

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**JULIANA BELTRAME REIGADA**

**Bioprospecção em espécies de Piperaceae**

São Paulo

Data de depósito na SPG:

26/05/2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA BELTRAME REIGADA

**Bioprospecção em espécies de Piperaceae**

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

*Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato*

São Paulo

2009

Juliana Beltrame Reigada  
Bioprospecção em espécies de Piperaceae

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

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*A meus pais Sueli e Rutter - meu alicerce*

*A minha irmã Leticia - companheira de todas as horas*

*A José Otavio - meu mais que amigo*

*Por todo amor e compreensão que compartilho com vocês todos os dias.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica, e pelos grandes ensinamentos.

Ao professor e amigo João Henrique Lago, por toda ajuda, paciência e atenção desde meu início na iniciação científica até a conclusão desta dissertação.

À Dra. Maria Cláudia Young, do Instituto de Botânica, pela ajuda nos ensaios de bioautografia.

Aos professores André Porto e Leandro Andrade, pela ajuda durante a pesquisa e nos experimentos realizados em seus laboratórios.

Aos meus novos e veteranos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Adalberto, Alberto, Joca, Homero, Mariko, Hiléia, Renata, Marisi, Karina, Clécio, Giovana, Edgard, Camila, Lydia, Ari, Aline, Anderson, Felipe, Lucas e Letícia, por todo apoio, convívio e amizade durante todos esses anos.

Aos meus grandes amigos Tânia e Vina, pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, por toda ajuda desde a graduação até as atividades de monitoria na pós-graduação.

Aos funcionários da Central Analítica do IQ-USP, pela ajuda na obtenção dos espectros e cromatogramas.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IQ-USP, pela atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de Mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Reigada, J. B. **Bioprospecção em espécies de Piperaceae**. 2009. 132p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O presente trabalho visou a avaliação do potencial antifúngico de extratos brutos das diferentes partes do vegetal (folha, caule e raiz) de espécies de Piperaceae, os quais foram submetidos ao ensaio de bioautografia frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Após a triagem biológica, os extratos brutos das espécies *Piper mollicomum*, *Piper marginatum*, *Peperomia alata* e *Peperomia glabella* foram selecionados para etapas posteriores de fracionamento e purificação, utilizando-se técnicas cromatográficas. O estudo fitoquímico biomonitorado das espécies selecionadas identificou como metabólitos ativos dois cromenos e uma di-hidrochalcona; duas flavanonas e três fenilpropanóides, sendo um de estrutura inédita, denominado marginatumol; dois policetídeos inéditos, alatanona A e alatanona B; quatro acilresorcínóis e quatro secolignanas, incluindo a peperomina G inédita. Todos os metabólitos isolados apresentaram potencial atividade antifúngica, sendo os policetídeos alatanona A e alatanona B os mais ativos, com atividade superior às substâncias controle (nistatina e miconazol). Assim, os dados obtidos neste estudo permitiram descrever diferentes classes de produtos naturais a partir de uma coleção de extratos de espécies de Piperaceae, com potencial para estudos de relações estrutura-atividade.

**Palavras-chave:** Piperaceae, *Piper mollicomum*, *Piper marginatum*, *Peperomia alata*, *Peperomia glabella*, atividade antifúngica.

## ABSTRACT

Reigada, J. B. **Bioprospecting of Piperaceae species**. 2009. 132p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present study was addressed to evaluate the antifungal activity of crude extracts from Piperaceae species in which different parts of the plant (leaves, stems and roots) were assessed by means of bioautography against *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium sphaerospermum*. After antifungal assay, the extracts from *Piper mollicomum*, *Piper marginatum*, *Peperomia alata* and *Peperomia glabella* displayed higher growth inhibitory potency and thus were selected for further fractionation and purification using chromatographic techniques. Such dereplication using the bioautographic assay yielded two chromenes and one dihydrochalcone; two flavanones and three phenylpropanoids, including the novel compound marginatumol; two new polyketides, alatanone A and alatanone B; four acylresorcinols and four secolignans, including the novel peperomin G, respectively. The bioautography indicated potential antifungal activity for all isolated metabolites and compounds alatanone A and alatanone B were found the most active in comparison to positive controls (nystatin and miconazole). The bioprospecting approach was proven to be very effective when the isolation of bioactive compounds from a collection of crude extracts is concerned, although not necessarily unraveling the major biosynthetic pathways in each plant species.

**Keywords:** Piperaceae, *Piper mollicomum*, *Piper marginatum*, *Peperomia alata*, *Peperomia glabella*, antifungal activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Abordagem atual de pesquisas voltadas para a bioprospecção de novos fármacos.....	16
<b>Figura 2.</b> Estrutura da piperina encontrada nos frutos de <i>Piper nigrum</i> .....	18
<b>Figura 3.</b> Porcentagem de ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies de <i>Piper</i> . ....	18
<b>Figura 4.</b> <i>Piper mollicomum</i> Kunth. ....	19
<b>Figura 5.</b> <i>Piper marginatum</i> Jacq. ....	21
<b>Figura 6.</b> <i>Peperomia alata</i> Ruiz & Pav. ....	25
<b>Figura 7.</b> <i>Peperomia glabella</i> (Sw.) A. Dietr. ....	26
<b>Figura 8.</b> Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de <i>Piper</i> . ....	28
<b>Figura 9.</b> Cromenos e derivados de ácidos benzóicos com atividade biológica isolados de espécies de <i>Piper</i> . ....	29
<b>Figura 10.</b> Derivados policetídicos com atividade biológica isolados de espécies de <i>Peperomia</i> . ....	30
<b>Figura 11.</b> Diagrama ilustrativo da bioautografia com esporos dos fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> . ....	38
<b>Figura 12.</b> Exemplos de placas cromatográficas da bioautografia de extratos brutos com esporos dos fungos: (a) <i>C. cladosporioides</i> e (b) <i>C. sphaerospermum</i> . ....	39
<b>Figura 13.</b> Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de <i>Piper mollicomum</i> . ....	42
<b>Figura 14.</b> Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Piper mollicomum</i> . ....	42
<b>Figura 15.</b> Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de <i>Piper marginatum</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Piper marginatum</i> . ....	45
<b>Figura