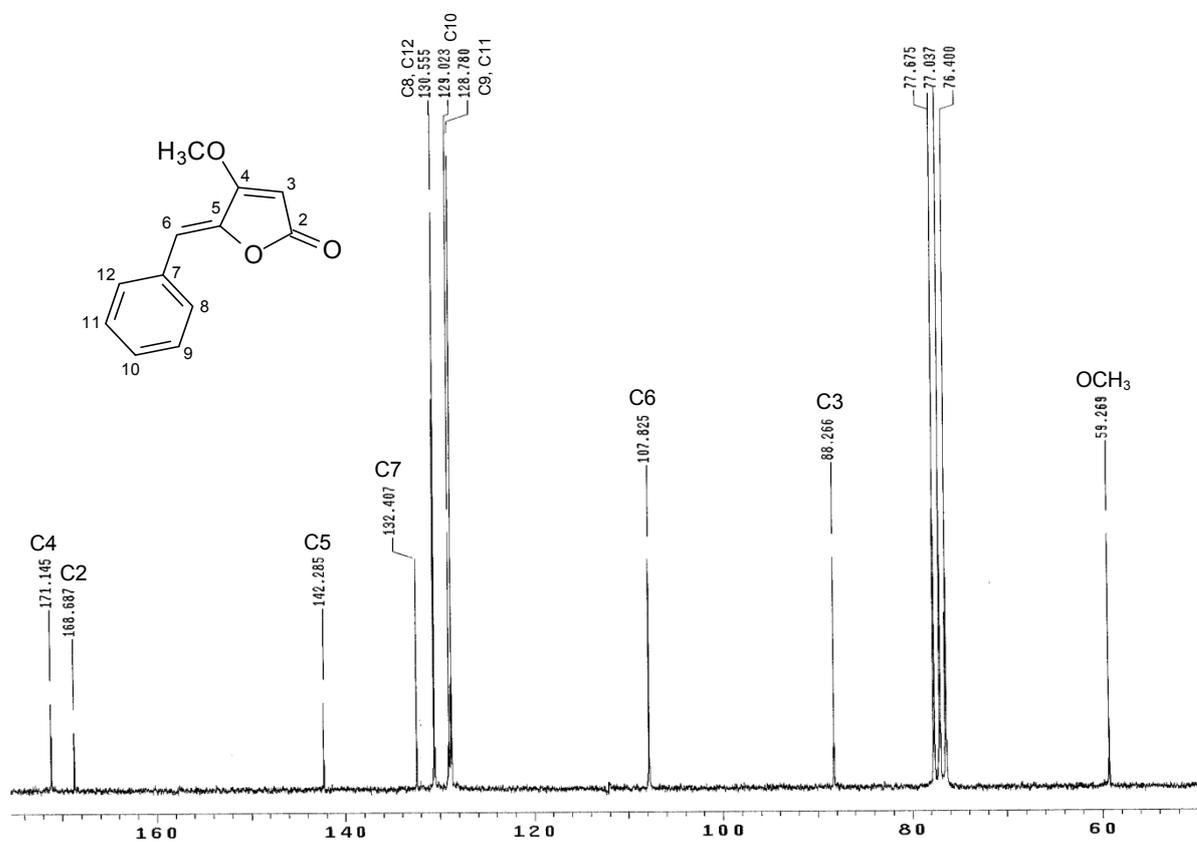


Figura 99. Correlações ^1H - ^{13}C (J^2 e J^3) a longa distância (HMBC) para o composto **22**.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos γ -arilidenobutenolídeos 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 23 estão apresentados nas Figura 100 a Figura 125.

Figura 100. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 8.Figura 101. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 8.

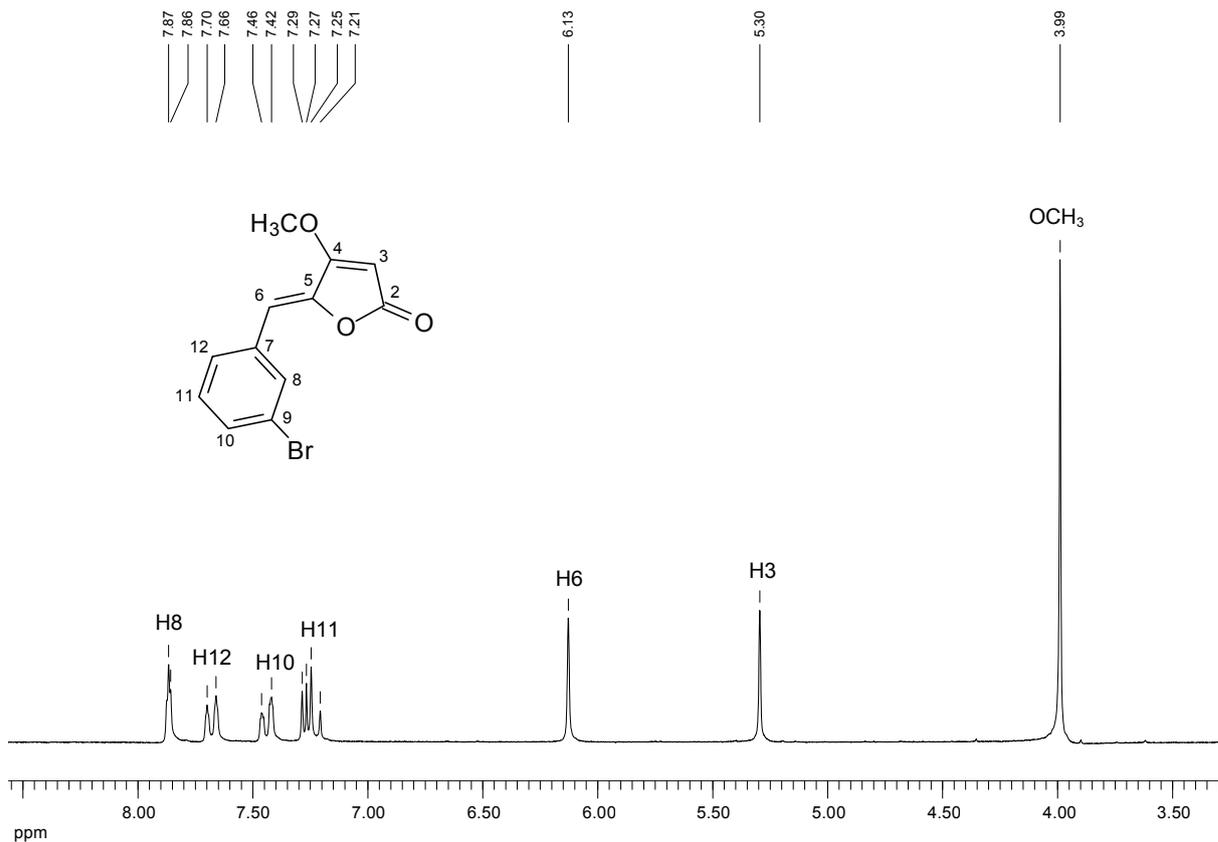


Figura 102. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 10.

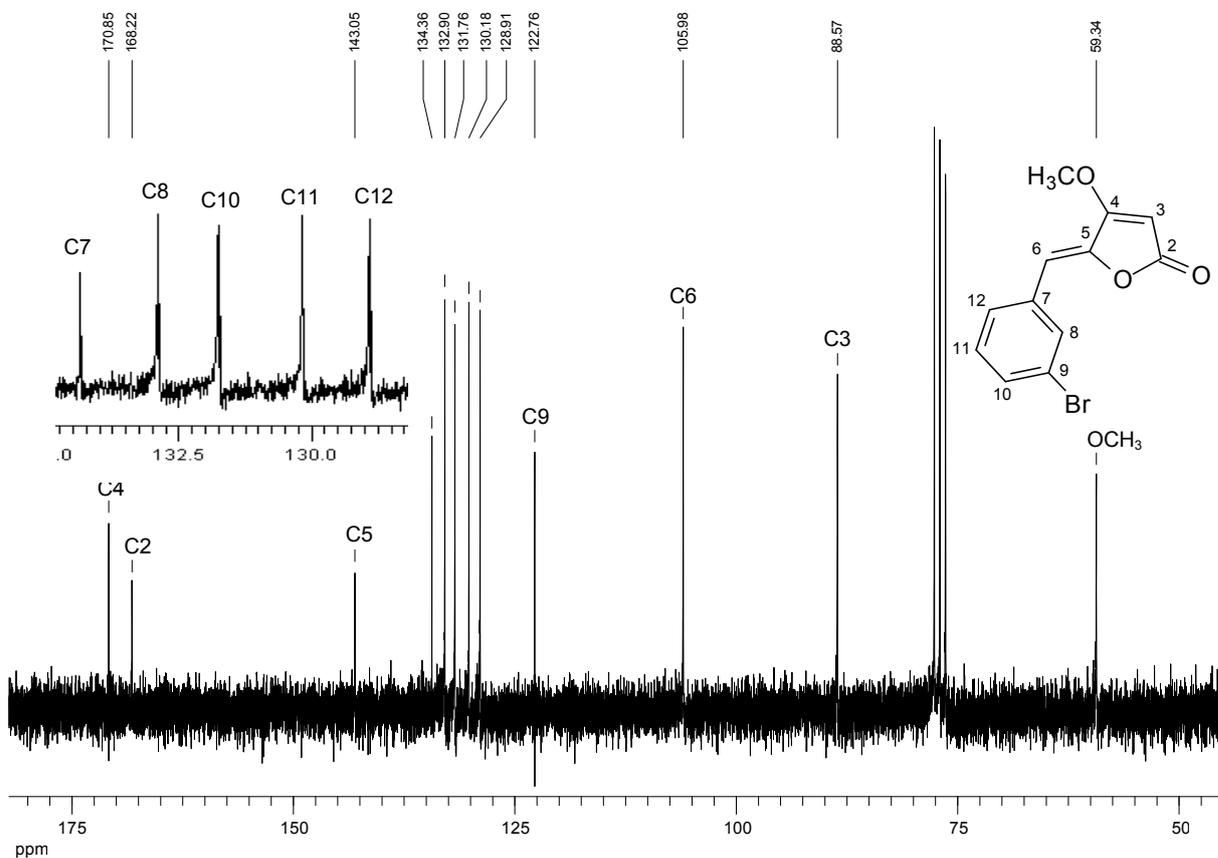


Figura 103. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 10.

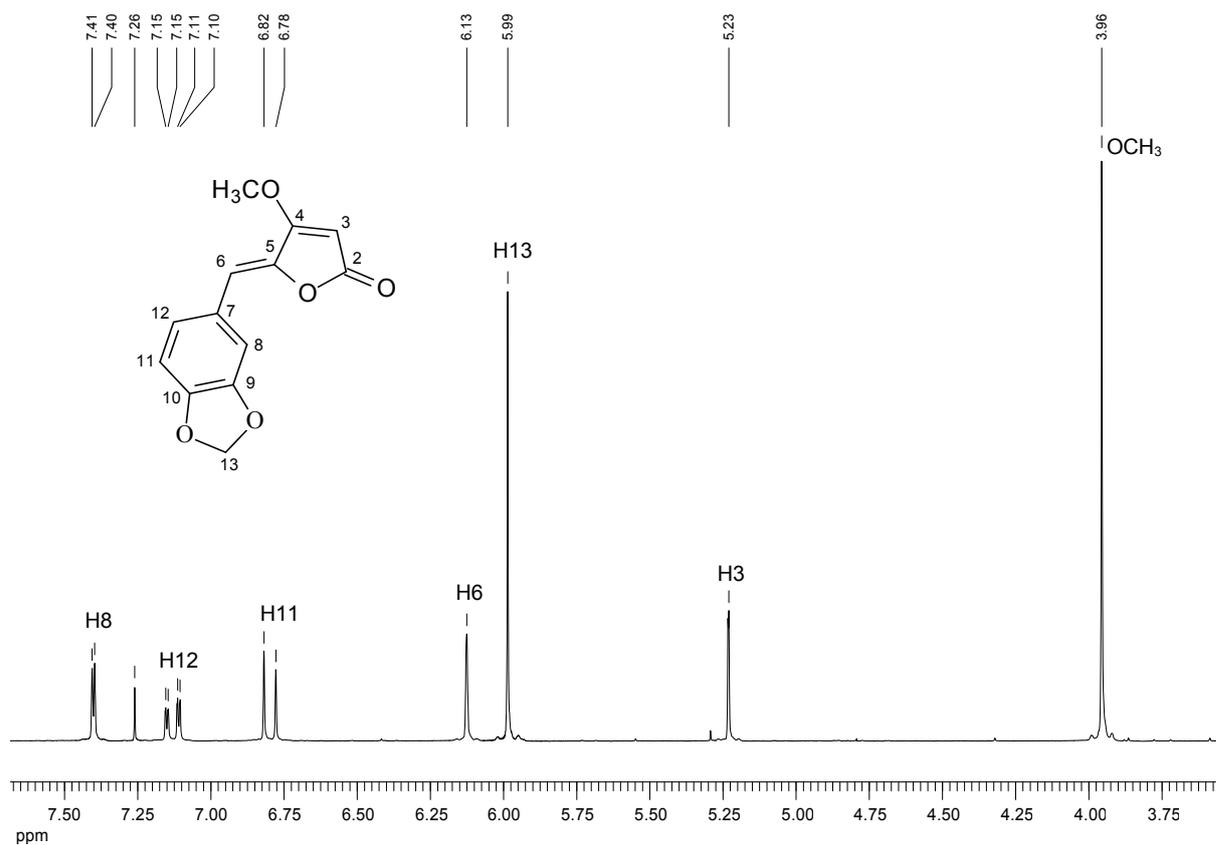


Figura 104. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 11.

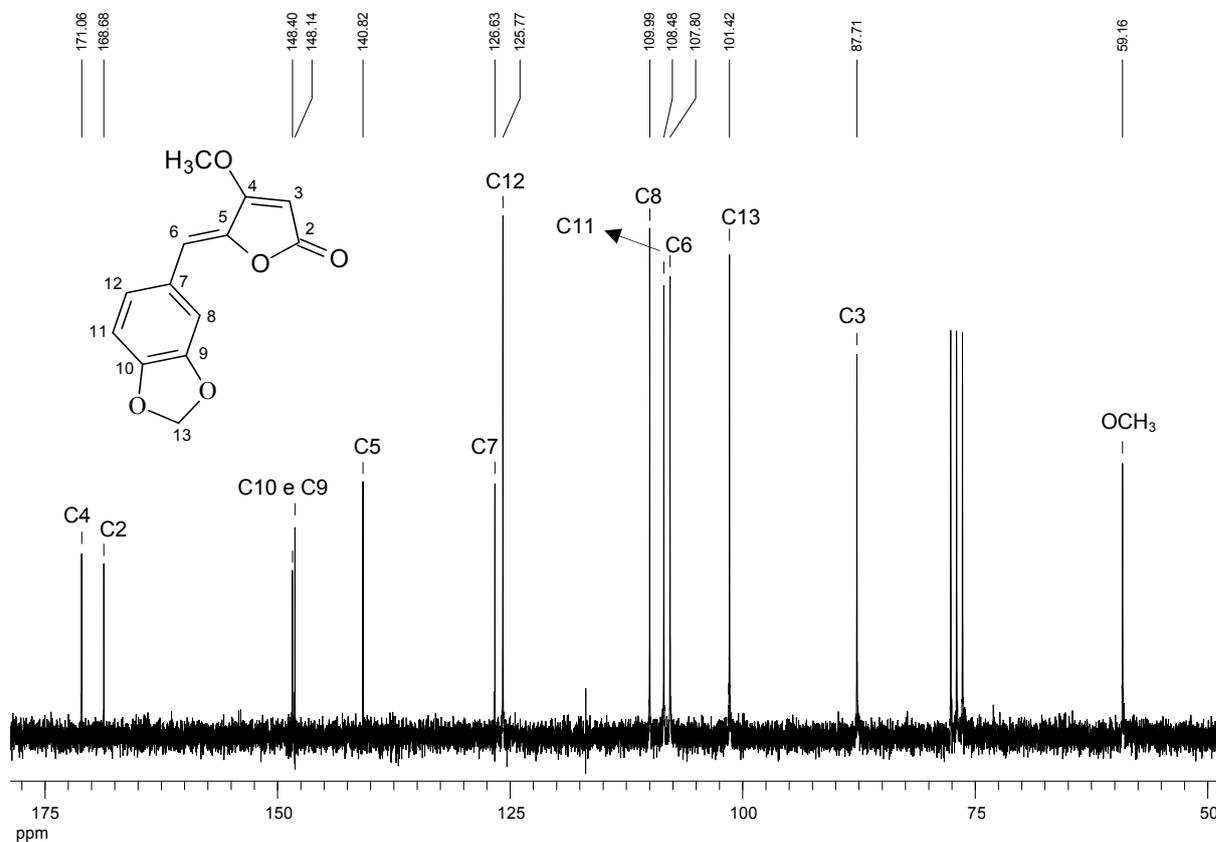
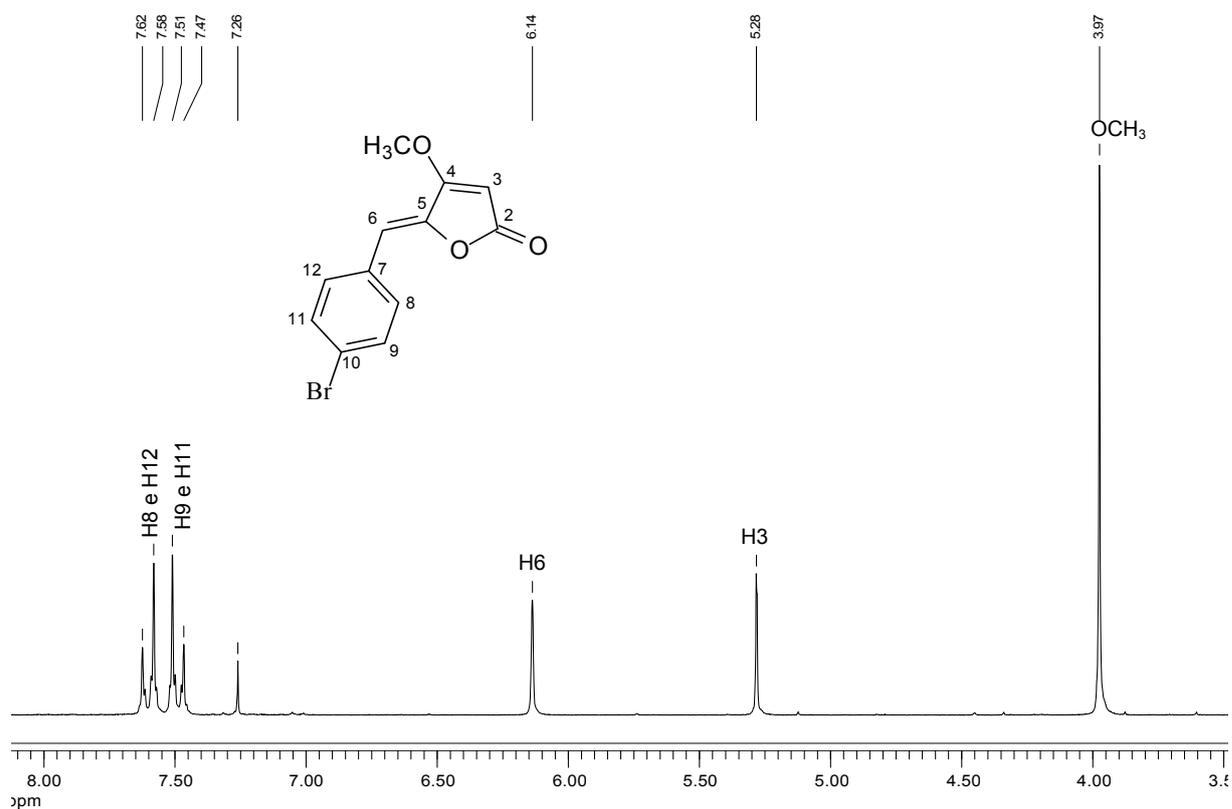
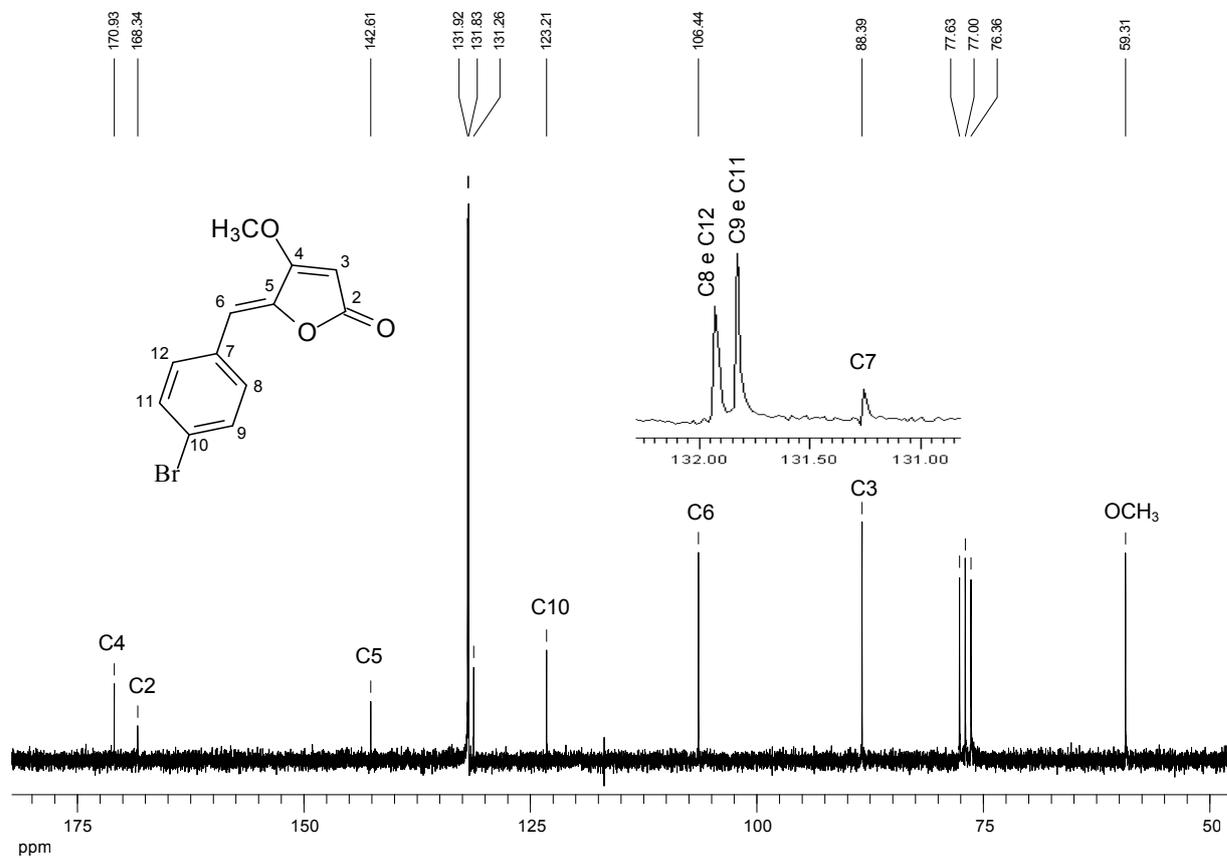


Figura 105. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 11.

Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 12.Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 12.

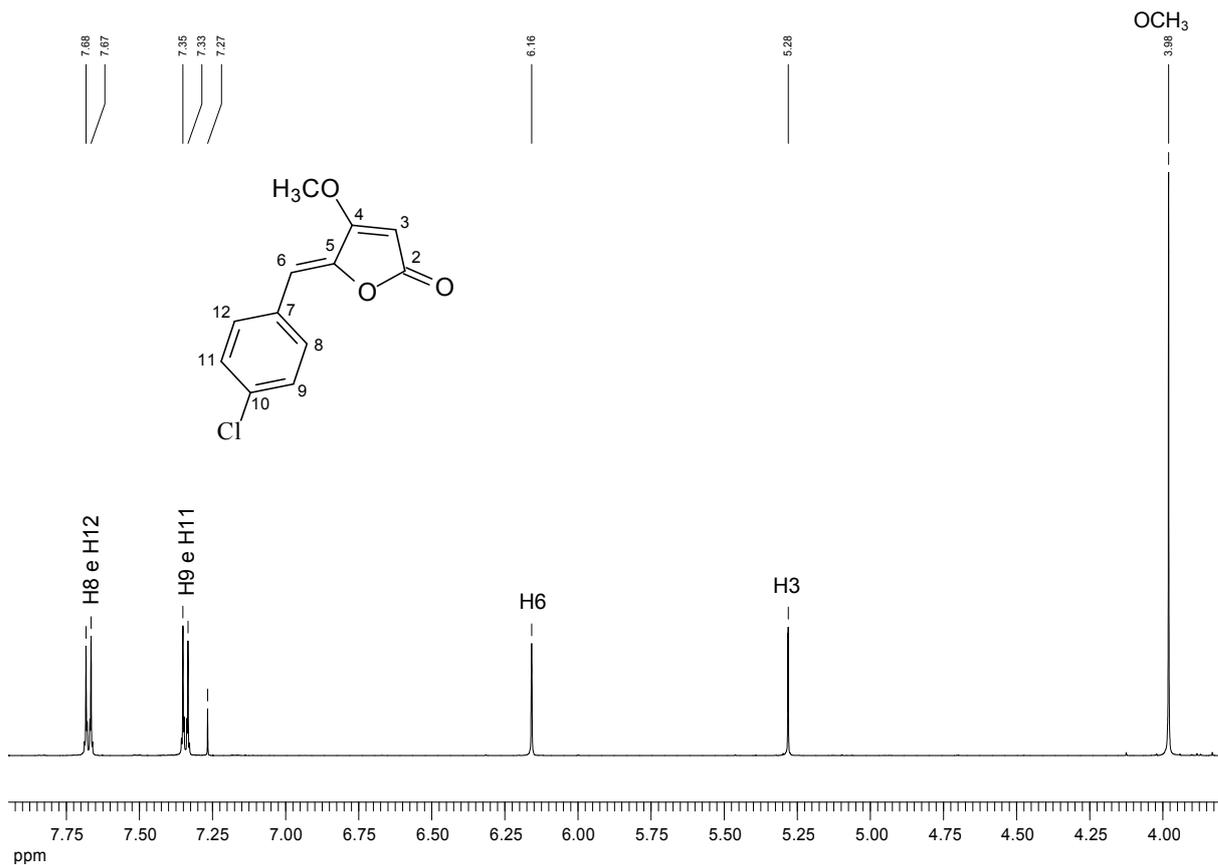


Figura 108. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 13.

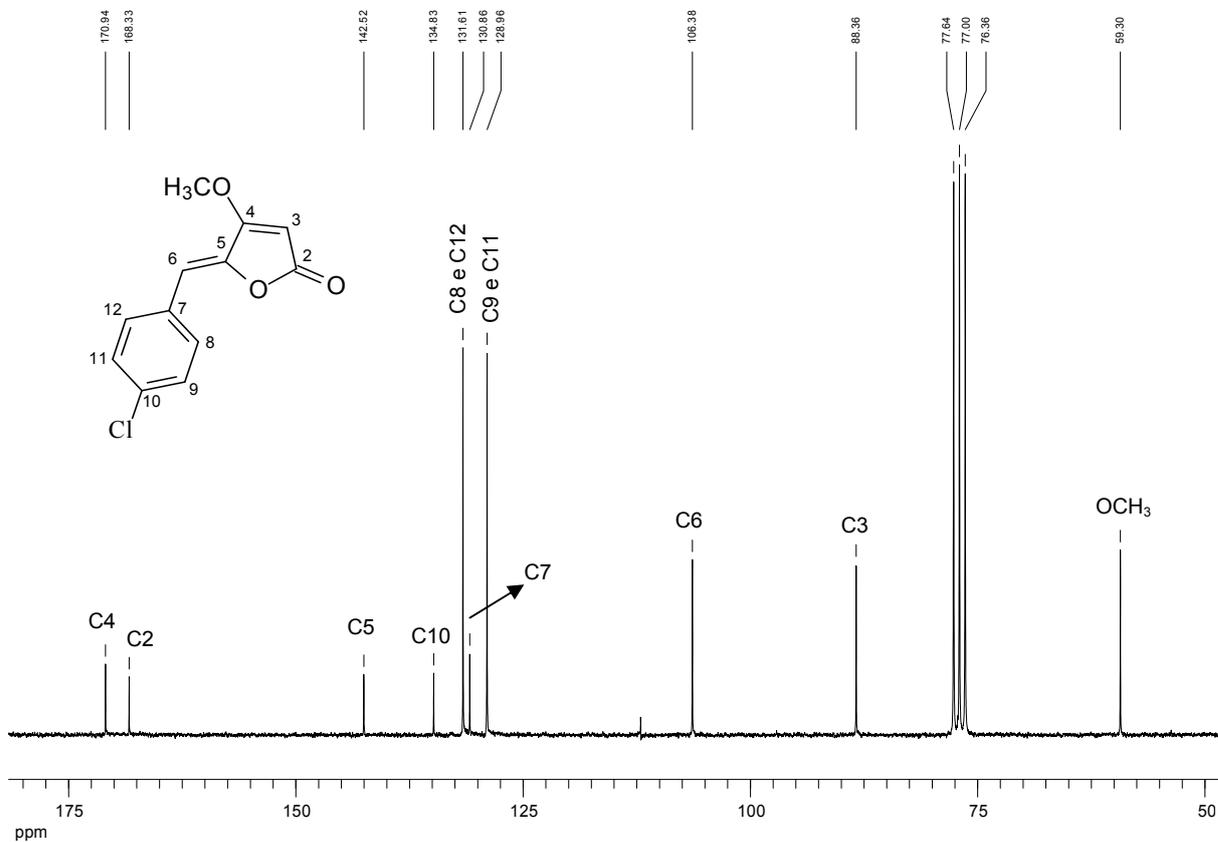


Figura 109. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 13.

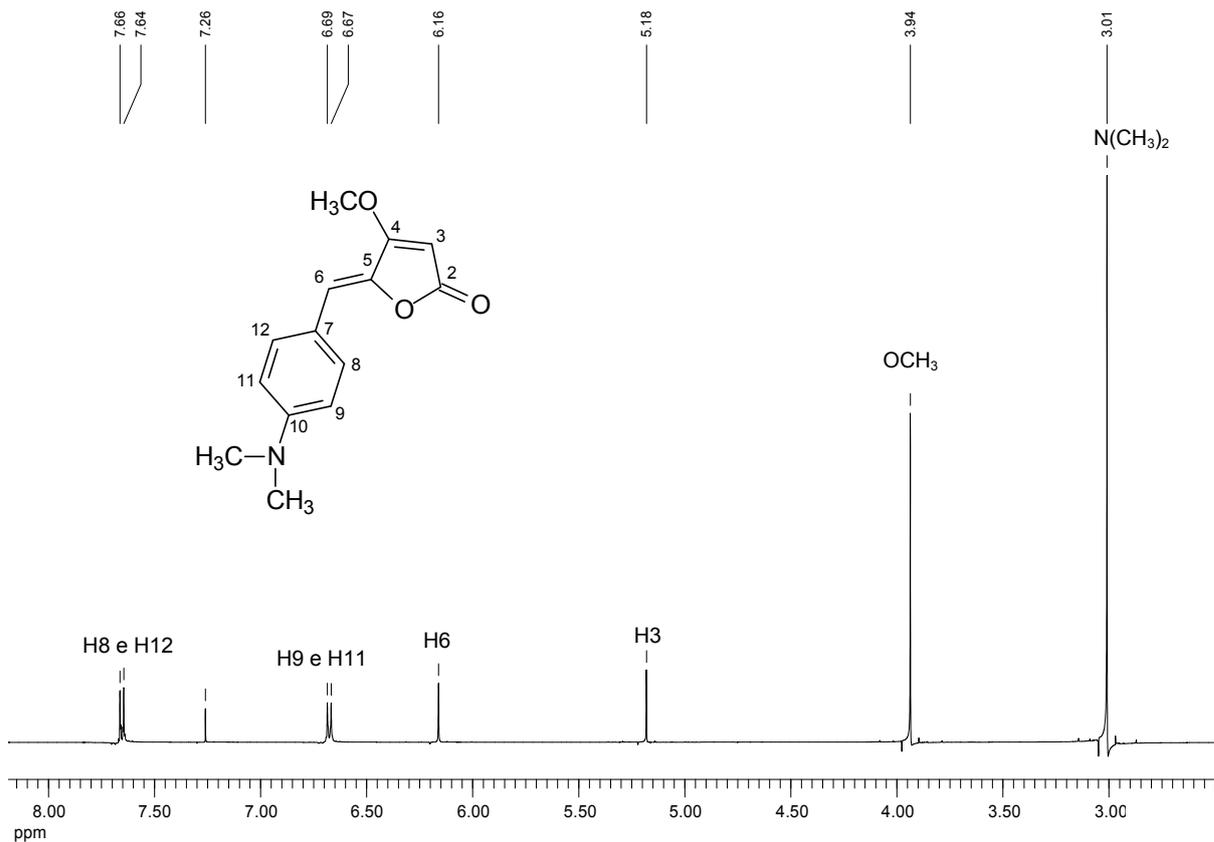


Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 14.

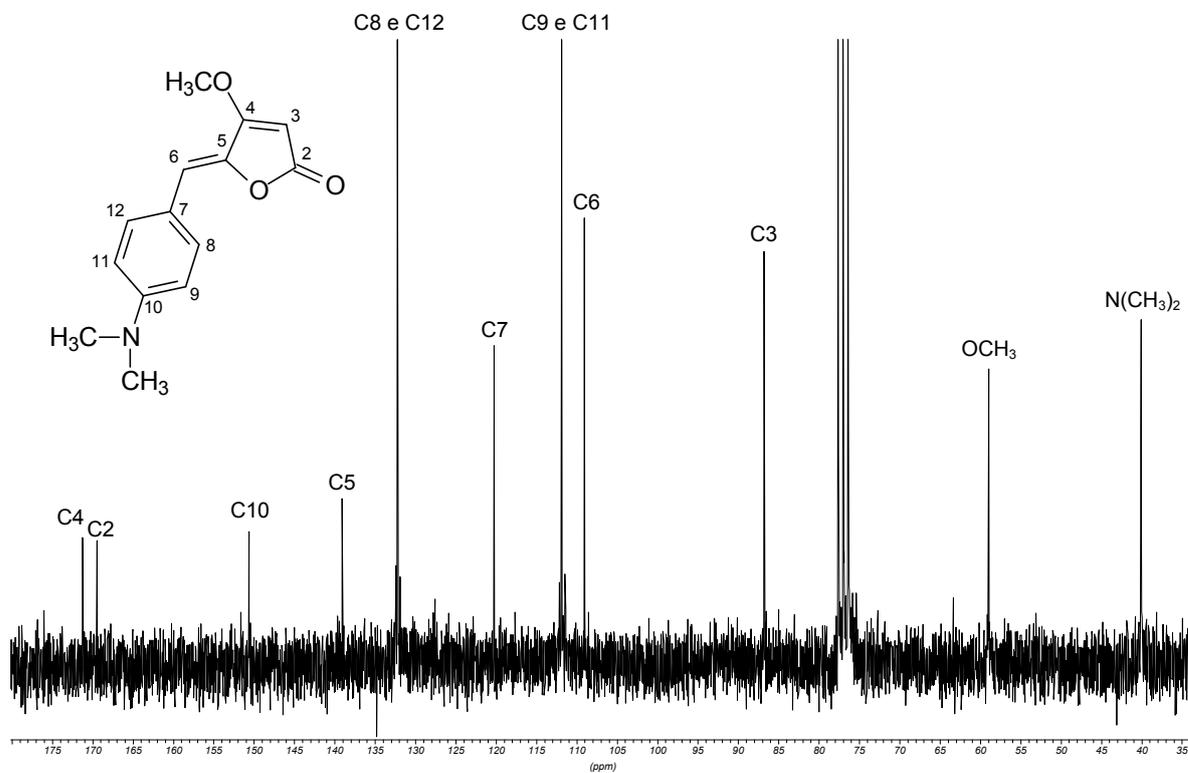
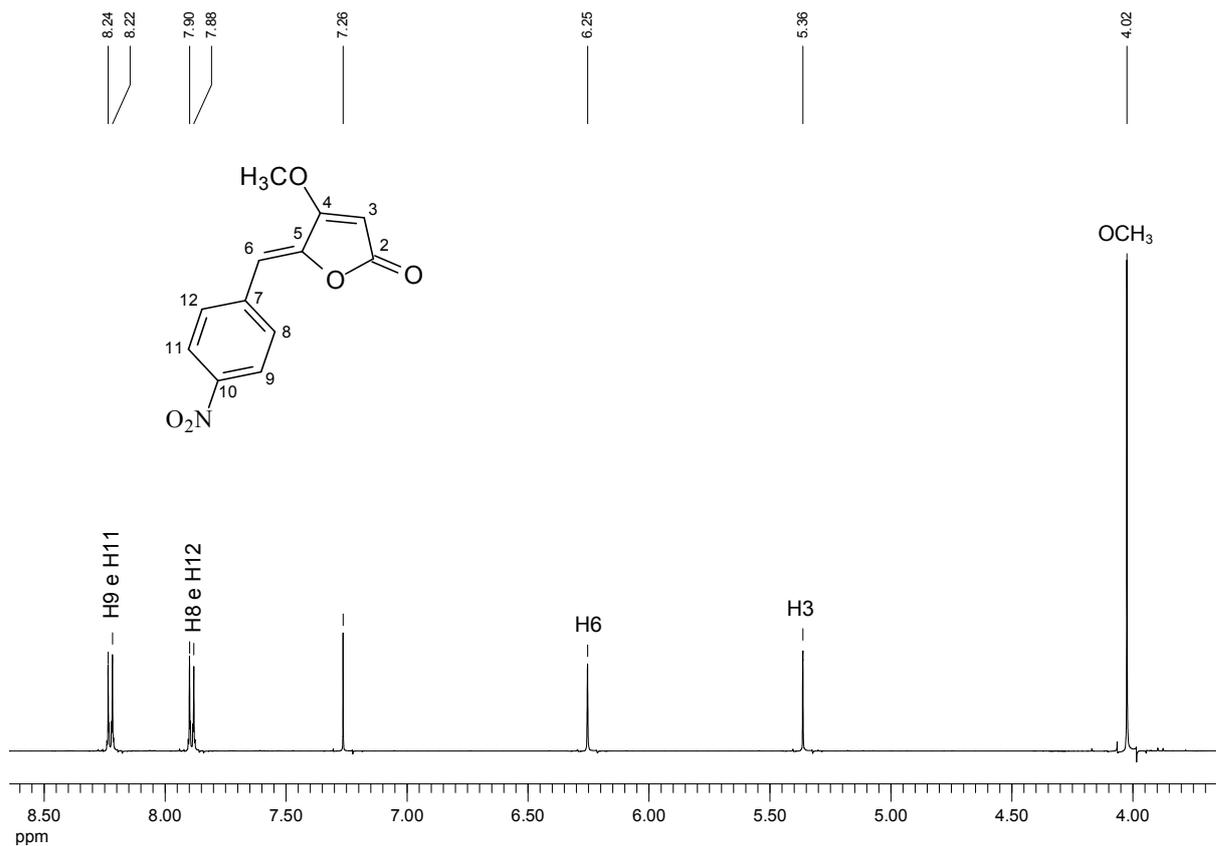
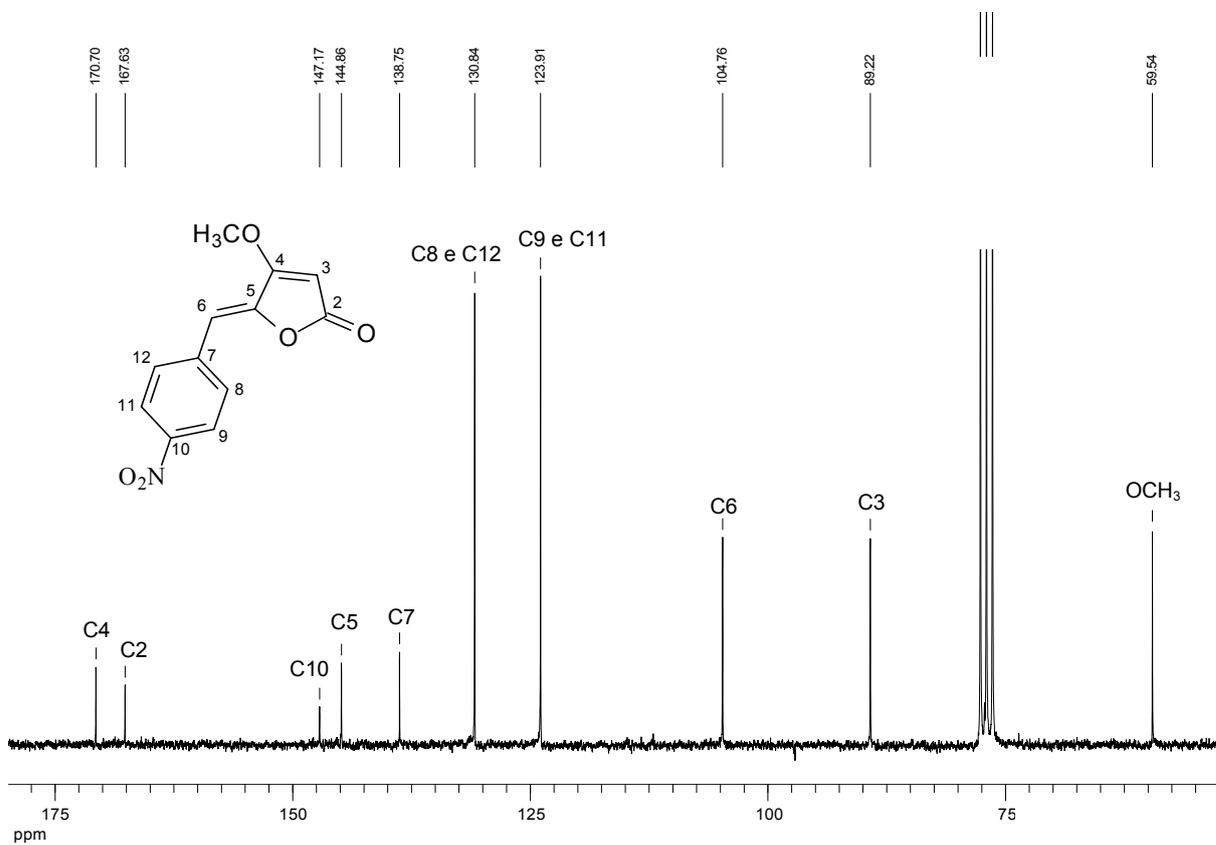


Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 14.

Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 15.Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 15.

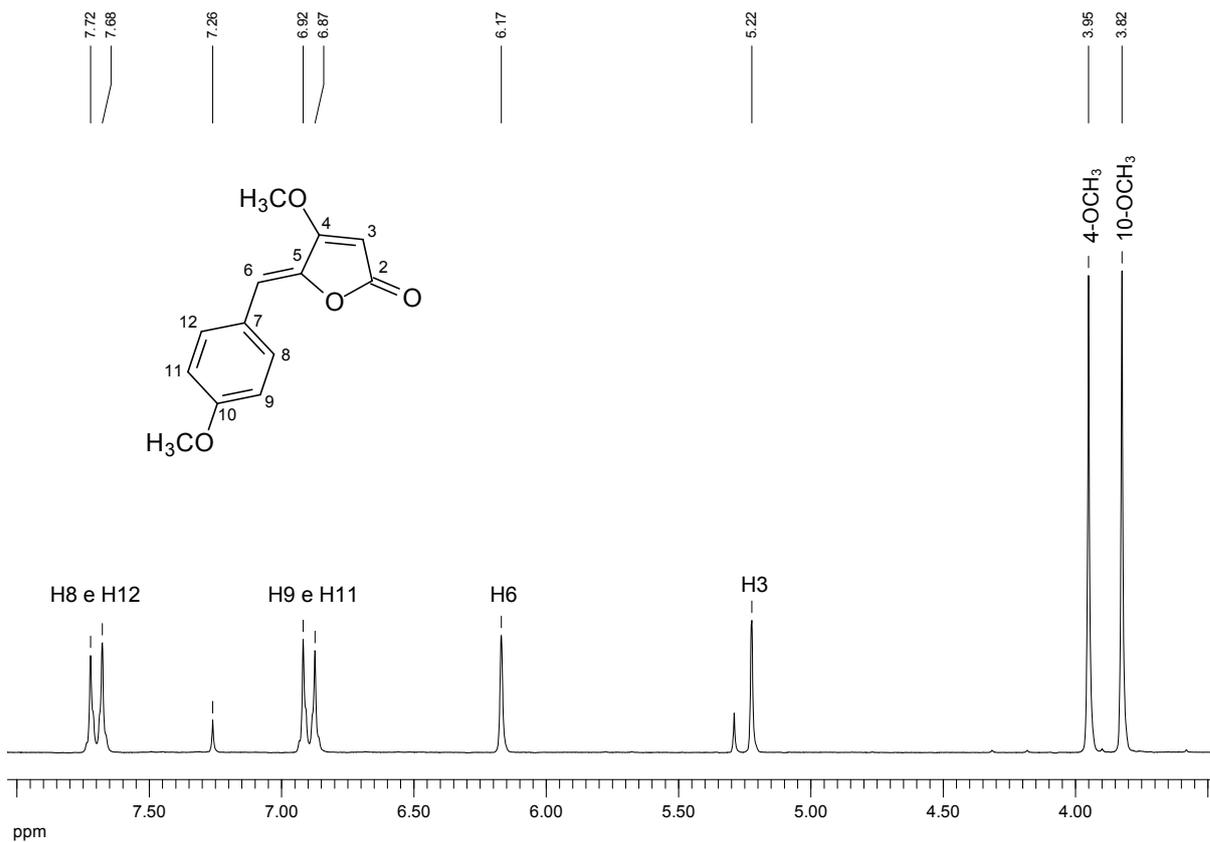


Figura 114. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 16.

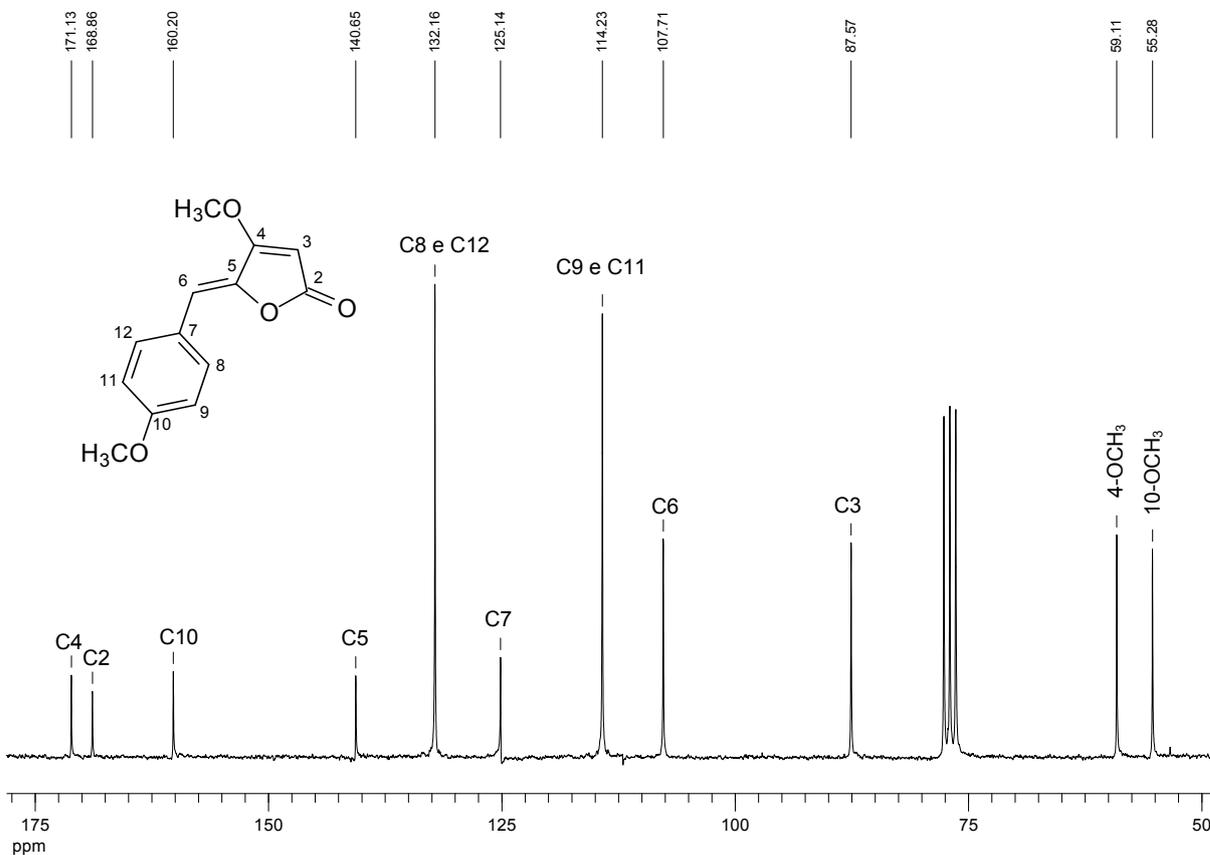


Figura 115. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 16.

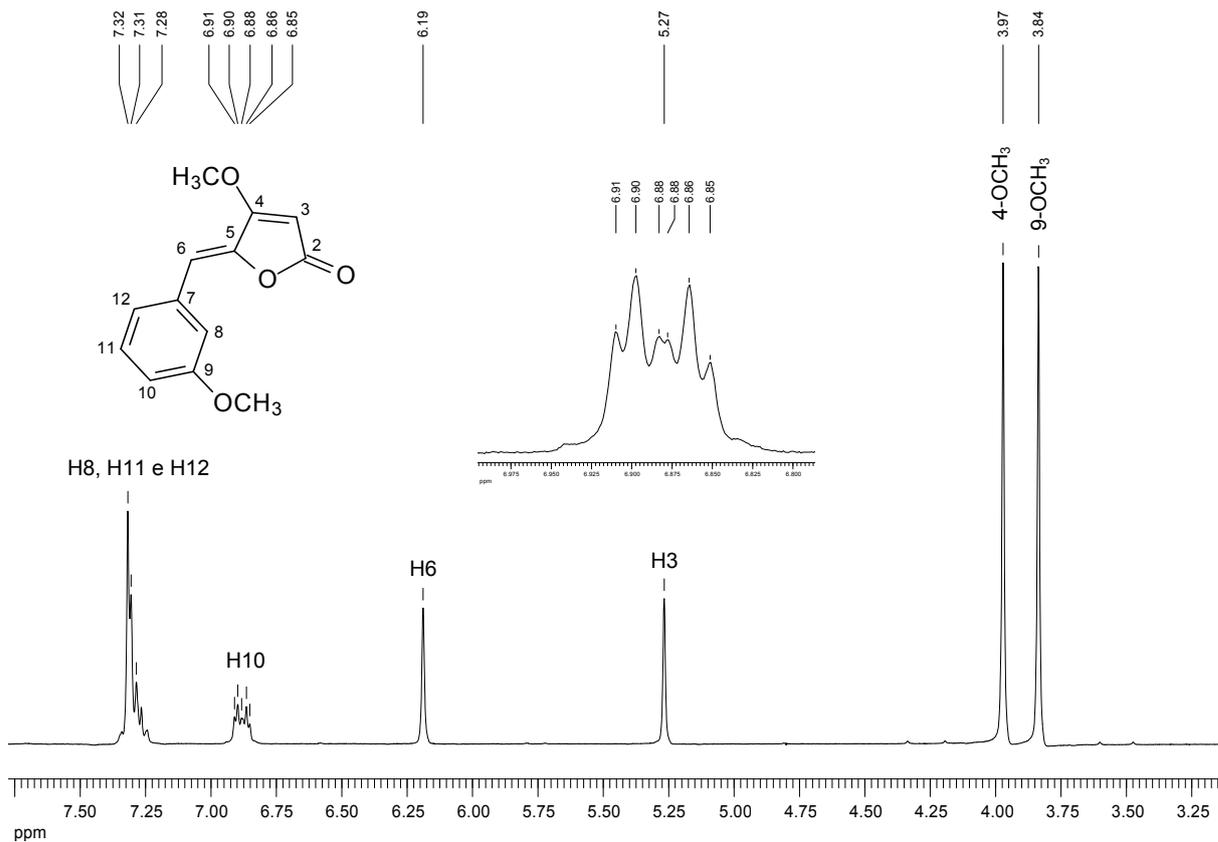


Figura 116. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 17.

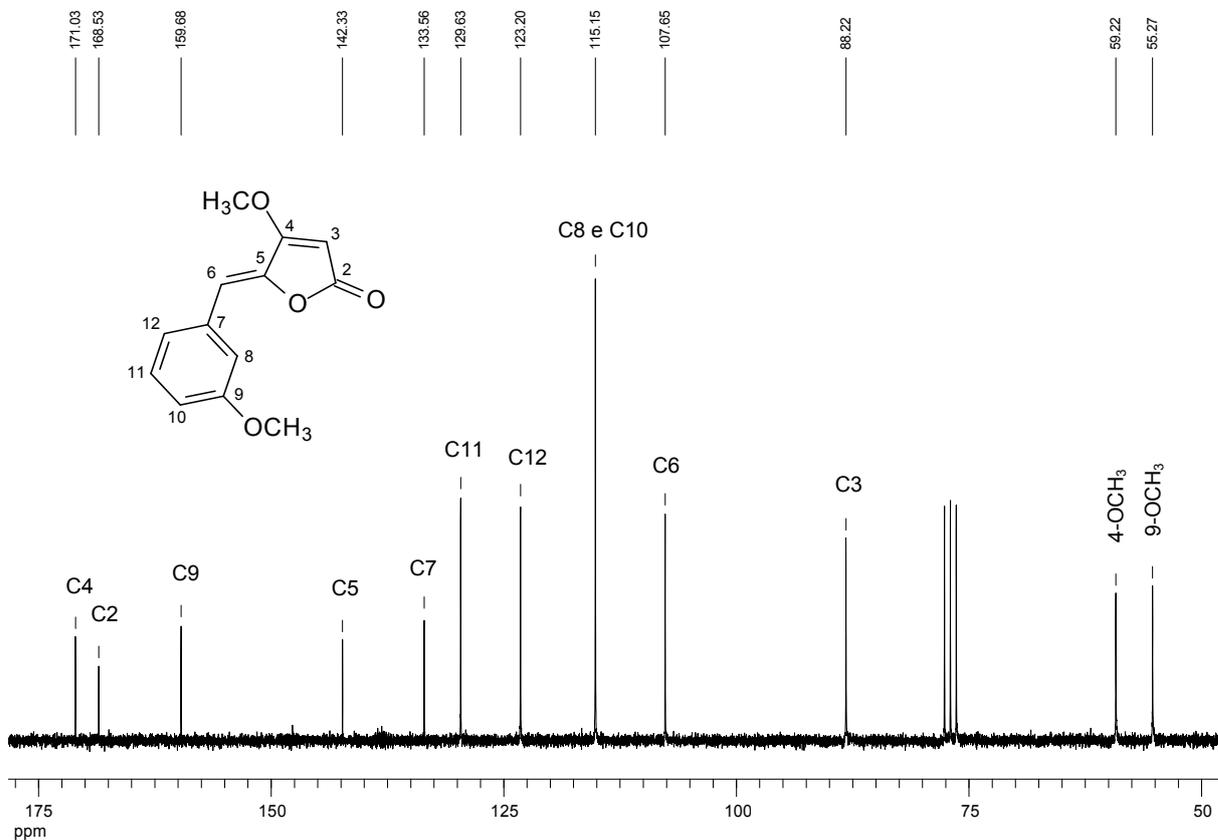
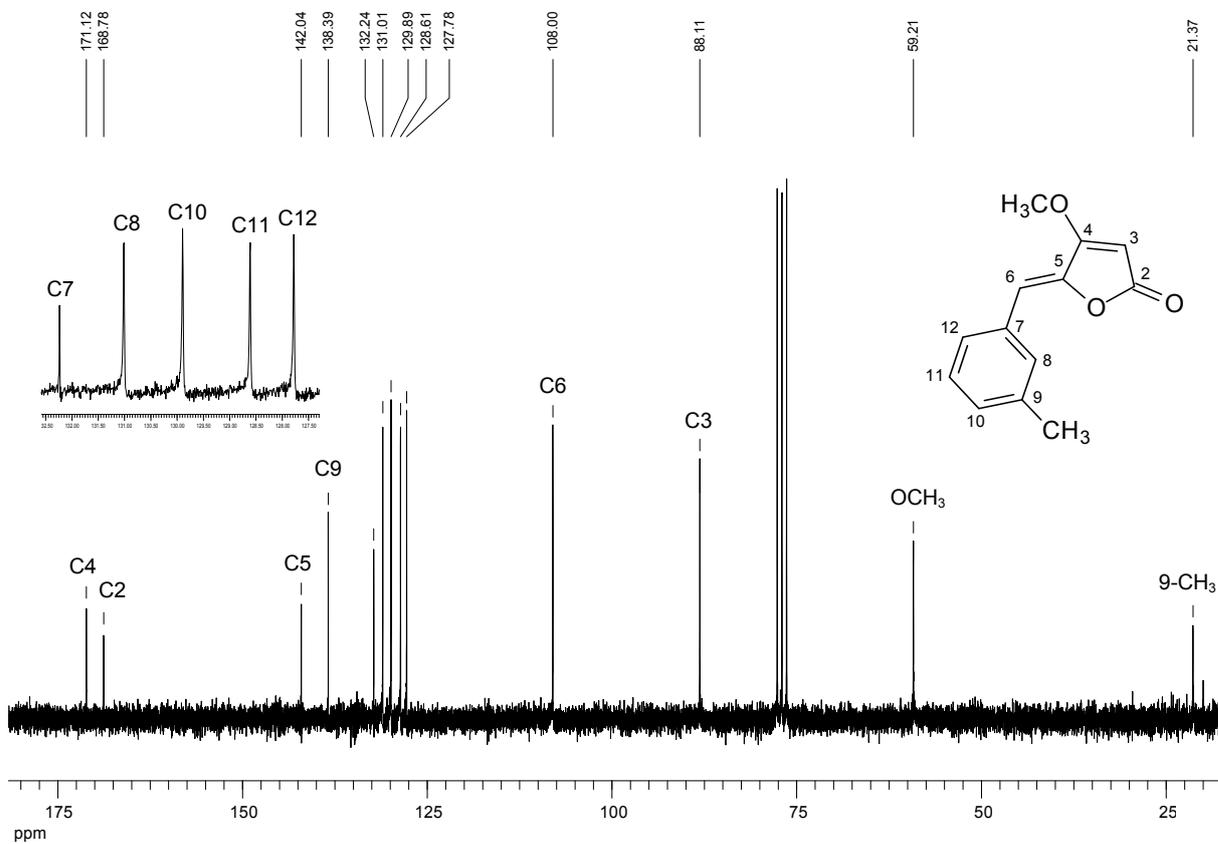
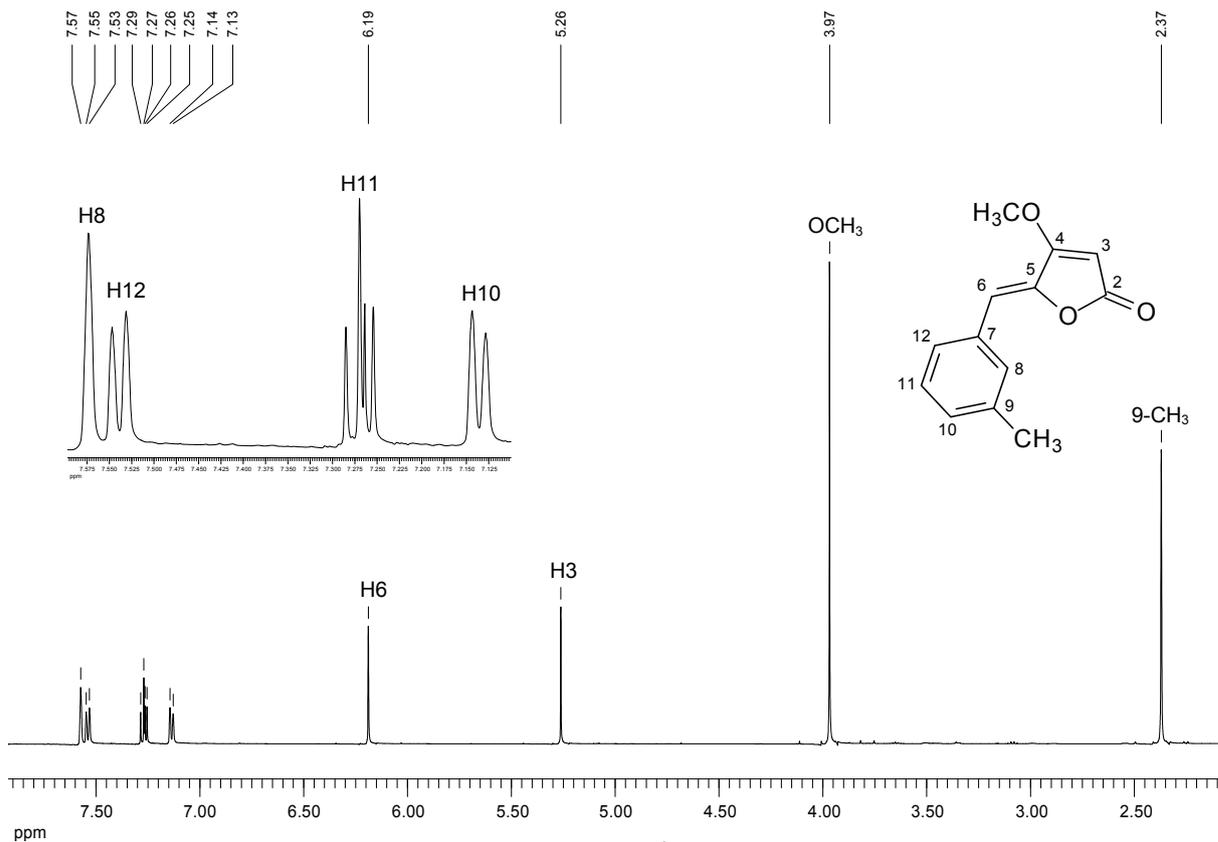


Figura 117. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 17.



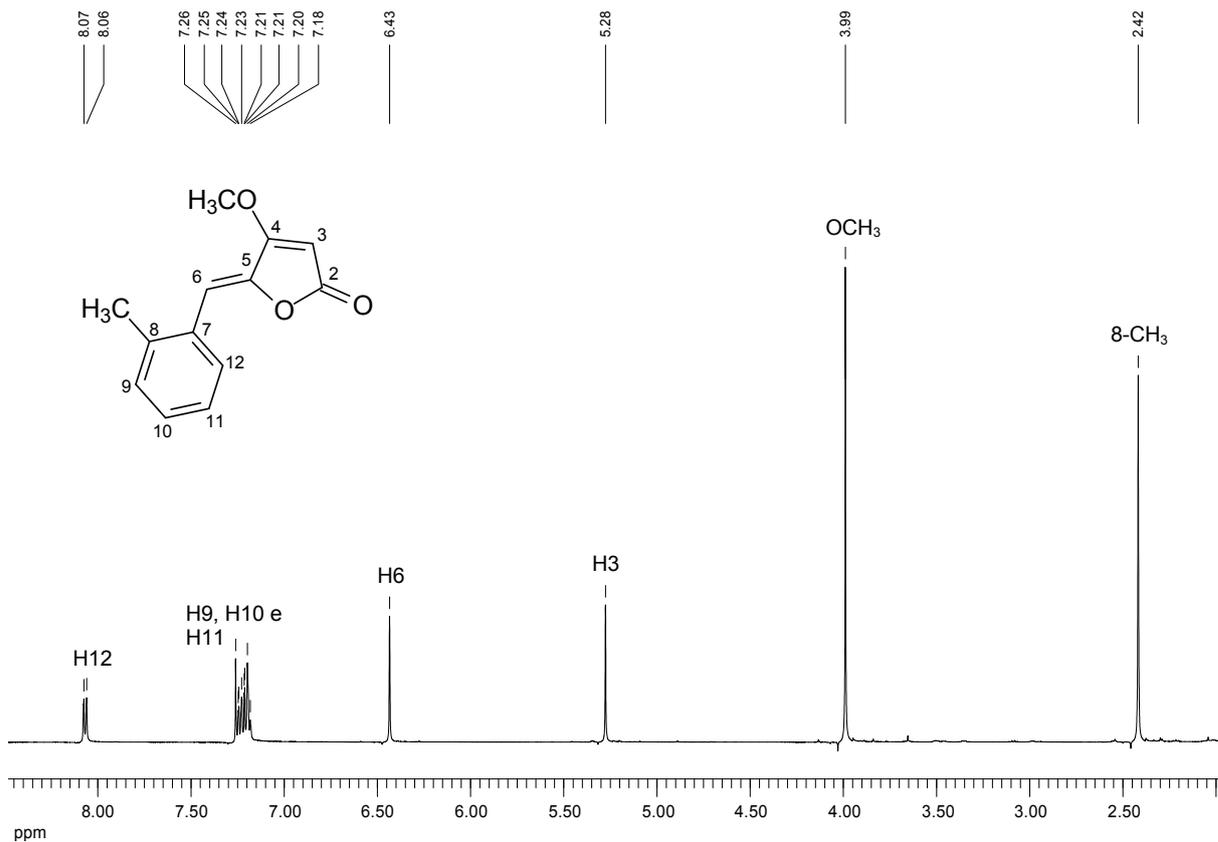


Figura 120. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 19.

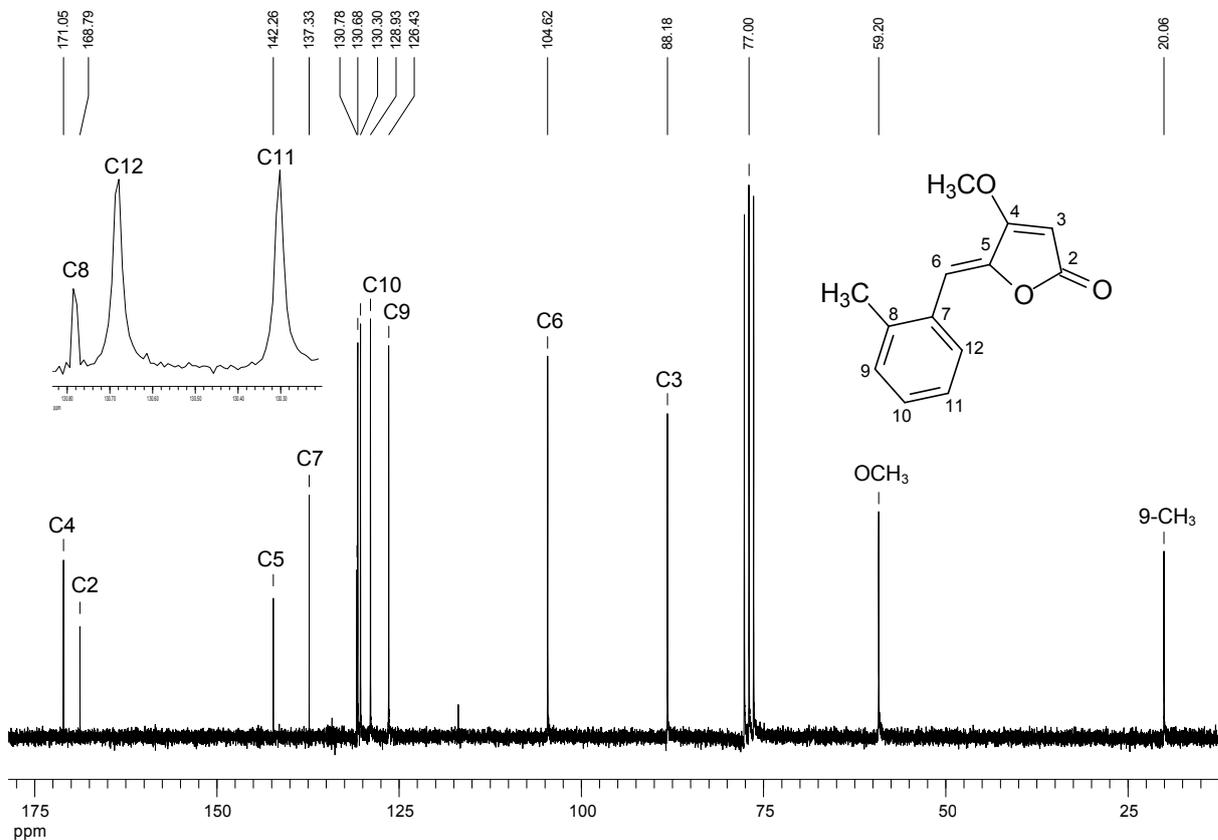


Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 19.

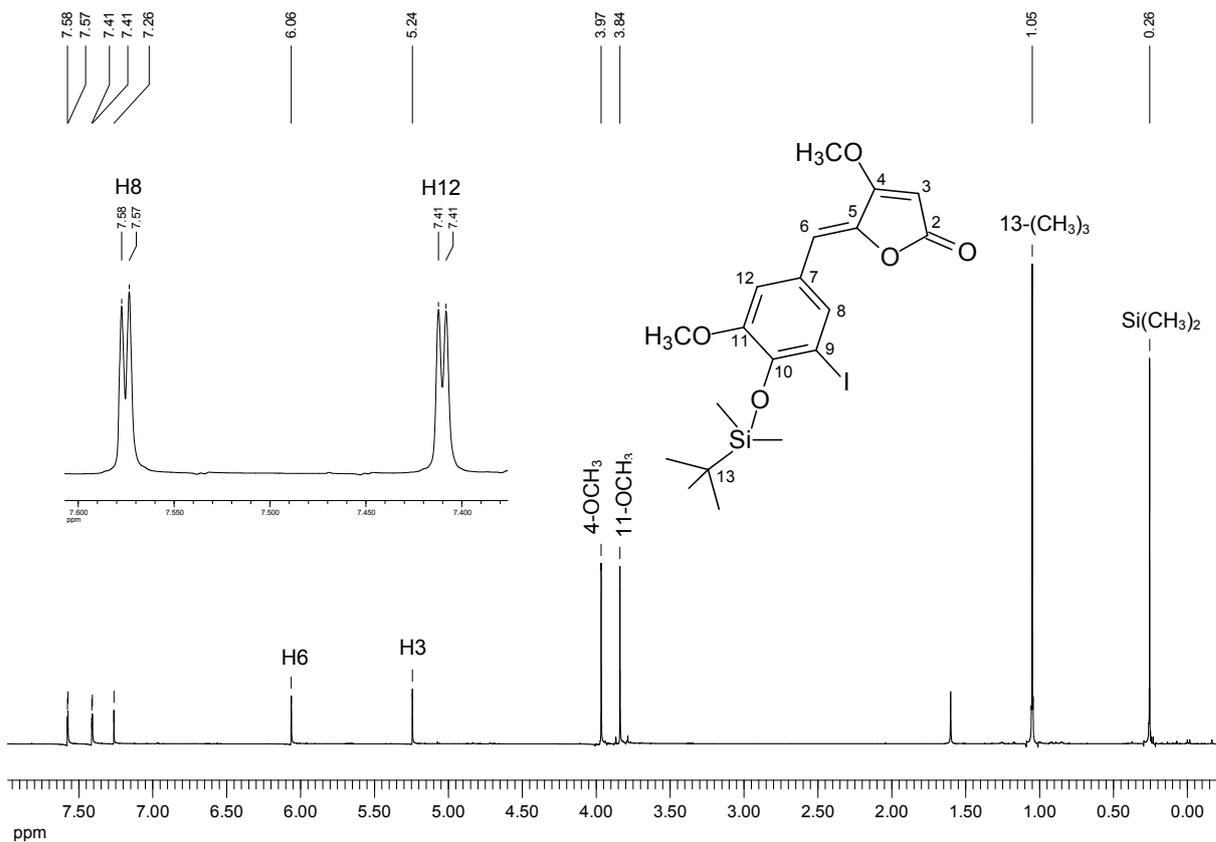


Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 20.

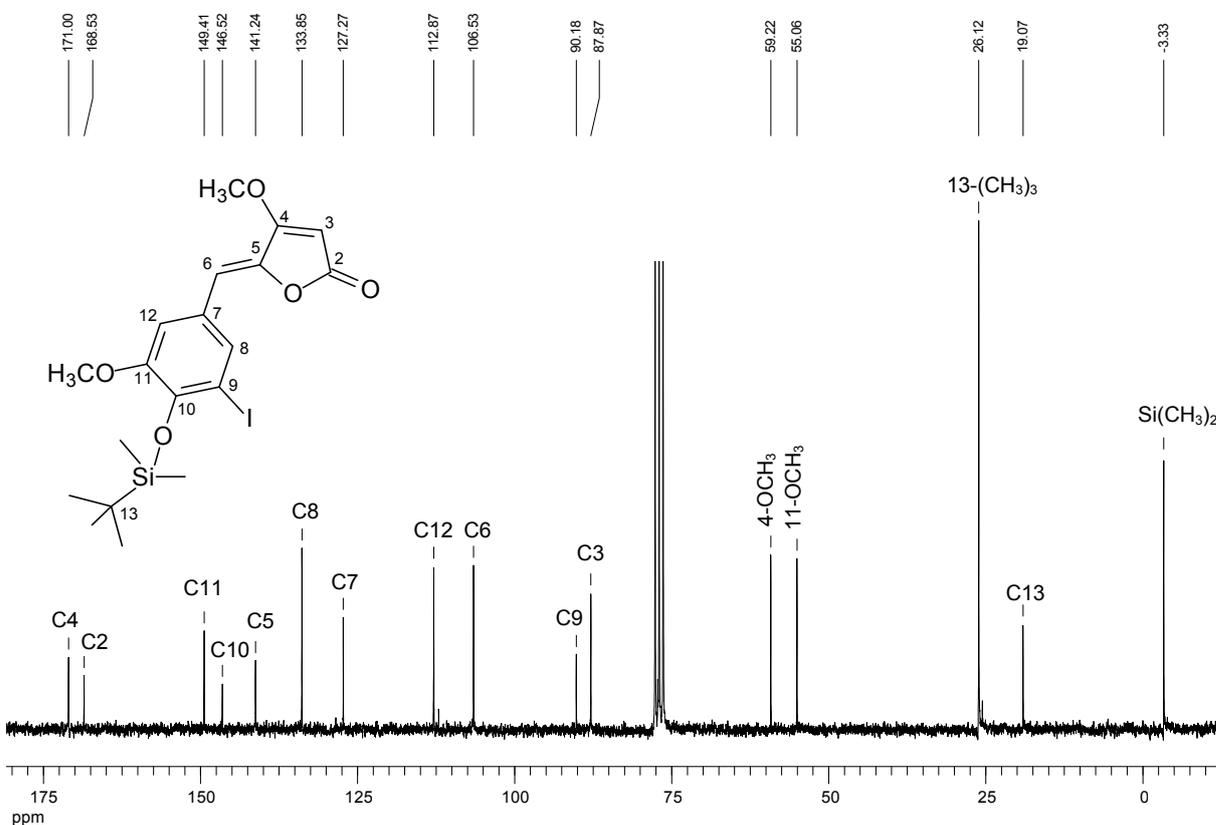


Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 20.

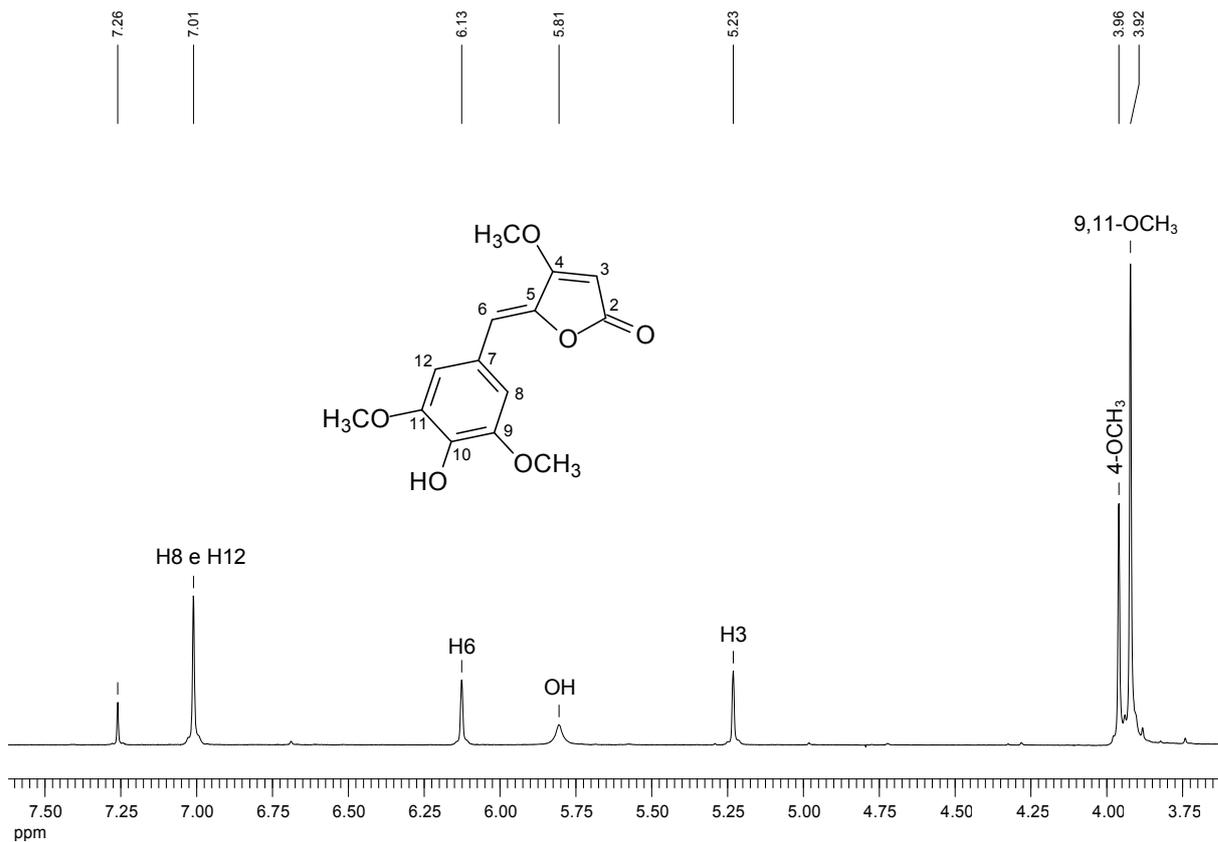


Figura 124. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 23.

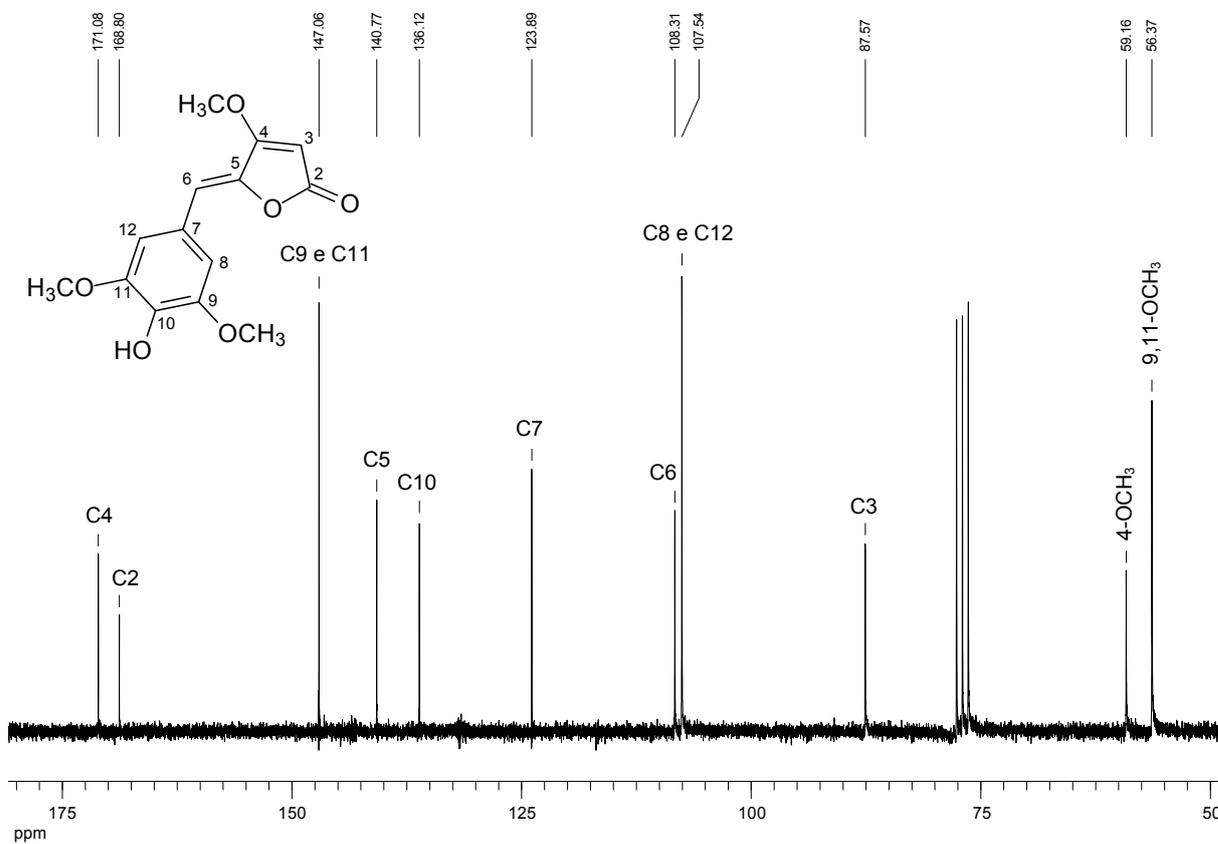


Figura 125. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de 23.

Informações obtidas através de experimentos de 2-D NOESY e comparação de dados com literatura permitiram a confirmação correta da geometria da ligação dupla exocíclica proposta para os γ -arilidenobutenolídeos. Para os compostos **8**, **11**, **12**, **16**, **17** e **23** a configuração *Z* foi determinada por comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura (Pelter e Ayoub, 1981). Para os compostos **13**, **14**, **15**, **18** e **20** a configuração *Z* foi confirmada pela observação do efeito NOE entre o 4-OMe e o H-6 (Figura 126). Apesar dos compostos **10**, **19** e **22** não terem apresentado efeito NOE entre o 4-OMe e o H-6, a configuração *Z* pode ser confirmada pela comparação dos sinais de RMN de ^{13}C entre os γ -arilidenobutenolídeos, além do que não aparece correlação NOE entre os hidrogênios do anel aromático, que é mais volumoso que o H-6, e o 4-OMe caso a configuração fosse *E*. Teixeira *et al*, (2007a) sintetizou vários compostos similares, utilizando-se do mesmo procedimento sintético, e verificou que o único produto obtido com a ligação dupla exocíclica com configuração *E* (conformação A) presente, foi quando ambas posições *orto* do aldeído de partida estavam substituídas por grupos metoxi. Na configuração *E* haveria um alívio da desestabilização estérica causada pela interação entre O-1 no anel lactônico e os grupos metoxi (Figura 127). Além disso, na molécula em questão, a posição 4 está ocupada pelo hidrogênio, que é menos volumoso que o grupo metoxílico (4-OMe), confirmando a formação preferencial do estereoisômero com configuração *Z*.

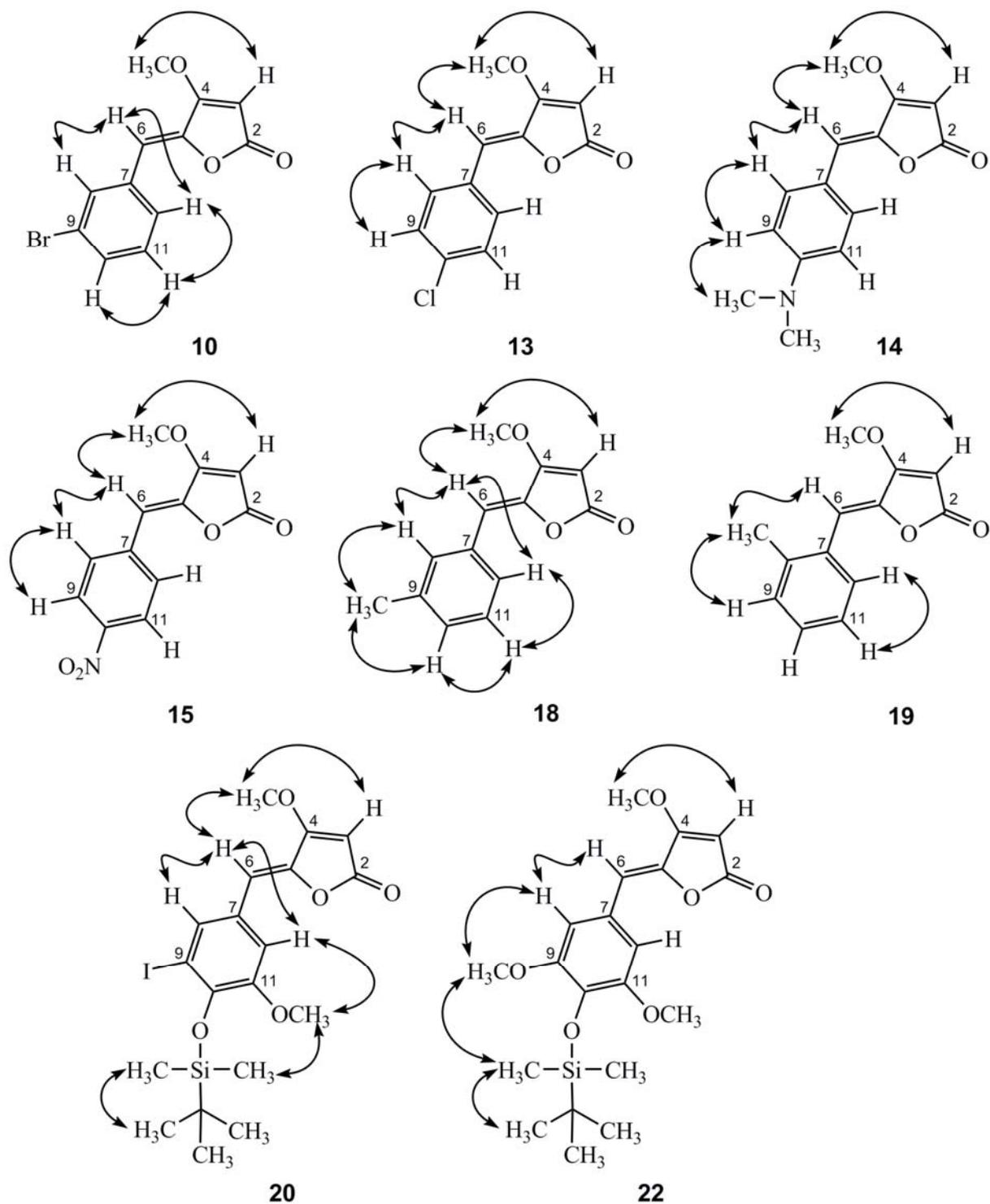


Figura 126. Correlações espaciais sugeridas para 10, 13, 14, 15, 18, 19, 20 e 22 baseadas nos mapas de contornos NOESY.

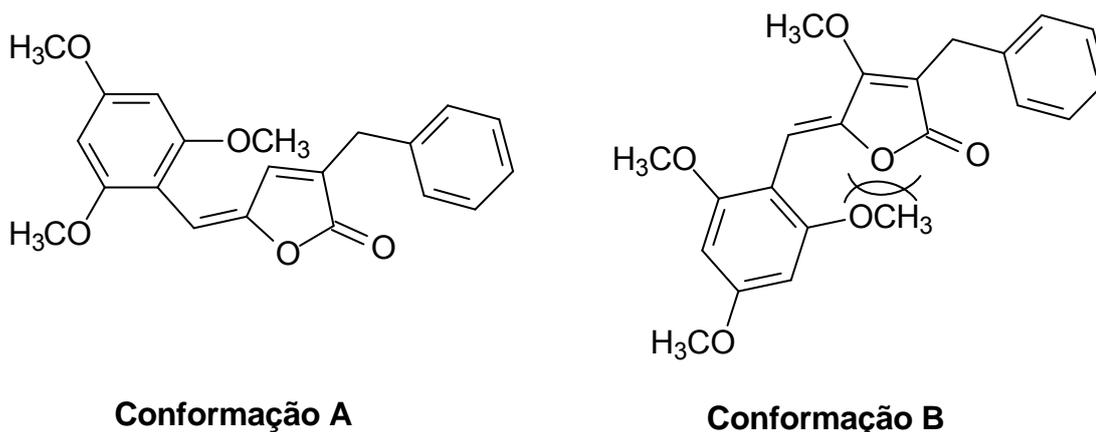


Figura 127. Possíveis conformações do (5E)-3-benzil-5-(2,4,6-trimetoxibenzilideno)-furan-2(5H)-ona.

Um aspecto interessante foi encontrado no mapa de contorno NOESY do composto **19**, visto que um efeito NOE entre H-12 e H6 não foi observado. Este resultado pode ser interpretado pela conformação preferencial assumida pelo composto. Para aliviar o efeito estérico de repulsão entre os pares de elétrons de O-1 e grupo 8-Me (conformação A), o composto **19** preferencialmente assume a conformação B (Figura 128). Resultado semelhante foi observado por Teixeira *et al*, (2007). O menor valor do deslocamento químico observado no C-6 (δ 104,4) é justificado devido ao efeito de blindagem γ provocado pelo grupo 8-Me no C-6.

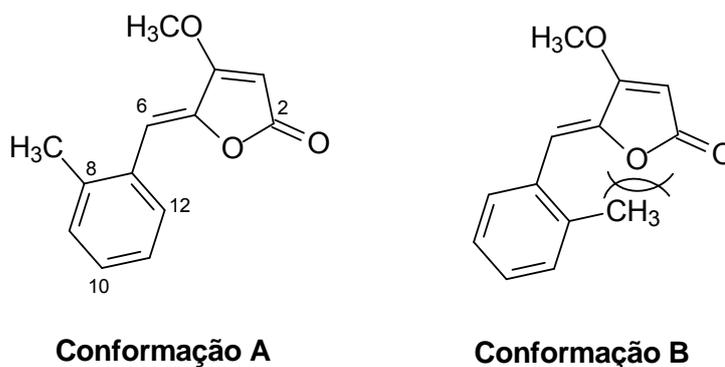


Figura 128. Conformações do composto 22.

Os butenólídeos **7** e **9** foram intermediários isolados durante a reação para a obtenção dos análogos ao piperolídeo. A estereoquímica *anti* ou *sin* dos compostos **7** e **9** não foram determinadas.

O primeiro indício de formação dos produtos de adição deu-se através da análise dos seus espectros no infravermelho (Figura 129 e Figura 130), devido a presença de bandas características de estiramento C-H de anéis aromáticos na região de 3000-3100.

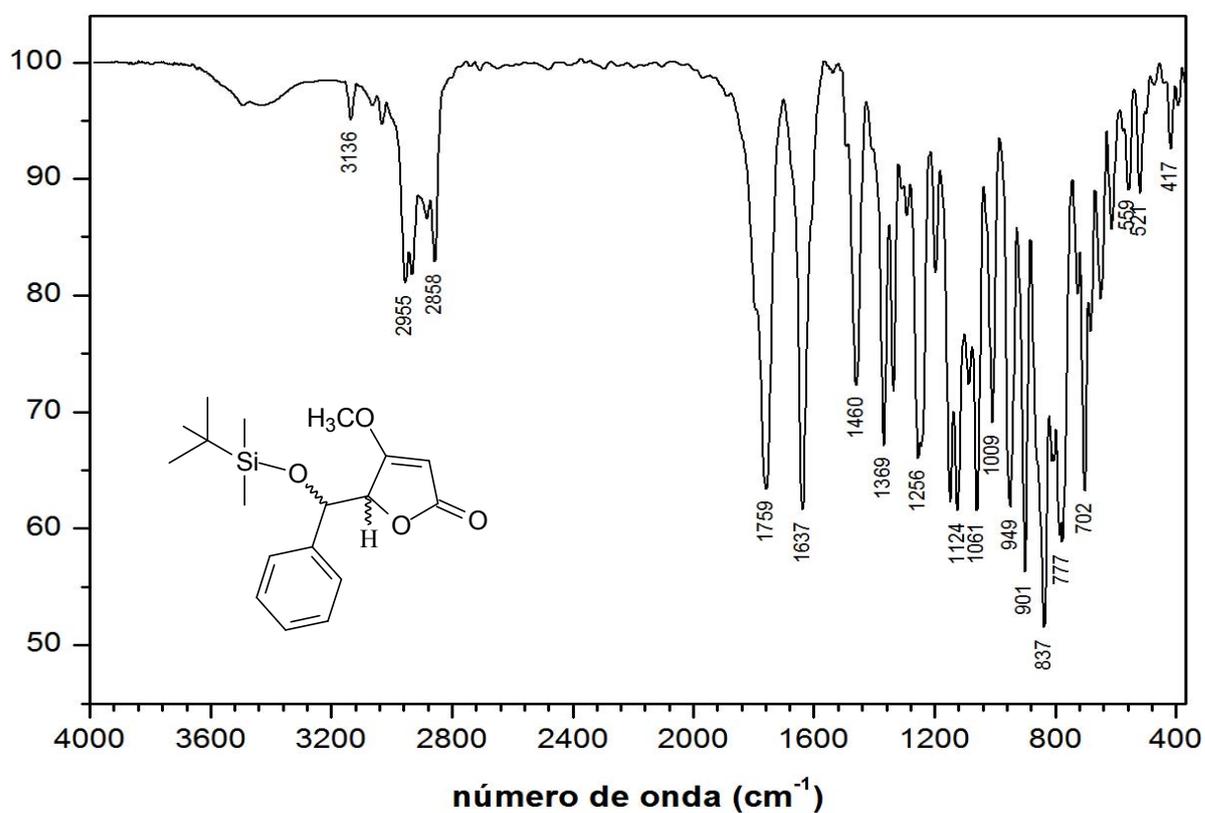


Figura 129. Espectro no IV (KBr) de **7**.

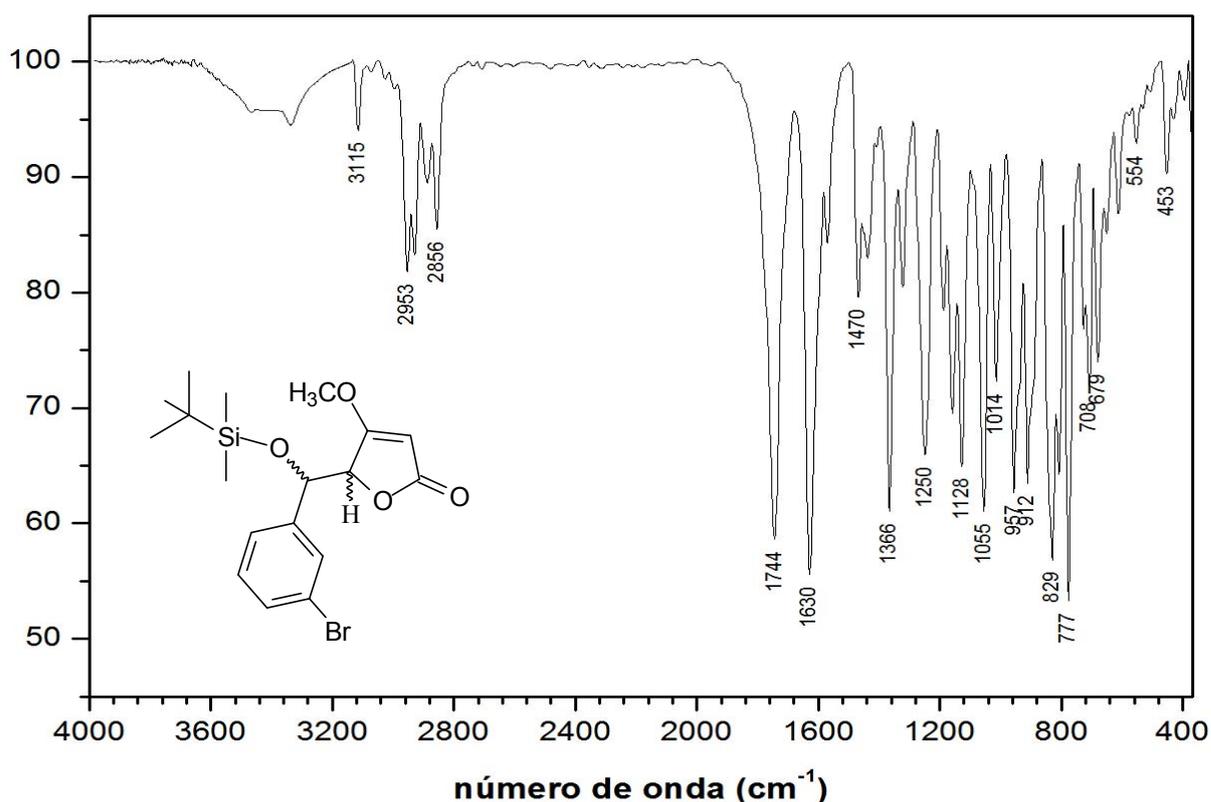


Figura 130. Espectro no IV (KBr) de 9.

Nos espectros de RMN de ^1H (Figura 131 e Figura 133), a formação dos compostos podem ser confirmada pelos sinais de ressonância em δ -0,17; -0,01 e 0,86, referentes ao composto **9**, e pelos sinais em δ -0,21; -0,02 e 0,85, referentes ao composto **7**, atribuídos ao grupo *tert*-butildimetilsiloxila. Além destes, observou-se o duplete duplo em δ 4,73 (1H, $J_{5,6} = 2,0$ Hz e $J_{5,3} = 0,9$ Hz; H5) e o duplete δ 4,92 (1H, $J_{6,5} = 2,0$ Hz; H6), referentes ao composto **9**, e ainda o duplete duplo em δ 4,74 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2,0$ e $J_{5,3} = 0,9$ Hz; H5) e o duplete em δ 4,96 (1H, $J_{6,5} = 1,8$ Hz; H6) referentes ao composto **7**. No espectro de RMN de ^1H do composto **9** verificou-se que houve formação de um pouco do seu diastereoisômero, numa razão aproximada de 1,00:0,11, como pode ser visto nos sinais de ressonância que aparecem duplicados na região de δ 7,17-7,54. Já no espectro de RMN de ^1H do composto **7** verificou-se este estava contaminado com seu produto de eliminação, ou seja, o γ -

arilidenbutenolídeo, numa razão aproximada de 1,00:0,11; que pode ser confirmada pelos sinais em δ 3,98 (OMe), 5,28 (H3) e 6,23 (H6). As proporções foram determinadas de acordo com os valores das integrais dos sinais no espectro de RMN de ^1H .

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 132 e Figura 134), os sinais mais importantes são em δ -5,6 e -4,7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18,0 (C7), 25,5 ($13\text{-(CH}_3)_3$), 71,9 (C6) e 82,2 (C5), referentes ao composto **9**, além dos sinais em δ -5,7 e -4,8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18,0 (C13), 25,5 ($13\text{-(CH}_3)_3$), 72,5 (C6) e 82,6 (C5), referentes ao composto **7**. As atribuições feitas aos carbonos são confirmadas pelo espectro de DEPT 135 (Figura 135), sendo as atribuições de C5 e C6 confirmadas pela análise do mapa de contorno HETCOR (Figura 136) do composto **9**.

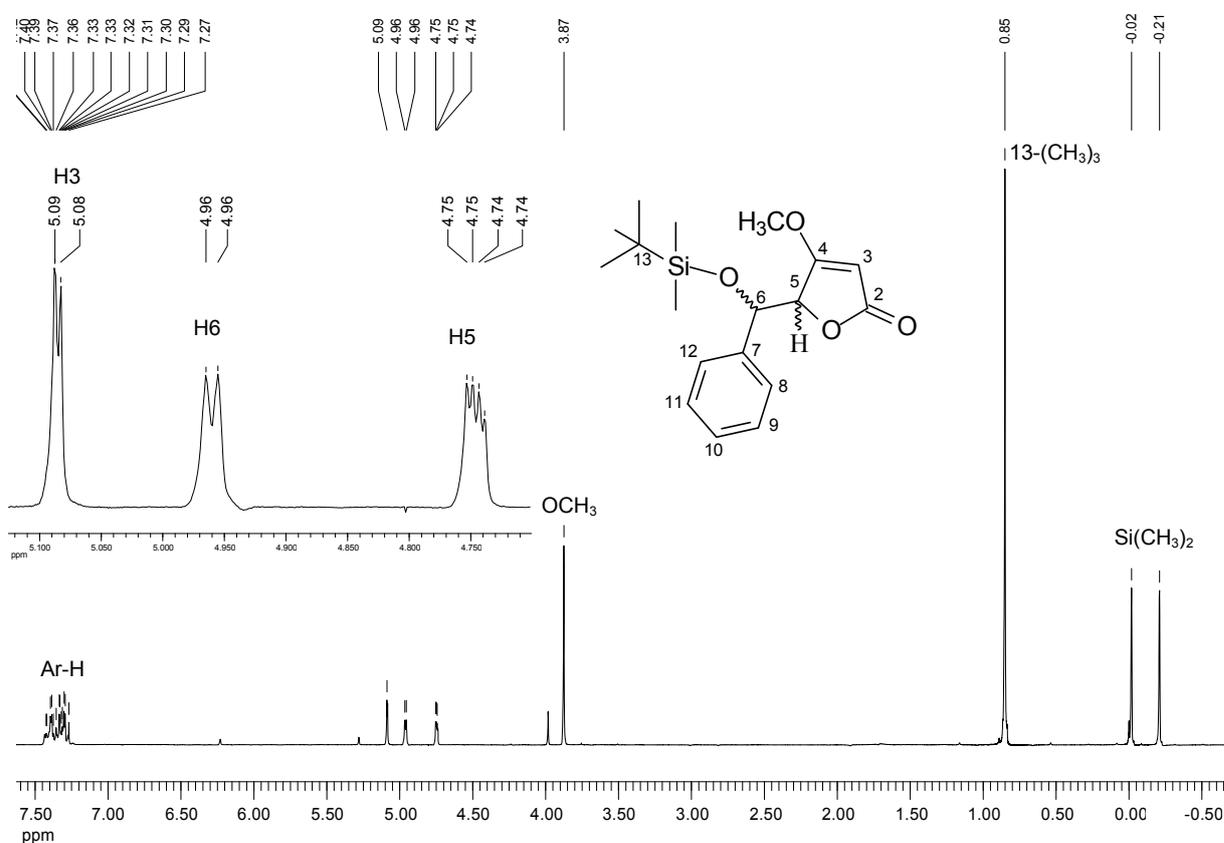


Figura 131. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **7**.

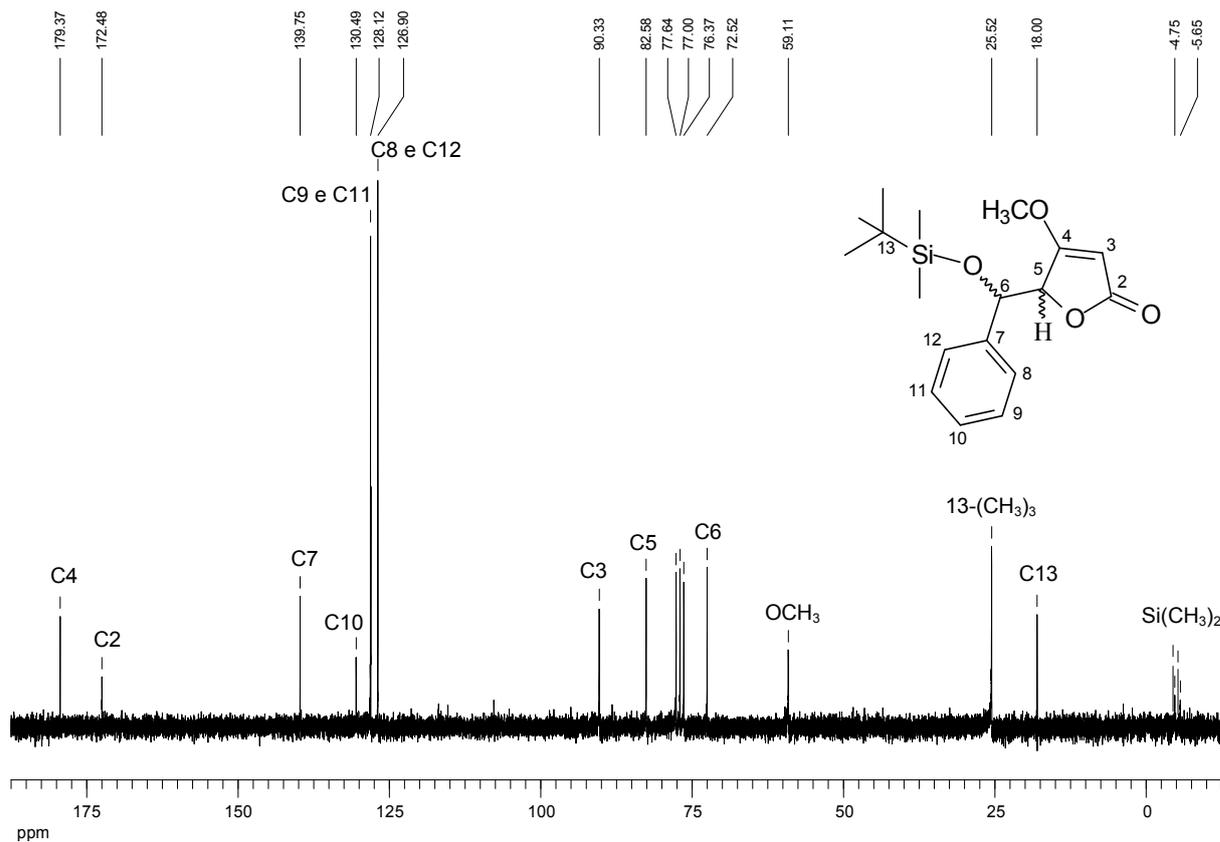


Figura 132. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 7.

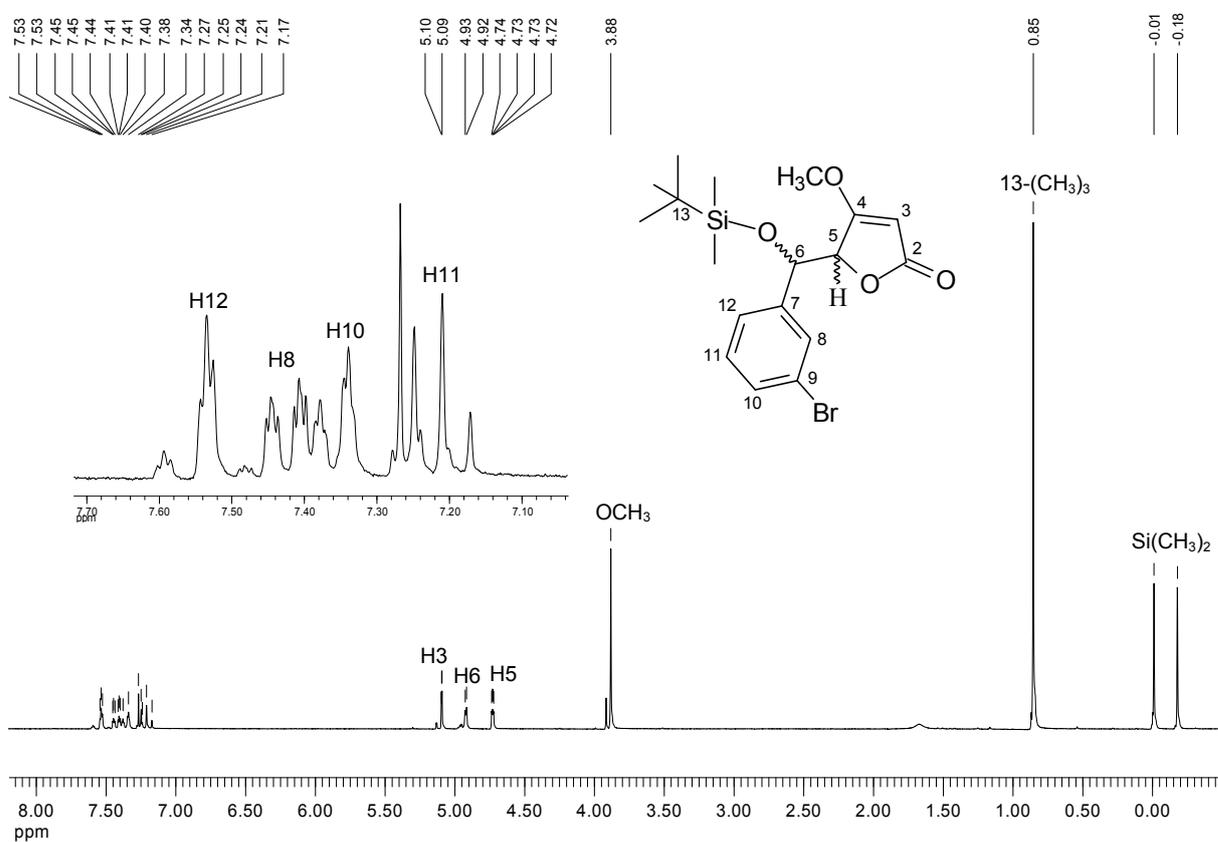


Figura 133. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 9.

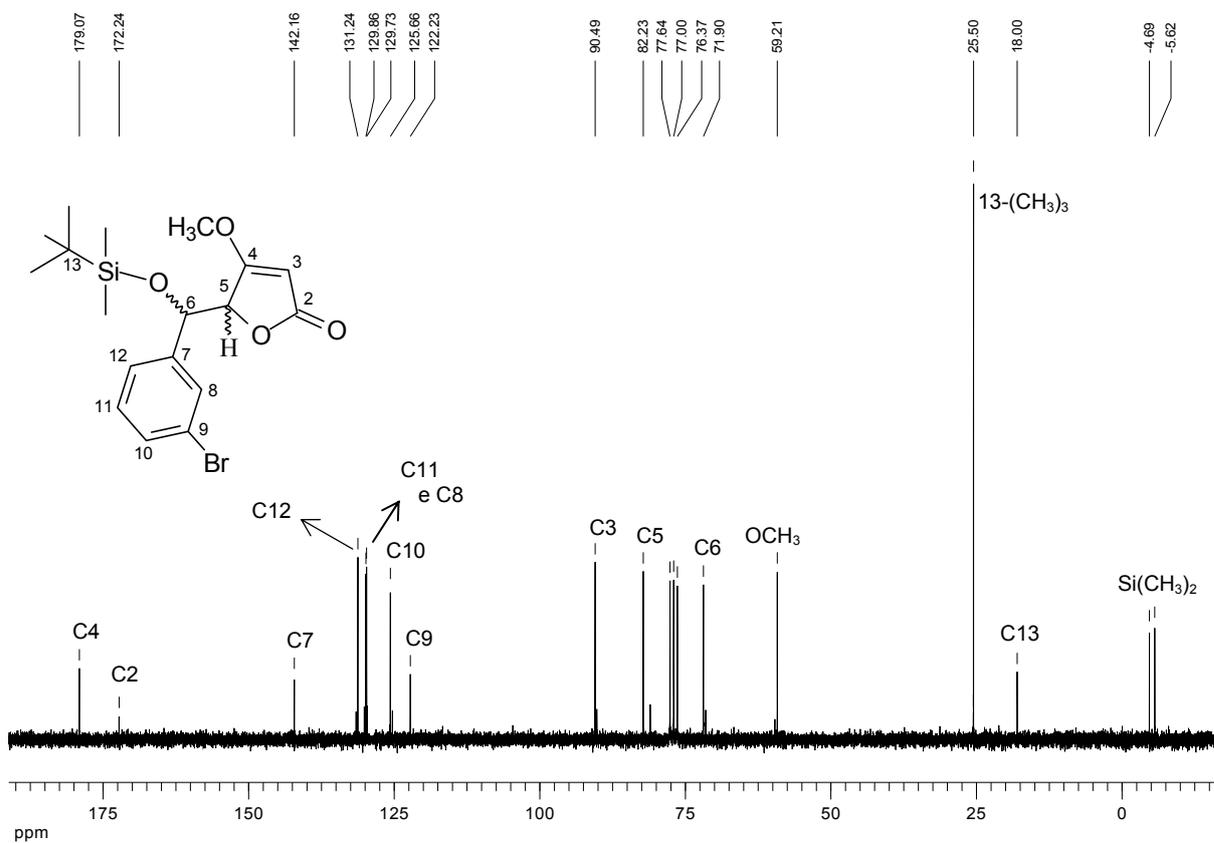


Figura 134. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 9.

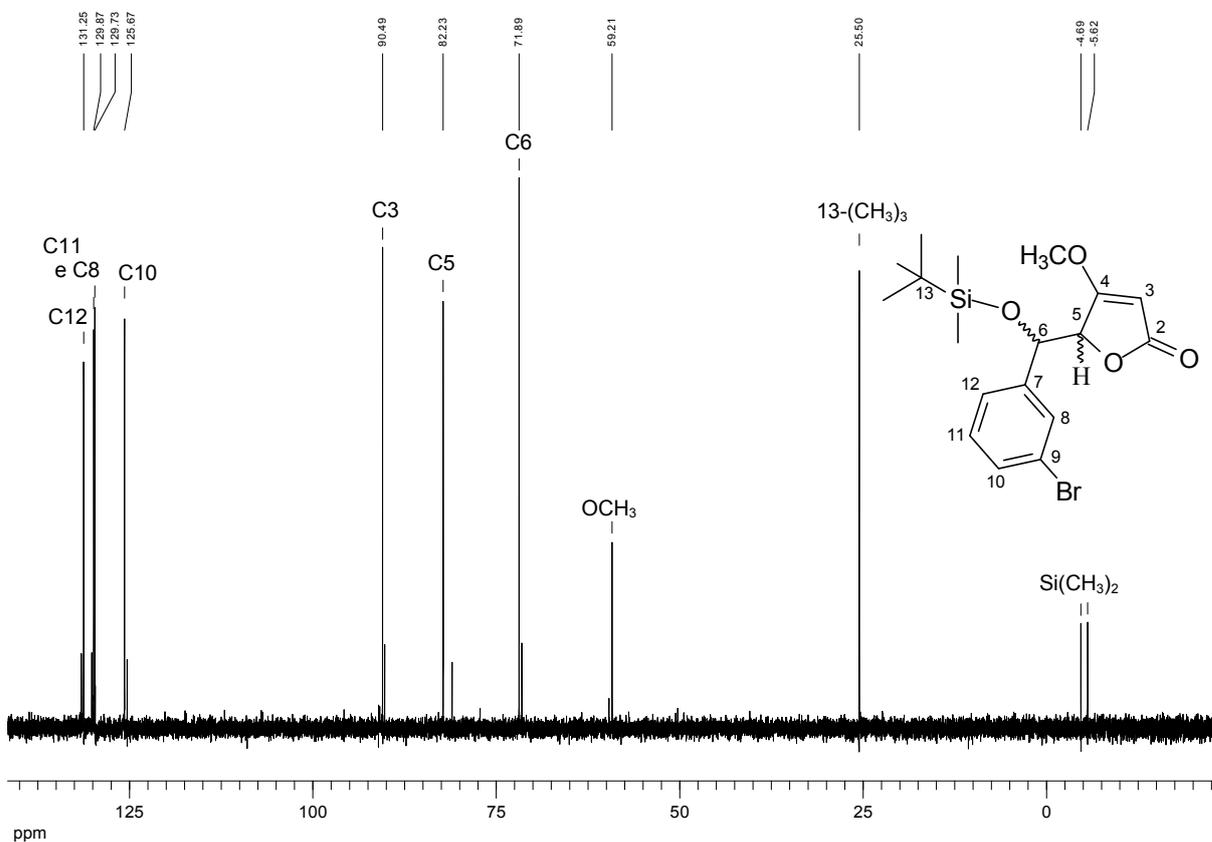


Figura 135. Espectro de DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) de 9.

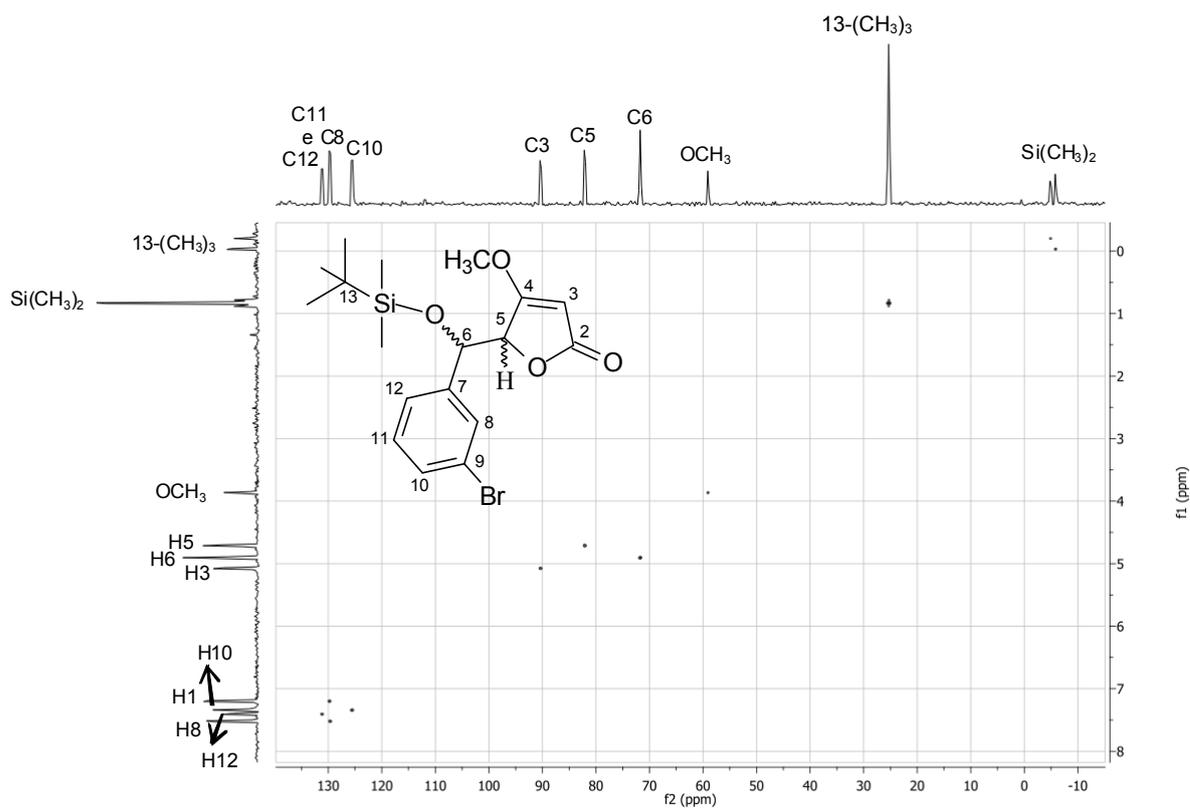


Figura 136. Mapa de contorno HETCOR (50 MHz em f1 e 200 MHz em f2, CDCl₃) de 9.

O espectro de massas dos compostos 7 e 9 (Figura 137 e Figura 138) não apresentaram o pico do íon molecular, mas através da análise das fragmentações (Figura 139) foi possível confirmar a formação do produto. O pico base refere-se ao fragmento em m/z 73 que está representado na Figura 82.

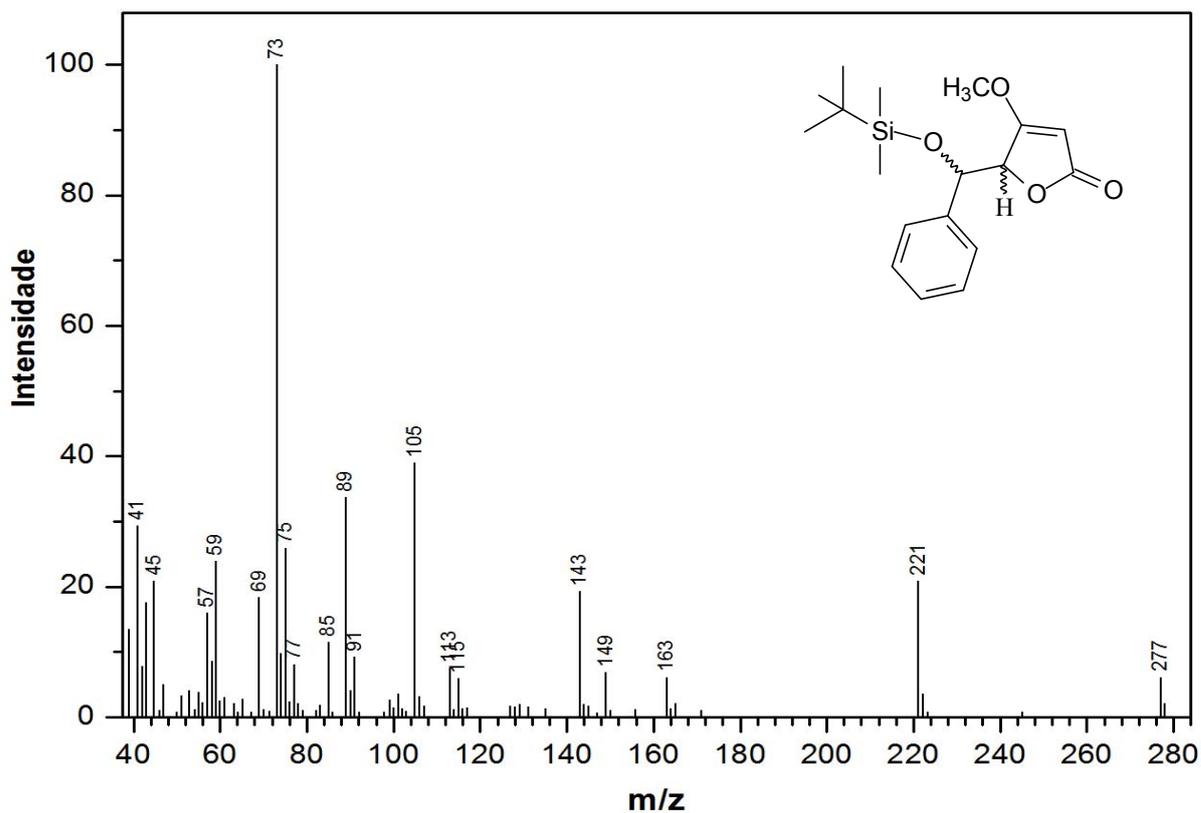


Figura 137. Espectros de massas de 7.

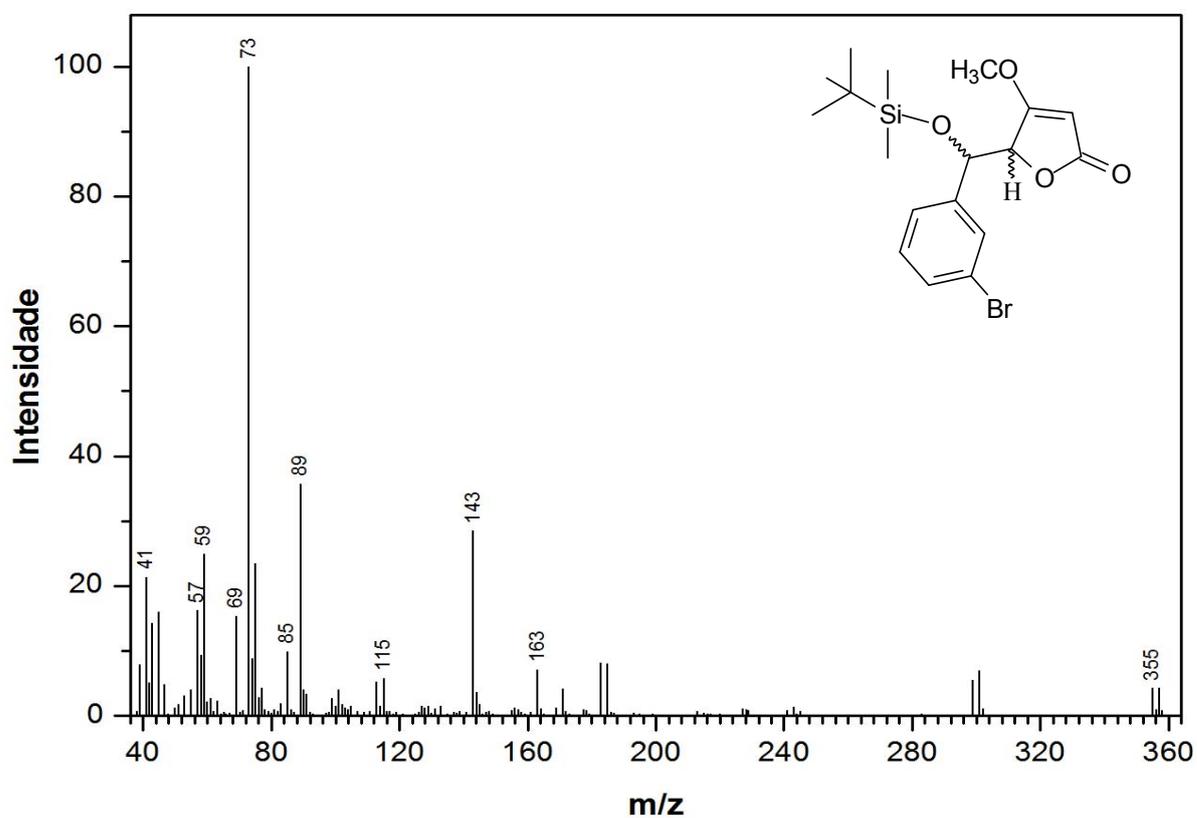


Figura 138. Espectro de massas de 9.

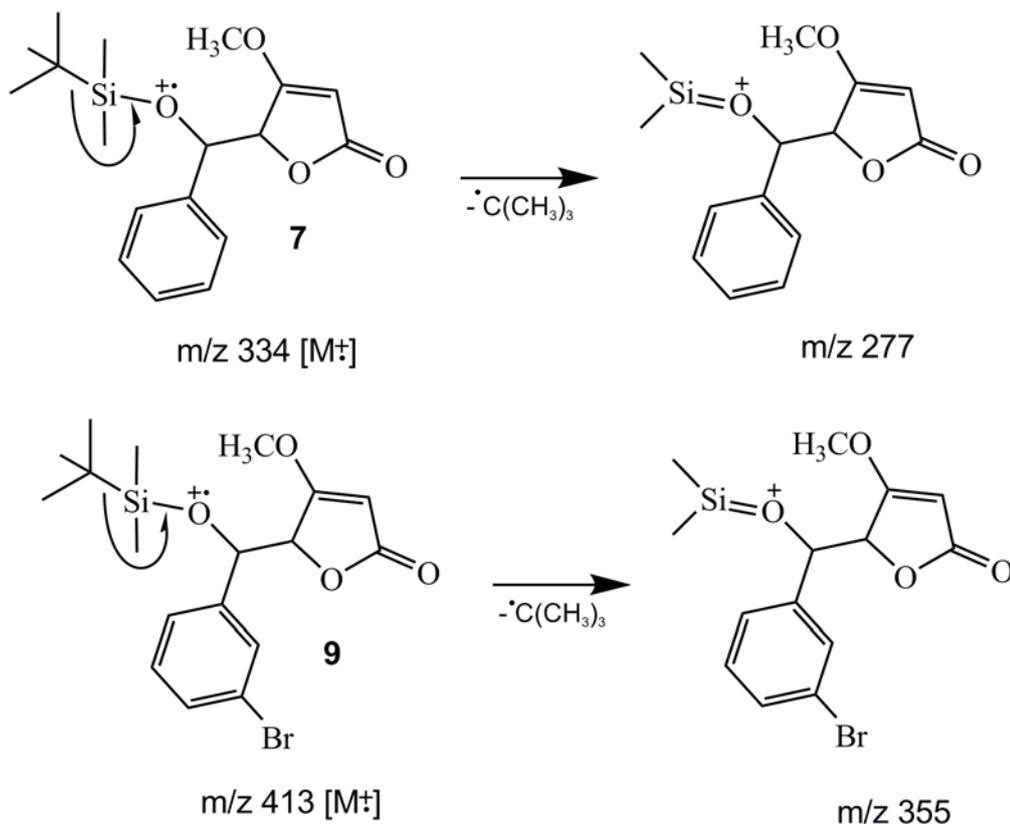


Figura 139. Propostas de fragmentações para os íons observados no espectro de massas dos compostos 7 e 9.

4.4. Ensaio biológicos

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

O ensaio de escolha para avaliar a atividade antifúngica foi o denominado bioautografia, sendo um teste simples e fundamenta-se na ação inibitória de extratos/substâncias antifúngicas potenciais sobre esporos de fungos utilizados para a revelação das cromatoplacas (Homans e Fuchs, 1970).

O ensaio utilizado foi realizado com esporos de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* como reveladores. Estas duas espécies foram escolhidas por não serem patogênicas ao homem, produzirem uma grande quantidade de esporos e apresentarem um crescimento uniforme em condições de cultura *in vitro*.

O butenolídeo **24**, obtido comercialmente, e os butenolídeos **7-20**, **22** e **23** preparados em laboratório por meio de síntese (Figura 140), foram submetidos à bioensaios para avaliação da atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

A Figura 140 apresenta os resultados das quantidades mínimas necessária para inibir o crescimento dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e a Tabela 27 os resultados em várias concentrações.

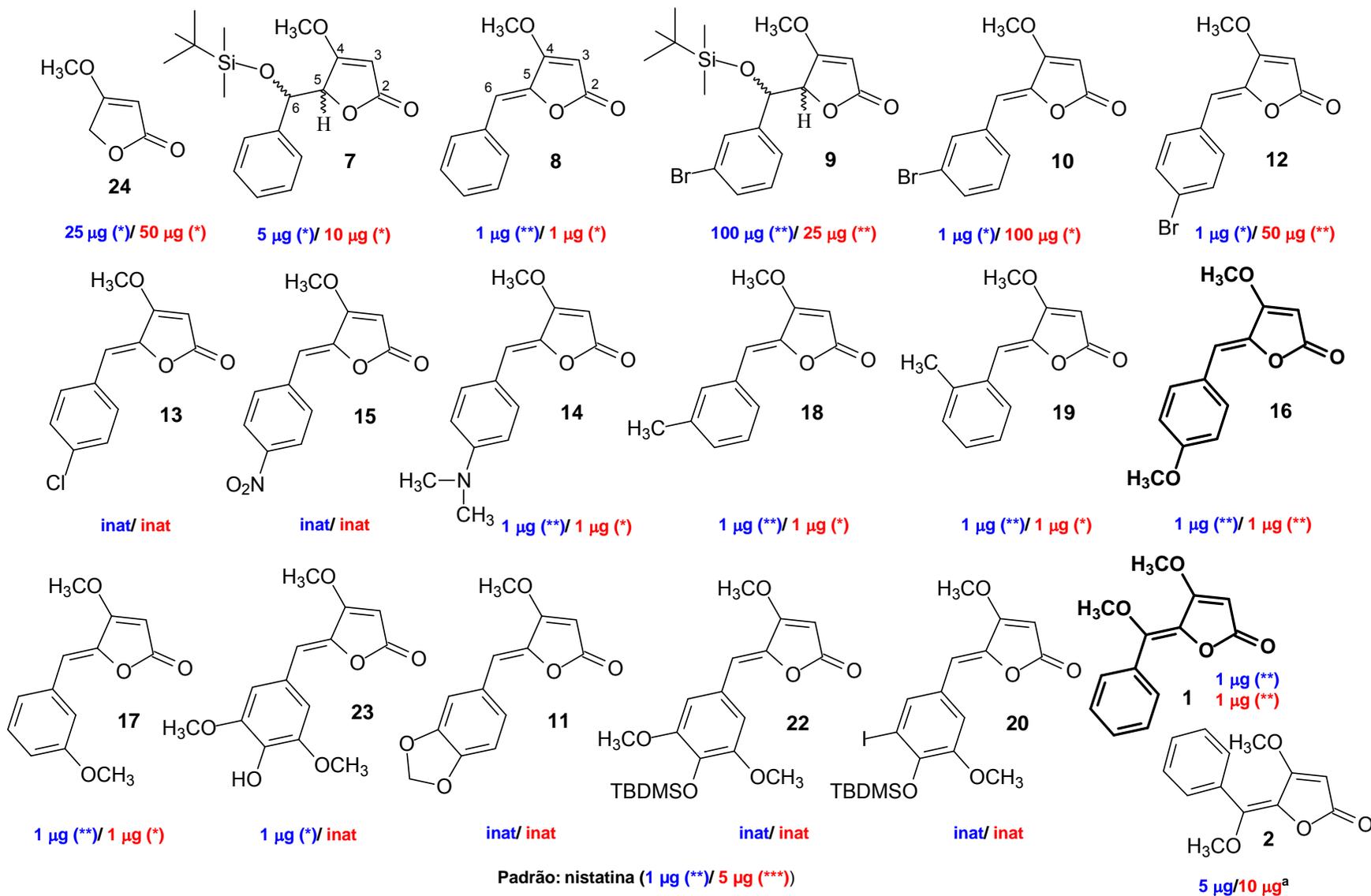


Figura 140. Atividade antifúngica (µg)[#] contra *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. [#] Quantidade mínima requerida para a inibição do crescimento dos fungos por bioautografia. * = atividade fraca, ** = atividade média, *** = atividade forte. ^a(Lago et al., 2005).

Pode-se observar pelos resultados obtidos pela bioautografia (Figura 140) que, os compostos **1**, **8**, **10**, **12**, **14**, **16**, **17**, **18**, **19** e **23** apresentaram uma dose resposta mínima de 1 µg contra *C. cladosporioides*, assim como o antibiótico comercial utilizado como padrão (nistatina). Já os compostos **7**, **9** e **24** apresentaram uma dose de resposta mínima de 5, 100 e 25 µg, respectivamente, e os compostos **11**, **13**, **15**, **20** e **22** foram inativos. Contra o fungo *C. sphaerospermum* os compostos **1**, **8**, **14**, **16**, **17**, **18**, **19** e **23** apresentaram uma dose resposta mínima de 1 µg, sendo mais ativos que o padrão (nistatina). Os compostos **7**, **9**, **10**, **12** e **24** apresentaram uma dose de resposta mínima de 5, 25, 100, 50 e 50 µg, respectivamente, e os compostos **11**, **13**, **15**, **20**, **22** e **23** foram inativos.

A δ -lactona α,β -insaturada é a estrutura comum a todos os compostos, variando-se apenas o padrão de substituição do anel aromático entre eles, ou a ligação dupla exocíclica e a presença do 6-OMe nos piperolídeos **1** e **2** (Figura 140). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 27), foi verificado que a presença da dupla ligação exocíclica é importante para atividade, sendo comprovado quando se compara os compostos **7** e **9** com os **8** e **10**. Foi verificado também que a presença de halogênios na parte arilidênica diminui a atividade dos compostos (**10**, **12** e **13**), sendo que o composto clorado (**13**) foi inativo. Como o butenolídeo com substituinte nitro (**15**) foi inativo e o butenolídeo com substituinte 4-dimetilamino foi ativo, foi sugerido que grupos retiradores de elétrons diminuem a atividade antifúngica.

A comparação dos compostos **16** e **17** e os **18** e **19** indicou que os butenolídeos com substituintes em *meta* diminuem a atividade contra o *C. sphaerospermum*. Os compostos 9,10,11-trissubstituídos foram inativos (**20** e **22**), sendo o composto **23** inativo contra o *C. sphaerospermum*. Foi possível sugerir que a presença do grupo 6-OMe do piperolídeo **1** não afeta a atividade contra o *C.*

cladosporioides e tem pouca influência na atividade contra o *C. sphaerospermum*, sendo esta compensada pelo substituinte OMe em *para* (composto **16**).

O piperolídeos **1** apresenta uma atividade maior que o **2**, sugerindo que a configuração da ligação dupla exocíclica está associada ao potencial antifúngico. A avaliação da atividade antifúngica com a furanona **24**, reagente de partida, sugere que a parte γ -alquilidênica é importante.

4.4.2. Ensaio contra *Trypanosoma cruzi*

Visto que na literatura não se encontra estudos sobre a atividade tripanocida de butenolídeos e devido à necessidade de obtenção de novos medicamentos, resolveu-se obter um estudo preliminar de relação estrutura atividade contra *T. cruzi* destes compostos (Figura 141). Os butenolídeos foram submetidos a teste para avaliação da atividade tripanocida nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, através do teste colorimétrico utilizando MTT padronizado por Muelas-Serrano *et al.* (2000a), utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). A Tabela 28 mostra às porcentagens de parasitas mortos em porcentagem de citotoxicidade (% C) em diferentes concentrações e os IC_{50} dos compostos submetidos a avaliação da atividade tripanocida.

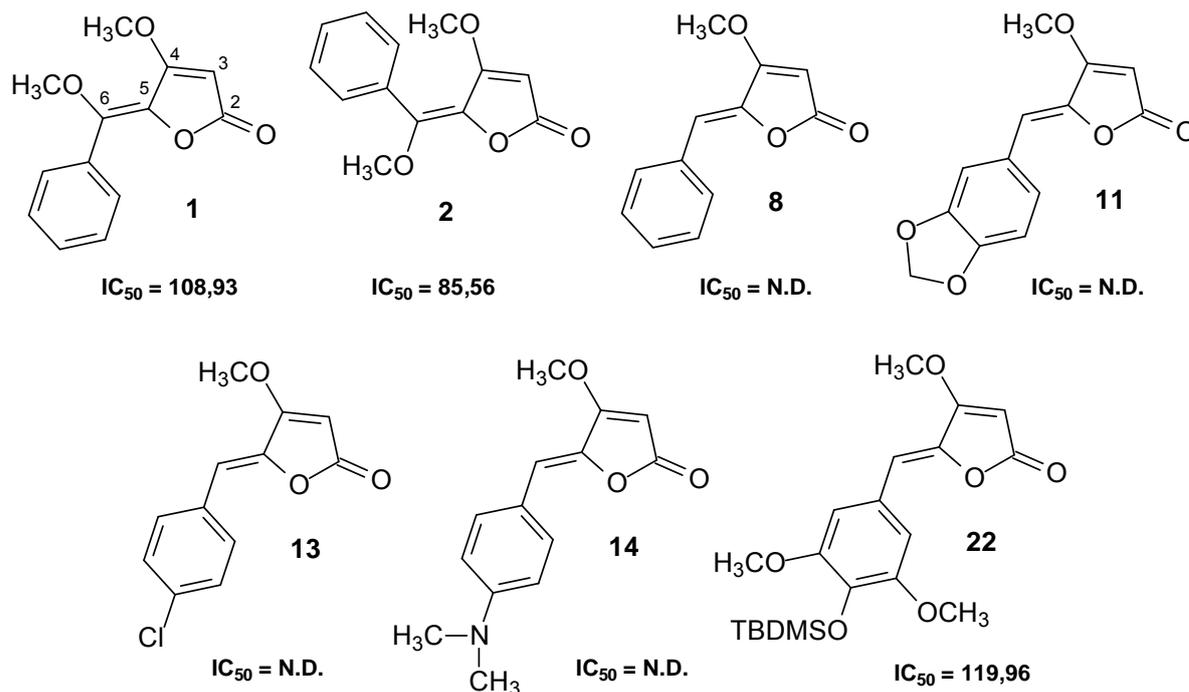


Figura 141. Estruturas dos butenolídeos submetidos à avaliação da atividade tripanocida. Benzonidazol ($9,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi usado como controle positivo.

Tabela 28. Atividade tripanocida (%) *in vivo* dos compostos contra a cultura da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y). Benzonidazol ($9,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi usado como controle positivo.

Compostos	100*	50	25	10	5,0	2,5	1,0	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	44	42	5	3	0	0	0	108,93
2	54	36	35	28	25	16	16	85,56
8	16	3	2	0	0	0	0	N.D.
11	33	24	12	12	3	2	1	N.D.
13	28	15	15	7	0,2	0	0	N.D.
14	30	28	22	12	12	5	0,4	N.D.
22	42	38	32	16	9	0	0	119,96

* Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$

Através dos resultados obtidos (Tabela 28 e Figura 141) foi possível verificar que os γ -arilidenobutenolídeos **8**, **11**, **13**, **14** não mostraram inibição contra a cultura da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* nas concentrações avaliadas. O composto **22** mostrou baixa inibição com valor de IC_{50} de $119,96 \mu\text{g mL}^{-1}$. A melhor atividade observada para o composto **22** talvez seja atribuída ao anel aromático trissubstituído. Os piperolídeos **1** ($IC_{50} = 108,93 \mu\text{g mL}^{-1}$) e **2** ($IC_{50} = 85,56 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram mais ativos, indicando que o grupo 6-OMe é importante para atividade. Foi verificado também que a configuração da dupla ligação exocíclica é importante, sendo o composto Z (**2**) o mais ativo.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise dos metabólitos secundários de *P. malacophyllum* indicou a predominância dos butenolídeos **1** e **2** no extrato metanólico de folhas, de onde foram caracterizados ainda dois sesquiterpenos **4** (inérito) e **5** e dois compostos alquenilfenílicos **3** (inérito) e **6**. Os sesquiterpenos são freqüentes em muitas espécies vegetais e também em várias espécies de *Piper*. Entretanto, sesquiterpenos com esqueleto acorano não haviam ainda sido relatadas em espécies do gênero *Piper*.

Os butenolídeos são estruturalmente relacionados às kavalactonas de *Piper methysticum* e não são muito frequentemente encontrados em Piperaceae. Foram encontrados relatos em *Piper sanctum*, *P. fadyenii* e *P. malacophyllum*. A possibilidade de relação biossintética com kavalactonas, como a kavaína e metisticina, pironas produzidas por *Piper methysticum*, foi inferida por Pelter *et al.* (1987). Aparentemente, a biossíntese dos butenolídeos envolve a extensão da via fenilpropanoídica através de reações de condensação de Claisen com unidades de malonil-SCoA. Os estudos preliminares de incorporação de acetato [¹⁴C] e L-fenilalanina [U-¹⁴C] comprovaram essa possibilidade, porém outros estudos devem ser relacionados ao estudo dos PKSs tanto em nível enzimático quanto de genes.

Lipídios fenólicos ou fenóis de cadeia longa não isoprenóides existem em uma grande variedade de espécies de plantas e em algumas bactérias. Esses compostos são derivados da via do chiquimato e policetídica e incluem alquilfenóis, -catecóis, -resorcinóis e -hidroquinonas (Vyvyan *et al.*, 2002). O gênero *Piper* tem sido intensamente estudado e alquenilfenílicos como o **3** e **6** não são isolados com muita frequência, tendo sido descritos de *Piper gibbilimum*, *P. hispidum*, *P.* Através

da análise dos extratos por cromatografia gasosa das raízes, caules, e frutos foi observada a predominância do alquenilfenol **6**. Nas folhas, os butenolídeos **1** e **2** foram os constituintes majoritários. O composto **3** também foi detectado nos frutos e caules e como composto majoritário do óleo essencial das folhas (60,4%). Foram identificados 81,9% dos constituintes no óleo essencial.

Um novo método em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) foi desenvolvido e validado para análise dos butenolídeos em extratos de folhas de *P. malacophyllum*. Com a metodologia proposta, os butenolídeos foram quantificados com tempo de análise inferior a cinco minutos, além das vantagens inerentes à própria técnica que dispensa etapas de *clean-up* de amostras e condicionamentos de colunas. Essas vantagens, juntamente com baixos custos de manutenção do CE, tornam a metodologia proposta adequada para análise de rotina de butenolídeos e compostos similares em extratos de plantas

Como a busca de outros análogos dos piperolídeos **1** e **2** nas plantas de *P. malacophyllum* revelou-se muito limitada, mas sua obtenção através da síntese (Boukouvalas *et al.*, 1998) constituiu-se numa excelente alternativa. Apesar de algumas reações terem ocorridas com baixos rendimentos, foram realizadas com sucesso. A metodologia envolvendo apenas uma etapa e reagentes de baixo custo mostrou-se eficaz, permitindo a obtenção de uma grande variedade de compostos planejados.

Os butenolídeos naturais e sintéticos foram testados contra a cultura da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e verificou-se que os compostos sintéticos não foram promissores e os naturais apresentaram baixa atividade. Outras classes de produtos naturais de espécies *Piper*, como as lignanas tetraidrofurânicas de *P. Piper solmsianum* (Martins *et al.*, 2003) e de *Peperomia blanda* (Felippe *et al.*, 2008) e

lignanas dibenzilbutirolactônicas de *P. cubeba* (Souza *et al.*, 2005), haviam sido anteriormente investigadas quanto ao potencial para o desenvolvimento de antichagásicos naturais (Nihei *et al.*, 2004).

A maioria dos compostos submetidos ao ensaio biológico apresentou atividades consideráveis sobre os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Verificou-se que a presença da dupla ligação exocíclica nos piperolídeos é importante para atividade e que a presença de substituintes nas posições 9,10 e11, halogênios na parte arilidênica e de grupos retiradores de elétrons diminuem ou anulam a atividade antifúngica. A atividade antifúngica de γ -alquilidenobutenolídeos constitui-se ainda num tema pouco descrito na literatura. A amplitude da atividade antifúngica poderá ser investigada através da análise dos produtos naturais isolados e dos análogos sobre outras linhagens de fungos, além da síntese de novos derivados. Como os γ -alquilidenobutenolídeos apresentam uma grande variabilidade de atividades biológicas, outros testes serão realizados como atividade citotóxica, herbicida, antibióticas, dentre outros.

A maioria dos compostos submetidos aos ensaios biológicos apresentou atividades consideráveis sobre os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Verificou-se que a presença da dupla ligação exocíclica nos piperolídeos é importante para atividade e que a presença de substituintes nas posições 9,10 e11, halogênios na parte arilidênica e de grupos retiradores de elétrons diminuem ou anulam a atividade antifúngica. A atividade antifúngica de γ -alquilidenobutenolídeos constitui-se ainda num tema pouco descrito na literatura. A amplitude da atividade antifúngica poderá ser investigada através da análise dos produtos naturais isolados e dos análogos sobre outras linhagens de fungos, além da síntese de novos derivados. Como os γ -alquilidenobutenolídeos apresentam uma grande variabilidade

de atividades biológicas, outros testes poderão ser realizados incluindo a atividade citotóxica, herbicida, antibióticas, dentre outras.

Através dos compostos identificados nos extratos e no óleo essencial foi possível estabelecer relações biossintéticas entre os metabólitos secundários isolados de *P. malacophyllum* e outras espécies de *Piper* que produzem compostos similares. Verificou-se também que a planta acumula preferencialmente policetídeos derivados de biossíntese mista (Figura 142). Tais informações constituem-se em importantes subsídios para estudos quimiosistemáticos e de estudos de atividade biológica. A compilação de todos os dados sobre a constituição química de plantas é muito interessante, mas a presença de um mesmo composto ou classe de compostos em táxons não relacionados não é evidência de afinidade sistemática, visto que muitas vezes a biossíntese das estruturas assume diferentes rotas. Portanto, a incorporação da filogenia molecular em estudos de quimiosistemática é essencial.

Apesar da filogenia molecular estar redesenhando a classificação das plantas, a enorme variedade de constituintes químicos isolados, combinados com dados morfológicos e outros tem seu lugar como parte da história natural do organismo em seu meio.

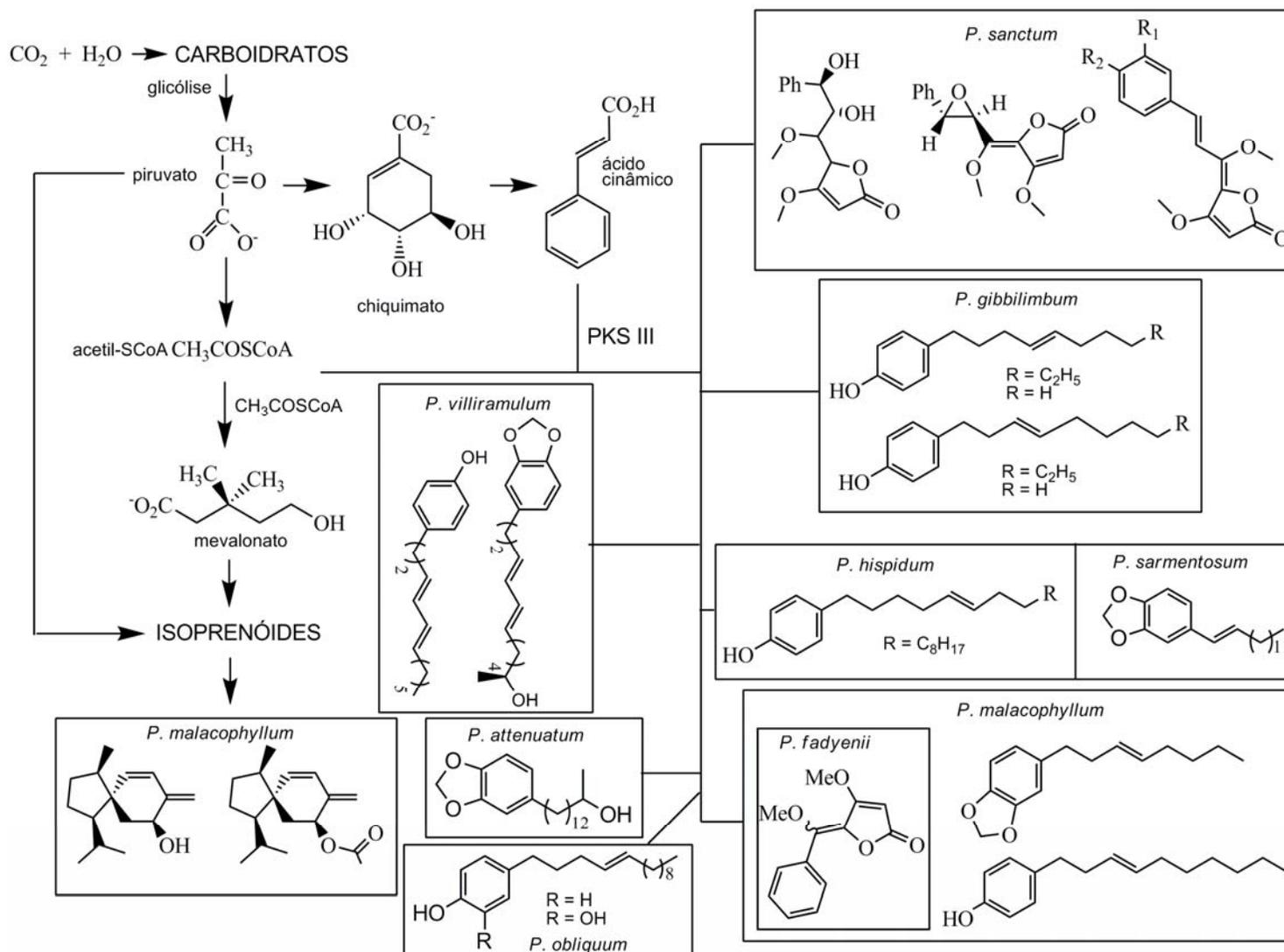


Figura 142. Proposta de relações biossintéticas entre os metabólitos secundários isolados de *Piper malacophyllum* e outras espécies de *Piper* que produzem compostos similares. PKS III: policetídeo sintase tipo III.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y., TAKIKAWA, H., MORI, K. (2001). Synthesis of Gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols isolated from *Piper gibbilibum*. *Biosci. Biotech. Bioch.* **65**, 732-735.
- AHMED, M. M., AKHMEDOV, N. G., CUI, H., FRIEDRICH, D., O'DOHERTY, G. A. (2006). A de novo asymmetric approach to achiral deoxy-melodorinol analogues. *Heterocycles* **70**, 223-233.
- AHUJA, E. S., FOLEY, J. P. (1994). Separation of very hydrophobic compounds by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **680**, 73-83.
- ALECIO, A. C., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., FURLAN, M. (1998). Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* **61**, 637-639.
- ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications (Methods in Molecular Biology)**. Totowa: Humana Press Inc., v. 52. 1996. 349 p.
- AMBROZIN, A. R. P., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., SILVA, M. F. D. G. F. D., ALBUQUERQUE, S. D. (2008). Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. *Quim. Nova* **31**, 740-743.
- ANASTASIA, L., XU, C., NEGISHI, E.-I. (2002). Catalytic and selective conversion of (Z)-2-en-4-ynoic acids to either 2H-pyran-2-ones in the presence of ZnBr₂ or (Z)-5-alkylidenefuran-2(5H)-ones in the presence of Ag₂CO₃. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5673-5676.
- APG, BREMER, B., BREMER, K., CHASE, M. W., REVEAL, J. L., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., STEVENS, P. F., ANDERBERG, A. A., FAY, M. F., GOLDBLATT, P., JUDD, W. S., KALLERSJO, M., KAREHED, J., KRON, K. A., LUNDBERG, J., NICKRENT, D. L., OLMSTEAD, R. G., OXELMAN, B., PIRES, J. C., RODMAN, J. E., RUDALL, P. J., SAVOLAINEN, V., SYTSMA, K. J., VAN DER BANK, M., WURDACK, K., XIANG, J. Q. Y., ZMARZTY, S. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* **141**, 399-436.
- APG, BREMER, K., CHASE, M. W., STEVENS, P. F., ANDERBERG, A. A., BACKLUND, A., BREMER, B., BRIGGS, B. G., ENDRESS, P. K., FAY, M. F., GOLDBLATT, P., GUSTAFSSON, M. H. G., HOOT, S. B., JUDD, W. S., KALLERSJO, M., KELLOGG, E. A., KRON, K. A., LES, D. H., MORTON, C. M., NICKRENT, D. L., OLMSTEAD, R. G., PRICE, R. A., QUINN, C. J., RODMAN, J. E., RUDALL, P. J., SAVOLAINEN, V., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., SYTSMA, K. J., THULIN, M. (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**, 531-553.
- ARMAREGO, W. L. F., CHAI, C. L. L. **Purification of Laboratory Chemicals**. 5th ed. New York: Butterworth-Heinemann. 2003. 608 p.

- ASAOKA, M., YANAGIDA, N., ISHIBASHI, K., TAKEI, H. (1981). Synthesis of 4-ylidenebutenolides from 2-trimethylsiloxyfuran. *Tetrahedron Lett.* **22**, 4269-4270.
- BAER, H., HOLDEN, M., SEEGAL, B. C. (1946). The nature of the antibacterial agent from *Anemone pulsatilla*. *J. Biol. Chem.* **162**, 65-68.
- BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* **51**, 899-902.
- BANG, S. C., KIM, Y., YUN, M. Y., AHN, B. Z. (2004). 5-arylidene-2(5H)-furanone derivatives: Synthesis and structure-activity relationship for cytotoxicity. *Archives of Pharmacal Research* **27**, 485-494.
- BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., ALVARENGA, E. S., OLIVEIRA, A., KING-DIAZ, B., LOTINA-HENNSEN, B. (2006). Phytogrowth- and photosynthesis-inhibiting properties of nostoclide analogues. *Pest Manag. Sci.* **62**, 214-222.
- BARBOSA, L. C. A., ROCHA, M. E., TEIXEIRA, R. R., MALTHA, C. R. A., FORLANI, G. (2007). Synthesis of 3-(4-bromobenzyl)-5-(aryl methylene)-5H-furan-2-ones and their activity as inhibitors of the photosynthetic electron transport chain. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 8562-8569.
- BARKMAN, T. J., CHENERY, G., MCNEAL, J. R., LYONS-WEILER, J., ELLISENS, W. J., MOORE, G., WOLFE, A. D., DEPAMPHILIS, C. W. (2000). Independent and combined analyses of sequences from all three genomic compartments converge on the root of flowering plant phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13166-13171.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 3ª ed. Campinas: UNICAMP. 2007. 480 p.
- BATISTA JR, J. M., LOPES, A. A., AMBRÓSIO, D. L., REGASINI, L. O., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., CICARELLI, R. M. B., FURLAN, M. (2008). Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 538-540.
- BEECHAN, C. M., SIMS, J. J. (1979). The first synthesis of fimbrolides, a novel class of halogenated lactones naturally occurring in the red seaweed *Delisea fimbriata* (Bonnemaisoniaceae). *Tetrahedron Lett.* **NO. 19**, 1649-1652.
- BEGLEY, M. J., GEDGE, D. R., PATTENDEN, G. (1978). Total synthesis and stereostructure of methyl (*E*)-*O*-methylmulticolanate, a 4-ylidene-tetronic acid from *Penicillium multicolor*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 60-61.
- BELL, I., JONES, E. R. H., WHITING, M. C. (1958). 266. Researches on acetylenic compounds. Part LXI. The synthesis of three polyacetylenic esters. *J. Chem. Soc.*, 1313-1322.

- BELLA, M., PIANCATELLI, G., SQUARCIA, A. (2001). Efficient preparation of 3-substituted-furan-2(5*H*)-ones and their direct vinylogous aldol addition. *Tetrahedron* **57**, 4429-4436.
- BELLINA, F., ANSELMINI, C., ROSSI, R. (2002). Total synthesis of rubrolide M and some of its unnatural congeners. *Tetrahedron Lett.* **43**, 2023-2027.
- BELLINA, F., ANSELMINI, C., VIEL, S., MANNINA, L., ROSSI, R. (2001a). Selective synthesis of (*Z*)-4-aryl-5-[1-(aryl)methylidene]-3-bromo-2(5*H*)-furanones. *Tetrahedron* **57**, 9997-10007.
- BELLINA, F., BIAGETTI, M., CARPITA, A., ROSSI, R. (2001b). Selective synthesis of natural and unnatural 5,6-disubstituted 2(2*H*)-pyranones via iodolactonization of 5-substituted (*Z*)-2-en-4-ynoic acids. *Tetrahedron* **57**, 2857-2870.
- BELLINA, F., ROSSI, R. (2002). Synthetic applications of 3,4-dihalo-2(5*H*)-furanones: A formal total synthesis of nostoclides I and II. *Synthesis*, 2729-2732.
- BILIA, A. R., SCALISE, L., BERGONZI, M. C., VINCIERI, F. F. (2004). Analysis of kavalactones from Piper methysticum (kava-kava). *Journal of Chromatography B* **812**, 203-214.
- BORSCH, T., HILU, K. W., QUANDT, D., WILDE, V., NEINHUIS, C., BARTHLOTT, W. (2003). Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* **16**, 558-576.
- BORSCH, T., LHNE, C., MULLER, K., HILU, K. W., WANKE, S., WORBERG, A., BARTHLOTT, W., NEINHUIS, C., QUANDT, D. (2005). Towards understanding basal angiosperm diversification: Recent insights using rapidly evolving genomic regions. *Nora Acta Leopoldina* **342**, 85-110.
- BOUKOUVALAS, J., BELTRÁN, P. P., LACHANCE, N., COÛTE, S., MALTAIS, F., POULIOT, M. (2007). A new, highly stereoselective synthesis of γ -unsubstituted (*Z*)- γ -alkylidene-butenolides using bromine as a removable stereocontrol element. *Synlett*, 219-222.
- BOUKOUVALAS, J., LACHANCE, N., OUELLET, M., TRUDEAU, M. (1998). Facile access to 4-aryl-2(5*H*)-furanones by Suzuki cross coupling: Efficient synthesis of rubrolides C and E. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7665-7668.
- BOUKOUVALAS, J., MALTAIS, F. (1995). An efficient total synthesis of the antibiotic patulin. *Tetrahedron Lett.* **36**, 7175-7176.
- BOUKOUVALAS, J., MALTAIS, F., LACHANCE, N. (1994). Furanolate-based strategy for sequential 2,3,4-trisubstitution of butenolide: Total synthesis of nostoclides I and II. *Tetrahedron Lett.* **35**, 7897-7900.
- BOURDREUX, Y., BODIO, E., WILLIS, C., BILLAUD, C., LE GALL, T., MIOSKOWSKI, C. (2008). Synthesis of vulpinic and pulvinic acids from tetronic acid. *Tetrahedron* **64**, 8930-8937.

- BRIONES, M. R. S., SOUTO, R. P., STOLF, B. S., ZINGALES, B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **104**, 219-232.
- BROWN, G. D., WONG, H.-F. (2004). Total synthesis of (\pm) maculalactone A, maculalactone B and maculalactone C and the determination of the absolute configuration of natural (+) maculalactone A by asymmetric synthesis. *Tetrahedron* **60**, 5439-5451.
- BRUCKNER, R. (2001). The β -elimination route to stereodefined γ -alkylidenebutenolides. *Chem. Commun.*, 141-152.
- BUTLER, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2141-2153.
- CAINE, D., UKACHUKWU, V. C. (1985). A new synthesis of 3-n-butyl-4-bromo-5(Z)-(bromomethylidene)-2-(5H)-furanone, a naturally occurring fimbrolide from *Delisia fimbriata* (Bonnemaisoniaceae). *J. Org. Chem.* **50**, 2195-2198.
- CANDOLLE, A. L. P. P. (1869). *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* **16**, 337.
- CANTINO, P. D., DOYLE, J. A., GRAHAM, S. W., JUDD, W. S., OLMSTEAD, R. G., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., DONOGHUE, M. J. (2007). Towards a phylogenetic nomenclature of *Tracheophyta*. *Taxon* **56**, 822-846.
- CASTAÑER, J., PASCUAL, J. (1958). 801. Isomerisation of phenylpropargylidenemalonic acid to γ -benzylidene- α -carboxybutenolide. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3962-3964.
- CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim. Nova* **21**, 99-105.
- CHASE, M. W. (1993). Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**, 528-580.
- 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.
- CIATTINI, P. G., MASTROPIETRO, G., MORERA, E., ORTAR, G. (1993). A new synthesis of 3-ylidenephthalides via palladium-catalyzed cyclocarbonylation of 2-triflyloxyacetophenones. *Tetrahedron Lett.* **34**, 3763-3766.
- CONNOLLY, J. D., HILL, R. A. **Dictionary of Terpenoids Volume 1: Mono- and Sesquiterpenoids**. London: Chapman & Hall. 1999. 653 p.

- COPERET, C., SUGIHARA, T., WU, G., SHIMOYAMA, I., NEGISHI, E.-I. (1995). Acylpalladation of internal alkynes and palladium-catalyzed carbonylation of (*Z*)- β -iodoenones and related derivatives producing γ -lactones and γ -lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3422-3431.
- CORRIE, J. E. T. (1971). A facile synthesis of ylidenebutenolides. *Tetrahedron Lett.* **12**, 4873-4876.
- CORTEZ, D. A. G., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., SILVA, M. G. F. D., FERREIRA, A. G., CASS, Q. B. (2001). Separation and purification of meliacin butenolides from *Trichilia estipulata* by normal-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **24**, 415-423.
- COSTANTIN, M. B., SARTORELLI, P., LIMBERGER, R., HENRIQUES, A. T., STEPPE, M., FERREIRA, M. J. P., OHARA, M. T., EMERENCIANO, V. P., KATO, M. J. (2001). Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and C-13-NMR. *Planta Med.* **67**, 771-773.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.
- CRANE, P. R., FRIIS, E. M., PEDERSEN, K. R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27-33.
- CRANE, P. R., HERENDEEN, P., FRIIS, E. M. (2004). Fossils and plant phylogeny. *Am. J. Bot.* **91**, 1683-1699.
- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. 1981. 1262 p.
- CSEKE, L. J., KIRAKOSYAN, A., KAUFMAN, P. B., WARBER, S. L., DUKE, J. A., BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2006. 551 p.
- D. MCCOMBS, J., W. BLUNT, J., V. CHAMBERS, M., H.G. MUNRO, M., T. ROBINSON, W. (1988). Novel 2(5*H*)-furanones from the red marine alga *Delisea elegans* (Lamouroux). *Tetrahedron* **44**, 1489-1502.
- DAHLGREN, R. M. T. (1980). A revised system of classification of the angiosperms. *Bot. J. Linn. Soc.* **80**, 91-124.
- 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.
- DAVIES, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A* **503**, 1-24.
- DE FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. (2000). Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Ann. Bot.* **85**, 455-460.

- DE FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. (2007). Phenology and pollination biology of eight *Peperomia* species (Piperaceae) in semideciduous forests in Southeastern Brazil. *Plant Biology* **9**, 136-141.
- DE MARCH, P., FONT, J., GRACIA, A., QINGYING, Z. (1995). Easy access to 5-alkyl-4-bromo-2(5*H*)-furanones: Synthesis of a fimbrolide, an acetoxyfimbrolide, and bromobeckerelide. *J. Org. Chem.* **60**, 1814-1822.
- DIAS, J. C. P. (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**, 370-375.
- DIXON, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.
- DIXON, R. A. (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 329-336.
- DOYLE, J. A., ENDRESS, P. K. (2000). Morphological phylogenetic analysis of basal angiosperms: Comparison and combination with molecular data. *Int. J. Plant Sci.* **161**.
- DUCHÊNE, A., THIBONNET, J., PARRAIN, J.-L., ANSELMINI, E., ABARBRI, M. (2007). Regioselective synthesis of (*E*)-5-(tributylstannylmethylidene)-5*H*-furan-2-ones and (*E*)-3-(tributylstannylmethylidene)-3*H*-isobenzofuran-1-ones: Easy access to γ -alkylidenebutenolide and Phthalide Skeletons. *Synthesis*, 597-607.
- DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C., CHATTERJEE, M. (2005). Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.* **54**, 119-122.
- DYER, L. A., PALMER, A. D. N. **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution.** New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004. 228 p.
- FÁKOVÁ, H., POUR, M., KUNES, J., SENEL, P. (2005). Carbonylative lactonization via carbonyl oxygen attack: a short and selective total synthesis of uncinine and its analogues. *Tetrahedron Lett.* **46**, 8137-8140.
- FANG, X. P., ANDERSON, J. E., CHANG, C. J., MCLAUGHLIN, J. L. (1991). Three new bioactive styryllactones from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron* **47**, 9751-9758.
- 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.
- FERNANDES, A. M. A. P., PRADO, A. L., BARATA, L. E. S., PAULO, M. Q., AZEVEDO, N. R., FERRI, P. H. (1997). A method to separate lignoids from *Virola* leaves. *Phytochem. Analysis* **8**, 18-21.

- FERNANDES, J. F., CASTELLANI, O. (1966). Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **18**, 195-202.
- FIANDANESE, V., BOTTALICO, D., MARCHESE, G., PUNZI, A. (2004). New stereoselective methodology for the synthesis of dihydroxerulin and xerulin, potent inhibitors of the biosynthesis of cholesterol. *Tetrahedron* **60**, 11421-11425.
- FIRN, R. D., JONES, C. G. (2003). Natural products - A simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 382-391.
- FONSECA, F. N., KATO, M. J., JR., L. O., NETO, N. P., TAVARES, M. F. M. (2001). Critical assessment of electrolyte systems for the capillary electrophoresis analysis of phenolic compounds in herbal extracts. *J. Microcolumn Sep.* **13**, 227-235.
- FONSECA, F. N., TAVARES, M. F. M. (2004). Validation of a capillary electrophoresis method for the quantitative determination of free and total apigenin in extracts of *Chamomilla recutita*. *Phytochem. Anal.* **15**, 65-70.
- FONSECA, F. N., TAVARES, M. F. M., HORVAÏTH, C. (2007). Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. *J. Chromatogr. A* **1154**, 390-399.
- FRIEDMAN, W. E. (2001). Comparative embryology of basal angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 14-20.
- FRODIN, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon* **53**, 753-776.
- GALLO, G. G., CORONELLI, C., VIGEVANI, A., LANCINI, G. C. (1969). The structure of tetrenolin : A new antibiotic substance. *Tetrahedron* **25**, 5677-5680.
- GARA, A. P., MASSY-WESTROPP, R. A., REYNOLDS, G. D. (1969). A synthesis of enol lactones. *Tetrahedron Letters* **10**, 4171-4172.
- GERSHELL, L. J., ATKINS, J. H. (2003). A brief history of novel drug discovery technologies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2**, 321-327.
- 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 Med.*, 27-30.
- GOGOI, S., ARGADE, N. P. (2006). A facile chemoenzymatic approach to natural cytotoxic ellipsoidone A and natural ellipsoidone B. *Tetrahedron* **62**, 2715-2720.
- GOH, W. K., ISKANDER, G., BLACK, D. S., KUMAR, N. (2007). An efficient lactamization of fimbrolides to novel 1,5-dihydropyrrol-2-ones. *Tetrahedron Lett.* **48**, 2287-2290.
- GÖRTH, F. C., UMLAND, A., BRÜCKNER, R. (1998). From sugar lactones to stereodefined γ -alkylidenebutenolides - synthesis of analogs of the γ -

- Alkylidenebutenolide antibiotics lissoclinolide and tetrenolin. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1055-1062.
- HANO, Y., SHI, Y. Q., NOMURA, T., YANG, P. Q., CHANG, W. J. (1997). Two acetogenins from *Hemsleya ellipsoidea*. *Phytochemistry* **46**, 1447-1449.
- HARINANTENAINA, L., KURATA, R., ASAKAWA, Y. (2005). Chemical Constituents of Malagasy Liverworts, Part III: Sesquiterpenoids from *Bazzania decrescens* and *Bazzania madagassa*. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 515-518.
- HARROWVEN, D. C., WILDEN, J. D., TYTE, M. J., HURSTHOUSE, M. B., COLES, S. J. (2001). A new approach to the pseudopterosins using an arene alkylation with a γ -methylene- γ -butyrolactone. *Tetrahedron Lett.* **42**, 1193-1195.
- HARVEY, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* **5**, 294-300.
- HAVAL, K. P., ARGADE, N. P. (2007). Synthesis of natural fimbrolides. *Synthesis*, 2198-2202.
- HILU, K. W., BORSCH, T., MÜLLER, K., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., SAVOLAINEN, V., CHASE, M. W., POWELL, M. P., ALICE, L. A., EVANS, R., SAUQUET, H., NEINHUIS, C., SLOTTA, T. A. B., ROHWER, J. G., CAMPBELL, C. S., CHATROU, L. W. (2003). Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *Am. J. Bot.* **90**, 1758-1776.
- HÖGNADÓTTIR, Á., ROUSEFF, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **998**, 201-211.
- HOMANS, A. L., FUCHS, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr. A* **51**, 327-329.
- HSIEH, T. J., CHANG, F. R., CHIA, Y. C., CHEN, C. Y., LIN, H. C., CHIU, H. F., WU, Y. C. (2001). The alkaloids of *Artabotrys uncinatus*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1157-1161.
- INGHAM, C. F., MASSY-WESTROPP, R. A., REYNOLDS, G. D., THORPE, W. D. (1975). A synthesis of enol-lactones. *Aust. J. Chem.* **28**, 2499-2510.
- ITO, M. (1991). Recent progress in the synthesis of butenolide carotenoids and retinoids. *Pure Appl. Chem.* **63**, 13-22.
- ITO, M., HIRATA, Y., SHIBATA, Y., TSUKIDA, K. (1990). Synthesis of the 4-alkylidenebutenolide carotenoids, peridin and pyrroloxanthin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 197-199.
- ITO, M., IWATA, T., TSUKIDA, K. (1984). Retinoids and related compounds. VII. Synthesis of retinoidal 4-ylidenebutenolides and their homologues. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1709-1716.

- JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *Am. J. Bot.* **88**, 706-716.
- JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S., ZIMMER, E. A. (2004). Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: Reconstructing the evolution of floral development. *Int. J. Plant Sci.* **165**, 403-416.
- JI, A. J., NUNEZ, M. F., MACHACEK, D., FERGUSON, J. E., IOSSI, M. F., KAO, P. C., LANDERS, J. P. (1995). Separation of urinary estrogens by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B* **669**, 15-26.
- JUNG, J. H., CHANG, C.-J., SMITH, D. L., MCLAUGHLIN, J. L., PUMMANGURA, S., CHAICHANTIPYUTH, C., PATARAPANICH, C. (1991). Additional bioactive heptenes from *Melodorum fruticosum*. *J. Nat. Prod.* **54**, 500-505.
- KALLERSJO, M., FARRIS, J. S., CHASE, M. W., BREMER, B., FAY, M. F., HUMPHRIES, C. J., PETERSEN, G., SEBERG, O., BREMER, K. (1998). Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 *rbcL* DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants. *Plant Syst. Evol.* **213**, 259-287.
- KAR, A., GOGOI, S., ARGADE, N. P. (2005). Synthesis of naturally occurring bioactive butyrolactones: maculalactones A-C and nostoclode I. *Tetrahedron* **61**, 5297-5302.
- KATO, M. J., FURLAN, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure App. Chem.* **79**, 529-538.
- KAWABATA, J., FUKUSHI, Y., TAHARA, S., MIZUTANI, J. (1984). Studies on the chemical-constituents of Chloranthaceae plants. 3. Structures of novel sesquiterpene alcohols from *Chloranthus Japonicus* (Chloranthaceae). *Agric. Biol. Chem.* **48**, 713-717.
- KAWAMURA, S., HAMADA, T., SATOH, R., SANEMITSU, Y., SANDMANN, G., BABCZINSKI, R. (1992). Synthesis and chemistry of agrochemicals III. *ACS Symp. Ser.* **504**, 103-108.
- KAZLAUSKAS, R., MURPHY, P. T., QUINN, R. J., WELLS, R. J. (1977). A new class of halogenated lactones from the red alga *Delisea fimbriata* (Bonnemaisoniaceae). *Tetrahedron Lett.* **18**, 37-40.
- 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.
- KNIGHT, D. W., PATTENDEN, G. (1975). Synthesis of freelingyne, an acetylenic sesquiterpene from *Eremophila freelingii*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 641-644.
- KO, S. Y., LERPINIÈRE, J. (1995). Enantioselective synthesis of goniobutenolides A and B. *Tetrahedron Lett.* **36**, 2101-2104.

- KOTORA, M., NEGISHI, E.-I. (1996). Efficient and diastereoselective synthesis of (+)-goniobutenolide A via palladium-catalyzed ene-yne cross coupling-lactonization cascade. *Tetrahedron Lett.* **37**, 9041-9042.
- KOTORA, M., NEGISHI, E. I. (1997). Highly efficient and selective procedures for the synthesis of γ -alkylidenebutenolides via palladium-catalyzed ene-yne coupling and palladium- or silver-catalyzed lactonization of (Z)-2-en-4-ynoic acids. Synthesis of rubrolides A, C, D, and E. *Synthesis*, 121-128.
- KOUKOL, J., CONN, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* **236**, 2692-2698.
- KOVATS, E. (1958). Gas-chromatographische charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde and ketone. *Helv. Chim. Acta* **41**, 1915-1932.
- KRETZSCHMAR, R., MEYER, H. J., TESCHENDORF, H. J. (1970). Strychnine antagonistic potency of pyrone compounds of the kavaroot (*Piper methysticum* Forst.). *Experientia* **26**, 283-284.
- KUHNT, D., ANKE, T., BESL, H., BROSS, M., HERRMANN, R., MOCEK, U., STEFAN, B., STEGLICH, W. (1990). Antibiotics from basidiomycetes. XXXVII. New inhibitors of cholesterol biosynthesis from cultures of *Xerula melanotricha* dorfelt. *J. Antibiot.* **43**, 1413-1420.
- KUTCHAN, T. M. (1993). Strictosidine: From alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry* **32**, 493-506.
- KUTCHAN, T. M. (2001). Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol.* **125**, 58-60.
- LABANDEIRA, C. C., DILCHER, D. L., DAVIS, D. R., WAGNER, D. L. (1994). Ninety-seven million years of angiosperm-insect association: paleobiological insights into the meaning of coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12278-12282.
- LAGO, J. H. G., RAMOS, C. S., CASANOVA, D. C. C., MORANDIM, A. D., BERGAMO, D. C. B., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. D., FURLAN, M., GUIMARAES, E. F., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. (2004). Benzoic acid derivatives from *Piper Species* and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. phaeospermum*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1783-1788.
- LAGO, J. H. G., TANIZAKI, T. M., YOUNG, M. C. M., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. (2005). Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *J. Braz. Chem. Soc.* **16**, 153-156.
- LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., REIGADA, J. B., SOARES, M. G., ROESLER, B. P., KATO, M. J. (2007). Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). *Quim. Nova* **30**, 1222-1224.

- LANG, G., MAYHUDIN, N. A., MITOVA, M. I., SUN, L., VAN DER SAR, S., BLUNT, J. W., COLE, A. L. J., ELLIS, G., LAATSCH, H., MUNRO, M. H. G. (2008). Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.* **71**, 1595-1599
- LAROCK, R. C., HIGHTOWER, T. R. (1993). Synthesis of unsaturated lactones via palladium-catalyzed cyclization of alkenoic acids. *J. Org. Chem.* **58**, 5298-5300.
- LEE, K.-H. (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.* **67**, 273-283.
- LEE, S. C., BROWN, G. D. (1998). Tribenzylbutyrolactones and dibenzylidiphenyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzofuranones from *Kyrtuthrix maculans*. *J. Nat. Prod.* **61**, 29-33.
- LEVY, L. M., CABRERA, G. M., WRIGHT, J. E., SELDES, A. M. (2003). 5H-Furan-2-ones from fungal cultures of *Aporpium caryae*. *Phytochemistry* **62**, 239-243.
- 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. (2007). Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. *J. Nat. Prod.* **70**, 998-1001.
- LI, X.-C., FERREIRA, D., JACOB, M. R., ZHANG, Q., KHAN, S. I., ELSOHLY, H. N., NAGLE, D. G., SMILLIE, T. J., KHAN, I. A., WALKER, L. A., CLARK, A. M. (2004). Antifungal cyclopentenediones from *Piper coruscans*. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6872-6873.
- LIMA, L. M. (2007). Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. *Quim. Nova* **30**, 1456-1468.
- LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **23**, 3-25.
- LIU, F., NEGISHI, E.-I. (1997). Efficient and stereoselective synthesis of freelingyne via Pd-catalyzed cross coupling and lactonization. *J. Org. Chem.* **62**, 8591-8594.
- LLEBARIA, A., DELGADO, A., CAMPS, F., MORETO, J. M. (1993). Studies on the competitive nickel-promoted carbonylative intramolecular cyclization of vinyl and aryl halides with hydroxyalkenes. *Organometallics* **12**, 2825-2831.
- LOHNE, C., BORSCH, T. (2005). Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: A case study in basal angiosperms *Mol. Biol. Evol.* **22**, 317-332.
- LOPES, N. P. **Metabólitos secundários de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (MYRISTICACEAE)**. 1997. 137 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- LU, X., CHEN, G., XIA, L., GUO, G. (1997). Total synthesis of both enantiomers of melodorinol. Redetermination of their absolute configurations. *Tetrahedron-Asymmetry* **8**, 3067-3072.

- MAGALLON, S., CRANE, P. R., HERENDEEN, P. S. (1999). Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of Eudicots. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **86**, 297-372.
- MALLABY, R., RYBACK, G. (1972). Chemistry of a colour test for abscisic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 919-921.
- MANDRIOLI, R., MUSENGA, A., FERRANTI, A., LASAPONARA, S. S., FANALI, S., RAGGI, M. A. (2005). Separation and analysis of the major constituents of cloves by micellar electrokinetic chromatography. *J. Sep. Sci.* **28**, 966-972.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 1995. 374 p.
- MARQUES, J. V., KITAMURA, R. O. S., LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., GUIMARAES, E. F., KATO, M. J. (2007). Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmansseggianum*. *J. Nat. Prod.* **70**, 2036-2039.
- 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*. *Quim. Nova* **31**, 828-831.
- MARQUIS, R. J. (1988). Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper Arielanum*: Causes and consequences. *Ecology* **69**, 1552-1565.
- MARSTON, A. (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2786-2798.
- MARTIN, H. B., MCCALLUM, M., STOFER, W. D., EICHINGER, M. R. (2002). Kavain attenuates vascular contractility through inhibition of calcium channels. *Planta Med.* **68**, 784-789.
- MARTINEZ, R. (2006). Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J. Bras. Pneumol.* **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.
- MATA, R., MORALES, I., PEREZ, O., RIVERO-CRUZ, I., ACEVEDO, L., ENRIQUEZ-MENDOZA, I., BYE, R., FRANZBLAU, S., TIMMERMANN, B. (2004). Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1961-1968.
- MATHEWS, S., DONOGHUE, M. J. (2000). Basal angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochromes A and C. *Int. J. Plant Sci.* **161**.
- MEDRANO, F. J., WENCK, M. A., ENGEL, J. C., CRAIG, S. P. (2003). Analysis of 6-(2,2-dichloroacetamido)chrysene interaction with the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **46**, 2548-2550.

- MIAO, S., ANDERSEN, R. J. (1991). Rubrolides A-H, metabolites of the colonial tunicate *Ritterella rubra*. *J. Org. Chem.* **56**, 6275-6280.
- MIKICH, S. B., BIANCONI, G. V., HELENA, B., MAIA, N. S., TEIXEIRA, S. D. (2003). Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. *J. Chem. Ecol.* **29**, 2379-2383.
- MILLER, J. C., MILLER, J. N. **Statistic for Analytical Chemistry**. 2nd ed. Chichester: Ellis Horwood. 1988. 228 p.
- MIRANDA, J. E., NAVICKIENE, H. M. D., NOGUEIRA-COUTO, R. H., DE BORTOLI, S. A., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., FURLAN, M. (2003). Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie* **34**, 409-415.
- MOLFETTA, F. A., BRUNI, A. T., HONÓRIO, K. M., DA SILVA, A. B. F. (2005). A structure-activity relationship study of quinone compounds with trypanocidal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 329-338.
- MOREIRA, D. L., SOUZA, P. O., KAPLAN, M. A. C., PEREIRA, N. A., CARDOSO, G. L., GUIMARAES, E. F. (2001). Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. *An. Acad. Bras. Ci.* **73**, 33-37.
- MUELAS-SERRANO, S., NOGAL-RUIZ, J. J., GÓMEZ-BARRIO, A. (2000a). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* **86**, 999-1002.
- MUELAS-SERRANO, S., NOGAL, J. J., MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A., ESCARIO, J. A., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R., GÓMEZ-BARRIO, A. (2000b). In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 101-107.
- MUKAI, C., HIRAI, S., KIM, I. J., KIDO, M., HANAOKA, M. (1996). Studies on total syntheses of antitumor styryllactones: Stereoselective total syntheses of (+)-goniofufurone, (+)-goniobutenolide A, and (-)-goniobutenolide B. *Tetrahedron* **52**, 6547-6560.
- NAIR, M. G., MANSINGH, A. P., BURKE, B. A. (1986). Insecticidal properties of some metabolites of Jamaican *Piper* spp., and the amides synthesized from 5,6-Z and E-butenolides of *Piper fadyenii*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3053-3058.
- NANDI, O. I., CHASE, M. W., ENDRESS, P. K. (1998). A combined cladistic analysis of angiosperms using rbcL and non-molecular data sets. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **85**, 137-212.
- NAVICKIENE, H. M. D., ALECIO, A. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. D., YOUNG, M. C. M., CAVALHEIRO, A. J., FURLAN, M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **55**, 621-626.

- NAVICKIENE, H. M. D., BOLZANI, V. D. S., KATO, M. J., PEREIRA, A. M. S., BERTÓNI, B. W., FRANÇA, S. C., FURLAN, M. (2003). Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **14**, 281-284.
- NAVICKIENE, H. M. D., MIRANDA, J. E., BORTOLI, S. A., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., FURLAN, M. (2007). Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: Potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Pest Manage. Sci.* **63**, 399-403.
- NAVICKIENE, H. M. D., MORANDIM, A. D. A., ALÉCIO, A. C., REGASINI, L. O., BERGAMO, D. C. B., TELASCREA, M., CAVALHEIRO, A. J., LOPES, M. N., BOLZANI, V. D. S., FURLAN, M., MARQUES, M. O. M., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. (2006). Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quim. Nova* **29**, 467-470.
- NEGISHI, E., COPERET, C., MA, S., MITA, T., SUGIHARA, T., TOUR, J. M. (1996a). Palladium-catalyzed carbonylative cyclization of 1-iodo-2-alkenylbenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5904-5918.
- NEGISHI, E., KOTORA, M. (1997). Regio- and stereoselective synthesis of γ -alkylidenebutenolides and related compounds. *Tetrahedron* **53**, 6707-6738.
- NEGISHI, E., MA, S., AMANFU, J., COPERET, C., MILLER, J. A., TOUR, J. M. (1996b). Palladium-catalyzed cyclization of 1-iodo-substituted 1,4-, 1,5-, and 1,6-dienes as well as of 5-iodo-1,5-dienes in the presence of carbon monoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5919-5931.
- NEGISHI, E. I., ALIMARDANOV, A., XU, C. (2000). An efficient and stereoselective synthesis of xerulin via Pd-catalyzed cross coupling and lactonization featuring (*E*)-iodobromoethylene as a novel two-carbon synthon. *Org. Lett.* **2**, 65-67.
- NEISH, A. C. (1961). Formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry* **1**, 1-24.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022-1037.
- NIHEI, K.-I., KONNO, K., BERNARDES, L. S. C., LOPES, N. P., ALBUQUERQUE, S., CARVALHO, I. D., PUPO, M. T., MARTINS, R. C. C., KATO, M. J. (2004). Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. *ARKIVOC* **vi**, 112-126.
- NOEL, J. P., AUSTIN, M. B., BOMATI, E. K. (2005). Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 249-253.

- ORJALA, J., MIAN, P., RALI, T., STICHER, O. (1998). Gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper gibbilibum*. *J. Nat. Prod.* **61**, 939-941.
- ORTEGA, M. J., ZUBÍA, E., OCAÑA, J. M., NARANJO, S., SALVA, J. (2000). New rubrolides from the ascidian *Synoicum blochmanni*. *Tetrahedron* **56**, 3963-3967.
- OYEDEJI, O. A., ADENIYI, B. A., AJAYI, O., KONIG, W. A. (2005). Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytother. Res.* **19**, 362-364.
- PALE, P., CHUCHE, J. (1987). Silver assisted heterocyclization of acetylenic compounds. *Tetrahedron Lett.* **28**, 6447-6448.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O. D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**, 597-673.
- PELTER, A., AI-BAYATI, R., HANSEL, R., DINTER, H., BURKE, B. (1981). The structure and synthesis of fadyenolide, a new butemolide from *Piper fadyenii*. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1545-1548.
- PELTER, A., AL-BAYATI, R. I. H., AYOUB, M. T., LEWIS, W., PARDASANI, P., HANSEL, R. (1987). Synthetic routes to the piperolides, fadyenolides, epoxy-piperolides, and related compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 717-742.
- PELTER, A., AYOUB, M. T. (1981). The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of tetronate and 2-pyrone derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1173-1179.
- PETERSEN, M. (2007). Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2847-2860.
- PETTUS, J. A., WING, R. M., SIMS, J. J. (1977). Marine natural products XII: Isolation of a family of multihalogenated γ -methylene lactones from the red seaweed *Delisea fimbriata*. *Tetrahedron Lett.* **18**, 41-44.
- PHILLIPSON, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* **68**, 2960-2972.
- PICHERSKY, E., GANG, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**, 439-445.
- PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. D. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* **25**, 45-61.
- PLEWE, M., SCHMIDT, R. (1989). (\pm)-Erythro- γ,δ -dihydroxycarboxylic acid lactones from a β -lithiopropionate equivalent and α -chloroaldehydes. *Synthesis*, 534-536.
- POHMAKOTR, M., TUCHINDA, P., PREMKAISORN, P., LIMPONGPAN, A., REUTRAKUL, V. (1999). Total synthesis of (*S*)-(+)-melodorinol and (*S*)-(+)-acetylmelodorinol. *Heterocycles* **51**, 795-802.

- POHMAKOTR, M., TUCHINDA, P., PREMKAISORN, P., REUTRAKUL, V. (1998). γ -Regioselectivity of lithiated 2-buten-4-olide towards aromatic aldehydes: a simple synthesis of γ -arylidenebutenolides. *Tetrahedron* **54**, 11297-11304.
- POZAS, R., CARBALLO, J., CASTRO, C., RUBIO, J. (2005). Synthesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 1417-1421.
- PRIM, D., FUSS, A., KIRSCH, G., SILVA, A. M. S. (1999). Synthesis and stereochemistry of β -aryl- β -haloacroleins: Useful intermediates for the preparation of (*Z*) and (*E*)-2-en-4-ynecarbaldehydes and for the synthesis of rubrolides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1175-1180.
- QIU, Y.-L., DOMBROVSKA, O., LEE, J., LI, L., WHITLOCK, B. A., BERNASCONI-QUADRONI, F., REST, J. S., DAVIS, C. C., BORSCH, T., HILU, K. W., RENNER, S. S., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., ZANIS, M. J., CANNONE, J. J., GUTELL, R. R., POWELL, M., SAVOLAINEN, V., CHATROU, L. W., CHASE, M. W. (2005). Phylogenetic Analyses of Basal Angiosperms Based on Nine Plastid, Mitochondrial, and Nuclear Genes. *Int. J. Plant Sci.* **166**, 815-842.
- QIU, Y. L., LEE, J., BERNASCONI-QUADRONI, F., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., ZANIS, M., ZIMMER, E. A., CHEN, Z., SAVOLAINEN, V., CHASE, M. W. (1999). The earliest angiosperms: Evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* **402**, 404-407.
- QIU, Y. L., LEE, J., WHITLOCK, B. A., BERNASCONI-QUADRONI, F., DOMBROVSKA, O. (2001). Was the ANITA rooting of the angiosperm phylogeny affected by long-branch attraction. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1745-1753.
- QUIJANO-ABRIL, M. A., CALLEJAS-POSADA, R., MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *J. Biogeogr.* **33**, 1266-1278.
- RALI, T., WOSSA, S., LEACH, D., WATERMAN, P. (2007). Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. *Molecules* **12**, 389-394.
- RAMIREZ, L. E., LAGES-SILVA, E., PIANETTI, G. M., RABELO, R. M. C., BORDIN, J. O., MORAES-SOUZA, H. (1995). Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi*-infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. *Transfusion* **35**, 226-230.
- RAO, Y. S. (1964). Chemistry of Butenolides. *Chem. Rev.* **64**, 353-388.
- RAO, Y. S. (1976). Recent advances in the chemistry of unsaturated lactones. *Chem. Rev.* **76**, 625-694.

- RAWAT, A. K. S., TRIPATHI, R. D., KHAN, A. J., BALASUBRAHMANYAM, V. R. (1989). Essential oil components as markers for identification of *Piper betle* L. cultivars. *Biochem. Syst. Ecol.* **17**, 35-38.
- 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.
- RO, D.-K., PARADISE, E. M., OUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., HO, K. A., EACHUS, R. A., HAM, T. S., KIRBY, J., CHANG, M. C. Y., WITHERS, S. T., SHIBA, Y., SARPONG, R., KEASLING, J. D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**, 940-943.
- ROSSI, R., BELLINA, F., BIAGETTI, M., MANNINA, L. (1998a). Selective palladium-mediated synthesis of racemic 4,5-disubstituted 5H-furan-2-ones from 3-ynoic acids and organic halides. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7599-7602.
- ROSSI, R., BELLINA, F., BIAGETTI, M., MANNINA, L. (1998b). Stereocontrolled synthesis of lissoclinolide by sequential transition metal-catalyzed lactonization/cross-coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7799-7802.
- ROSSI, R., BELLINA, F., MANNINA, L. (1998c). A novel protocol for the stereoselective synthesis of variously substituted (Z)-5-ylidene-5H-furan-2-ones. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3017-3020.
- ROUSSET, S., ABARBRI, M., THIBONNET, J., DUCHENE, A., PARRAIN, J. L. (1999). (E)-5-(Tributylstannylmethylidene)-5H-furan-2-ones: Versatile synthons for the stereospecific elaboration of γ -alkylidenebutenolide skeletons. *Org. Lett.* **1**, 701-703.
- ROUSSET, S., ABARBRI, M., THIBONNET, J., PARRAIN, J.-L., DUCHÊNE, A. (2003). Regio- and stereoselective preparation of γ -alkylidenebutenolides or α -pyrones using a Stille reaction and palladium-catalysed oxacyclisation sequence. *Tetrahedron Lett.* **44**, 7633-7636.
- ROUSSET, S., THIBONNET, J., ABARBRI, M., DUCHÊNE, A., PARRAIN, J.-L. (2000). Halolactonisation of (2Z,4E)-dienoic acids. A novel approach to γ -alkylidene butenolides. *Synlett*, 260-262.
- SAALFRANK, R. W., SCHIERLING, P., HAFNER, W. (1983). Butenolid-synthesen, II. Einfache synthese von 4-substituierten 2,2-diethoxy-5-alkyliden-2,5-dihydrofuranen, 3-substituierten 4-alkyliden-2-buten-4-oliden bzw. 5,6-dihydro-2-pyronen. *Chem. Ber.* **116**, 3482-3486.
- SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M., BRUNI, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* **91**, 621-632.

- SALAZAR, K. J. M., 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.
- SANTOS, P. R. D. D., MOREIRA, D. D. L., GUIMARÃES, E. F., KAPLAN, M. A. C. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry* **58**, 547-551.
- SARMINI, K., KENNDLER, E. (1997). Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **792**, 3-11.
- SAUQUET, H., DOYLE, J. A., SCHARASCHKIN, T., BORSCH, T., HILU, K. W., CHATROU, L. W., LE THOMAS, A. (2003). Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: Implications for character evolution. *Bot. J. Linnean Soc.* **142**, 125-186.
- SAVOLAINEN, V., CHASE, M. W., HOOT, S. B., MORTON, C. M., SOLTIS, D. E., BAYER, C. (2000a). Phylogenetics of Flowering Plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Syst. Biol.* **49**, 306 - 362.
- SAVOLAINEN, V., FAY, M. F., ALBACH, D. C., BACKLUND, A., VAN DER BANK, M., CAMERON, K. M., JOHNSON, S. A., LLEDO, M. D., PINTAUD, J. C., POWELL, M., SHEAHAN, M. C., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., WESTON, P., WHITTEN, W. M., WURDACK, K. J., CHASE, M. W. (2000b). Phylogeny of the eudicots: A nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences. *Kew Bull.* **55**, 257-309.
- SCHMITT, P., GARRISON, A. W., FREITAG, D., KETTRUP, A. (1997). Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers. *J. Chromatogr. A* **792**, 419-429.
- SCHMUNIS, G. A. (1999). Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America. *Mem. I. Oswaldo Cruz* **94** (Suppl I), 93-101.
- SCHÖNBERG, A., SINA, A. (1946). Molecular rearrangements. Part V. A case of a thermal reversible α -diketone- γ -lactone rearrangement. Some experiments with vulpinic acid and related compounds. *J. Chem. Soc.*, 601-604.
- SCOTT, I., JENSEN, H., PHILOGÈNE, B., ARNASON, J. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem. Rev.* **7**, 65-75.
- SEIFAR, R. M., KRAAK, J. C., KOK, W. T. (1997). Mechanism of electrokinetic separations of hydrophobic compounds with sodium dodecyl sulfate in acetonitrile-water mixtures. *Anal. Chem.* **69**, 2772-2778.
- SEMLER, U., GROSS, G. G. (1988). Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **27**, 1566-1567.
- SEMPLE, K. S. (1974). Pollination in Piperaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **61**, 868-871.

- SENGUPTA, S., RAY, A. B. (1987). The chemistry of *Piper* species: A review. *Fitoterapia* **58**, 147-166.
- SHAW, E. (1946). A synthesis of protoanemonin. The tautomerism of acetylacrylic acid and of penicillic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 2510-2513.
- SHEN, C. C., CHOU, S. C., CHOU, C. J., HO, L. K. (1996). Total synthesis of acetylmelodorinol. *Tetrahedron-Asymmetry* **7**, 3141-3146.
- SHING, T. K. M., TSUI, H.-C., ZHOU, Z.-H. (1995). Enantiospecific syntheses of (+)-goniofufurone, (+)-7-epi-goniofufurone, (+)-goniobutenolide A, (-)-goniobutenolide B, (+)-goniopyprone, (+)-altholactone, (+)-goniotriol, and (+) -7-acetylgoniotriol. *J. Org. Chem.* **60**, 3121-3130.
- SIEGEL, K., BRÜCKNER, R. (1999). First synthesis of xerulin, an inhibitor of the biosynthesis of cholesterol. *Synlett*, 1227-1230.
- SILVA, D. M. M. H., BASTOS, C. N. (2007). Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira* **32**, 143-145.
- SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* **20**, 191-208.
- SILVA, R. V., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., MÉDA, C. I., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**, 521-527.
- SINGH, Y. N. (1992). Kava: An overview. *J. Ethnopharm.* **37**, 13-45.
- SOCRATES, G. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts**. 3rd ed. England: John Wiley & Sons Ltd. 2001. 347 p.
- SOLLADIE, G., HANQUET, G., ROLLAND, C. (1999). Stereoselective sulfoxide directed reduction of 1,2-diketo-derivatives to enantiomerically pure syn and anti 1,2-diols. Correction of the relative configuration by X-ray and chemical correlation to goniobutenolides A and B. *Tetrahedron Lett.* **40**, 177-180.
- SOLTIS, D. E., BELL, C. D., KIM, S., SOLTIS, P. S., 2008. Origin and early evolution of angiosperms. In: Schlichting, C. D., Mousseau, T. A. (Eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1133, pp. 3-25.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., CHASE, M. W., MORT, M. E., ALBACH, D. C., ZANIS, M., SAVOLAINEN, V., HAHN, W. H., HOOT, S. B., FAY, M. F., AXTELL, M., SWENSEN, S. M., PRINCE, L. M., KRESS, W. J., NIXON, K. C., FARRIS, J. S. (2000a). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* **133**, 381-461.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., ENDRESS, P. K. **Phylogeny and evolution of angiosperm**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, v. 1. 2005. 336 p.

- SOLTIS, P. S., SOLTIS, D. E. (2004). The origin and diversification of angiosperms. *Am. J. Bot.* **91**, 1614-1626.
- SOLTIS, P. S., SOLTIS, D. E., ZANIS, M. J., KIM, S. (2000b). Basal lineages of angiosperms: Relationships and implications for floral evolution. *Int. J. Plant Sci.* **161**.
- SORG, A., BRÜCKNER, R. (2004). Total Synthesis of xerulinic acid. *Angew. Chem., Int. Ed.* **43**, 4523-4526.
- SORG, A., SIEGEL, K., BRUCKNER, R. (2004). A novel access to γ -alkylidenebutenolides: Sequential Stille Couplings of dibromomethylenebutenolides. *Synlett*, 321-325.
- SOUSA, P. J. C., BARROS, C. A. L., ROCHA, J. C. S., LIRA, D. S., MONTEIRO, G. M., MAIA, J. G. S. (2008a). Toxicological evaluation of the essential oil of *Piper aduncum* L. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**, 217-221.
- SOUSA, P. J. C., BARROS, C. A. L., ROCHA, J. C. S., LIRA, D. S., MONTEIRO, G. M., MAIA, J. G. S. (2008b). Toxicological evaluation of the essential oil of *Piper aduncum* L. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**, 217-221.
- SOUZA, V. A., SILVA, R., PEREIRA, A. C., ROYO, V. D. A., SARAIVA, J., MONTANHEIRO, M., SOUZA, G. H. B., SILVA FILHO, A. A., GRANDO, M. D., DONATE, P. M., BASTOS, J. K., ALBUQUERQUE, S., E SILVA, M. L. A. (2005). Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 303-307.
- SUGIHARA, T., COPERET, C., OWCZARCZYK, Z., HARRING, L. S., NEGISHI, E.-I. (1994). Deferred carbonylative esterification in the Pd-catalyzed cyclic carbometalation-carbonylation cascade. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7923-7924.
- SUN, G., DILCHER, D. L., ZHENG, S.-L. (2008). A review of recent advances in the study of early angiosperms from northeastern China. *Palaeoworld* **17**, 166-171.
- SURIVET, J.-P., VATÈLE, J.-M. (1996a). Concise total synthesis of (+)-goniofufurone and goniobutenolides A and B. *Tetrahedron Lett.* **37**, 4373-4376.
- SURIVET, J. P., VATÈLE, J. M. (1996b). Concise total synthesis of (+)-goniofufurone and goniobutenolides A and B. *Tetrahedron Lett.* **37**, 4373-4376.
- SURIVET, J. P., VATÈLE, J. M. (1999). Total synthesis of antitumor *Goniothalamus* styryllactones. *Tetrahedron* **55**, 13011-13028.
- SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. (1998). Validation of chromatographic methods. *Pharm. Technol.* **2**, 12-20.
- SZLOSEK, M., FIGADÈRE, B. (2000). Highly enantioselective aldol reaction with 2-trimethylsilyloxyfuran: The first catalytic asymmetric autoinductive aldol reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **39**, 1799-1801.

- TAKHTAJAN, A. (1980). Outline of the classification of flowering plants (magnoliophyta). *The Botanical Review* **46**, 225-359.
- TAKHTAJAN, A. **Diversity and Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. 1997. 620 p.
- TAVARES, M. F. M. (1997). Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova* **20**, 493-511.
- TAYLOR, D. W., HICKEY, L. J. (1992). Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. *Plant Syst. Evol.* **180**, 137-156.
- TEIXEIRA, R. R., BARBOSA, L. C. A., FORLANI, G., PILÓ-VELOSO, D., CARNEIRO, J. W. D. M. (2008). Synthesis of photosynthesis-inhibiting nostoclide analogues. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 2321-2329.
- TEIXEIRA, R. R., BARBOSA, L. C. A., MALTHA, C. R. A., ROCHA, M. E., BEZERRA, D. P., COSTA-LOTUFO, L. V., PESSOA, C., MORAES, M. O. (2007a). Synthesis and cytotoxic activity of some 3-benzyl-5-arylidenefuran-2(5H)- ones. *Molecules* **12**, 1101-1116.
- TEIXEIRA, R. R., BARBOSA, L. C. A., SANTANA, J. O., VELOSO, D. P., ELLENA, J., DORIGUETTO, A. C., DREW, M. G. B., ISMAIL, F. M. D. (2007b). Synthesis and structural characterization of two nostoclide analogues. *J. Mol. Struct.* **837**, 197-205.
- TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T. (1984). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* **56**, 111-113.
- TIAN, K., QI, S., CHENG, Y., CHEN, X., HU, Z. (2005). Separation and determination of lignans from seeds of *Schisandra* species by micellar electrokinetic capillary chromatography using ionic liquid as modifier. *J. Chromatogr. A* **1078**, 181-187.
- TIETZE, L. F., BELL, H. P., SRIVARI CHANDRASEKHAR (2003). Natural product hybrids as new leads for drug discovery. *Angew. Chem. Int. Edit.* **42**, 3996-4028.
- TONIN, F. G., JAGER, A. V., MICKE, G. A., FARAH, J. P. S., TAVARES, M. F. M. (2005). Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **26**, 3387-3396.
- TORRES-SANTOS, E. C., RODRIGUES, J. M., MOREIRA, D. L., KAPLAN, M. A. C., ROSSI-BERGMANN, B. (1999). Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1776-1778.
- TSUI, W.-Y., WILLIAMS, G. A., BROWN, G. D. (1996). A tribenzylbutyrolactone from *Kyrtuthrix maculans*. *Phytochemistry* **43**, 1083-1085.
- UNITED, 2002. The United States Pharmacopeial Convention. p. 2569.

- UOZUMI, Y., MORI, E., MORI, M., SHIBASAKI, M. (1990). Incorporation of molecular nitrogen into organic compounds : IV. Novel lactam synthesis by nitrogenation of enol lactones. *J. Organomet. Chem.* **399**, 93-102.
- VALDIVIA, C., MARQUEZ, N., ERIKSSON, J., VILASECA, A., MUÑOZ, E., STERNER, O. (2008). Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4120-4126.
- VAZ, B., ALVAREZ, R., BRUCKNER, R., DELERA, A. R. (2005). The Stille Reaction in the synthesis of carotenoid butenolides: synthesis of 6'-*epi*-peridinin. *Org. Lett.* **7**, 545-548.
- VELÁZQUEZ, F., OLIVO, H. F. (2002). Synthesis of bicyclic γ -ylidenetetronates. *Org. Lett.* **4**, 3175-3178.
- VERCAMMEN, J., VERLEYSSEN, K., SANDRA, P. (1998). Experiments with organic modifiers in reversed-flow MEKC. *HRC, J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 605-607.
- VERRALL, R. E. (1995). Kinetic studies of alcohol-surfactant mixed micelles. *Chem. Soc. Rev.* **24**, 135-142.
- VICENTE, M. F., BASILIO, A., CABELLO, A., F. PELÁEZ (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 15-32.
- VIEIRA, P. C., ALVARENGA, M. A., GOTTLIEB, O. R., GOTTLIEB, H. E. (1980). 4-Hexadecenylphenol and flavonoids from *Piper hispidum*. *Planta Med.* **39**, 153-156.
- VOGEL, A. I. **Química Orgânica. Análise Orgânica Qualitativa**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S.A., v. 1, 2 e 3. 1988
- VOM-ENDT, D., KIJNE, J. W., MEMELINK, J. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* **61**, 107-114.
- VON BALTHAZAR, M., ENDRESS, P. K. (2002). Development of inflorescences and flowers in Buxaceae and the problem of perianth interpretation. *Int. J. Plant Sci.* **163**, 847-876.
- VON DER OHE, F., BRUCKNER, R. (2000). Stereoselective synthesis of freelingyne and related γ -alkylidenebutenolides via vinylogous Mukaiyama aldol additions. *New J. Chem.* **24**, 659-669.
- VYVYAN, J. R., HOLST, C. L., JOHNSON, A. J., SCHWENK, C. M. (2002). Total Synthesis of Gibbilimbols A - D. *J. Org. Chem.* **67**, 2263-2265.
- 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* **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.
- WASICKY, R. (1963). Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **1**, 77-81.
- WERNER, A., HADACEK, F. (1995). Direct isolation of olefinic and acetylenic 3-alkyl-4-hydroxy-butenolides occurring within the apiaceae. *Phytochem. Anal.* **6**, 218-223.
- WESLEY, S. V., HELLIWELL, C. A., SMITH, N. A., WANG, M., ROUSE, D. T., LIU, Q., GOODING, P. S., SINGH, S. P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P. A., ROBINSON, S. P., GLEAVE, A. P., GREEN, A. G., PETER M. WATERHOUSE (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581-590.
- WINK, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- WINKEL, B. S. J. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 85-107.
- WOODWARD, R. B., SINGH, G. (1949). The structure of patulin. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 758-759.
- WOODWARD, R. B., SLNGH, G. (1950). The synthesis of patulin. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1428.
- WRIGHT, A. D., DENYS, R., ANGERHOFER, C. K., PEZZUTO, J. M., GURRATH, M. (2006). Biological activities and 3D QSAR studies of a series of *Delisea pulchra* (cf. *fimbriata*) derived natural products. *J. Nat. Prod.* **69**, 1180-1187.
- WU, G., SHIMOYAMA, I., NEGISHI, E. (1991). Palladium-catalyzed carbonylative cyclization of o-allylbenzyl halides to produce benzo-annulated enol lactones and/or bicyclo[3.3.0]hept-3-en-6-ones. An efficient route to U-68,215. *J. Org. Chem.* **56**, 6506-6507.
- XU, D., SHARPLESS, K. B. (1994). Synthesis and stereochemical assignments for goniobutenolides A and B. *Tetrahedron Lett.* **35**, 4685-4688.
- XU, H. W., WANG, J. F., LIU, G. Z., HONG, G. F., LIU, H. M. (2007). Facile synthesis of γ -alkylidenebutenolides. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 1247-1250.
- YAMAGUCHI, L. F., LAGO, J. H. G., TANIZAKI, T. M., DI MASCIO, P., KATO, M. J. (2006). Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* **67**, 1838-1843.
- YANG, X., SHIMIZU, Y., STEINER, J. R., CLARDY, J. (1993). Nostoclides I and II, extracellular metabolites from a symbiotic cyanobacterium, *Nostoc* sp., from the lichen *Peltigera canina*. *Tetrahedron Letters* **34**, 761-764.

- ZANA, R. (1995). Aqueous surfactant-alcohol systems: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **57**, 1-64.
- ZANIS, M. J., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., MATHEWS, S., DONOGHUE, M. J. (2002). The root of the angiosperms revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6848-6853.
- ZANIS, M. J., SOLTIS, P. S., QIU, Y. L., ZIMMER, E., SOLTIS, D. E. (2003). Phylogenetic analyses and perianth evolution in basal angiosperms. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **90**, 129-150.
- ZECHNER, L., WOHLMUTH, H. (1954). Anemonin and protoanemonin. I. New method of isolation of anemonin from *Ranunculus acer*. *Scienlia. Pharm.* **22**, 74.
- ZENK, M. H. (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861-3863.
- ZHU, H., KUMAR, A., OZKAN, J., BANDARA, R., DING, A., PERERA, I., STEINBERG, P., KUMAR, N., LAO, W., GRIESSER, S. S., BRITCHER, L., GRIESSER, H. J., WILLCOX, M. D. P. (2008). Fimbrilide-coated antimicrobial lenses: Their in vitro and in vivo effects. *Optom. Vis. Sci.* **85**, 292-300.
- ZOGRAFOS, A., GEORGIADIS, D. (2006). Synthetic strategies towards naturally occurring tetronic acids. *Synthesis*, 3157-3188.

7. SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Alberto de Oliveira

Local de nascimento: Ubá/MG

Data de nascimento: 2 de junho de 1979

Nacionalidade: Brasileiro

Formação

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil

Licenciatura e Bacharelado em Química, 1997-2001

Mestrado em Agroquímica, 2001-2003

Formação complementar

1997 - 1997	Curso de curta duração em Produtos Naturais. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Biofármacos e Fármacos. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Aplicação de RMN na Elucidação de Estruturas Org. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Princípios de RMN. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil
2000 - 2000	Curso de curta duração em RMN - Princípios e Aplicações. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicososa, Brasil
2001 - 2001	Curso de curta duração em Corrosão. Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, Brasil
2001 - 2001	Curso de curta duração em Utilização do Software "WIN-NMR".

	Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
2001 - 2001	Aplicação de RMN em Estudos de Substâncias Húmicas. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicoso, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta duração em Química Forense. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicoso, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Seminário técnico de HPLC e CG. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2005 - 2005	Workshop biotecnologia de plantas e algas. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2005 - 2005	Extensão universitária em Atualização: Proteção Radiológica. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Biosynthesis and biotransformation. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
2006 - 2006	Workshop da Divisão de Produtos Naturais. Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Sao Paulo, Brasil
2008 - 2008	Química de Produtos Naturais no Brasil. Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Sao Paulo, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Princípios de Organocatálise. Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Sao Paulo, Brasil

Ocupação

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Doutorado em Química Orgânica, 2004-atual

Profissão: Pesquisador

Empresa: SupraNano Tecnologia, Indústria e Comércio Ltda, 2008-atual.

Atuação profissional

- Participação do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, como estagiário/bolsista na disciplina QFL314 – Química Orgânica Experimental VII, no 1º semestre de 2006.

- Participação do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, como estagiário/bolsista na disciplina QFL342 – Química Orgânica II, no 2º semestre de 2006.

- Participação do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, como estagiário/bolsista na disciplina QFL3101 – Introdução às Transformações Químicas, no 1º semestre de 2007.

- Participação do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, como estagiário/bolsista na disciplina QFL6052 – Química Geral, no 2º semestre de 2007.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LAGO, J. H. G., OLIVEIRA, A., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. 3-Ishwarone and 3-Ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* Hensch. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**, 638 - 642, 2007.

2. BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., ALVARENGA, E. S., OLIVEIRA, A., KING-DIAS, B., LOTINA-HENNSEN, B. Phytogrowth- and photosynthesis-inhibiting properties of nostoclides analogues. *Pest Management Science* **62**, 214 - 222, 2006.
3. MARQUES, J. V., OLIVEIRA, A., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. Antifungal piperolides, coumarins, pyrones and amides from *Piper* species and synthetic analogs. In: 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF, Atenas. *Planta Med. Stuttgart: Thieme* **74**, 1169 – 1169, 2008.
4. LAGO, J. H. G., CHEN, A, YOUNG, M. C. M., GUIMARÃES, E. F., OLIVEIRA, A, KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae) (trabalho submetido).
5. OLIVEIRA, A., SILVA, C. A., SILVA, A. M., TAVARES, M. F. M., KATO, M. J. Development and Validation of Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) Method for the Quantitative Determination of Butenolides in *Piper malacophyllum*. 2008 (trabalho submetido).

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, A., MARQUES, J. V., MURAKAMI, C., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. Atividade antifúngica de análogos sintéticos de piperolídeos e de cumarinas e pironas naturais In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **Do Petróleo à Biomassa**, 2008.
2. OLIVEIRA, A., SILVA, C. A., SILVA, A. M., TAVARES, M. F. M., KATO, M. J. Development and validation of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method for the quantitative determination of butenolides in *Piper malacophyllum* In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro. **Recent Advances on Natural Products, covering all the latest and outstanding developments in the area. Tribute to Prof. Otto R. Gottlieb**, 2007.
3. OLIVEIRA, A., SALAZAR, K. J. M., KATO, M. J. Estudo biossintético de alquenilbenzenos em folhas de *Piper malacophyllum* In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia - SP. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.
4. OLIVEIRA, A., SILVA, A. M., LAGO, J. H. G., KATO, M. J. Phytochemical study of *Piper malacophyllum* (PIPERACEAE) In: 1st Brazilian Conference on Natural

Products, 2007, São Pedro.

Recent Advances on Natural Products, covering all the latest and outstanding developments in the area. Tribute to Prof. Otto R. Gottlieb, 2007.

5. OLIVEIRA, A., SILVA, A. M., LAGO, J. H. G., KATO, M. J.

Alquilbenzenos e sesquiterpenos das folhas de *Piper malcophyllum* In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindoia - SP.

Química é Energia, 2006.

6. MARQUES, J. V., OLIVEIRA, A., RAGGI, L., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J.

Atividade de amidas isoladas de *P. scutifolium* e análogos sintéticos In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindoia - SP.

Química é Energia, 2006.

7. LAGO, J. H. G., OLIVEIRA, A., KATO, M. J.

Sesquiterpenos do óleo volátil das folhas de *Peperomia oreophylla* In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindoia - SP.

Química é Energia, 2006.

8. SILVA, A. M., OLIVEIRA, A., KATO, M. J.

Caracterização de ligninas de *Piper solmsianum* por tioacidólise e CG-EM In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG.

Química para o Desenvolvimento Sustentável e Inclusão social, 2005.

9. SILVA, A. M., OLIVEIRA, A., KATO, M. J.

Lignanas de *Piper richardifolium* Kunth In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG.

Química para o Desenvolvimento Sustentável e Inclusão social. , 2005. v.u.

10. OLIVEIRA, A., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. A., SILVA, A. A.

Síntese de compostos análogos ao nostoclídeo potencialmente herbicidas. In: 26ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2003, Poços de Calda.

A química torna sua vida melhor, 2003.

11. OLIVEIRA, A., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. A., SILVA, A. A.

Síntese de gama-arilidenobutenolídeos análogos ao nostoclídeo com potencial atividade herbicida. In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2003, Ouro Preto.

Química: conservação e meio ambiente, 2003.

12. PASTRE, J. C., OLIVEIRA, A., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. A., SANTOS, M. A.

Síntese de Novos Carbamatos Derivados da Piperazina. In: X SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2000, Viçosa.

A Ciência e o Desenvolvimento Tecnológico Nacional, 2000.

13. OLIVEIRA, A., CHINELATTO JÚNIOR, L. S., DALVI, L. C., CLEMENTE, A. D., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. A., SANTOS, M. A.

Novos Derivados da Piperazina com Potencial Atividade Nematicida. In: XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 1999, São João del Rei.

O Profissional da Química no Terceiro Milênio, 1999.

14. OLIVEIRA, A., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. A., SANTOS, M. A.

Sínteses de Novas Amidas Derivadas da Piperazina com Potencial Atividade Nematicida. In: IX SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1999, Viçosa.

A Ciência e a Realidade Nacional, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)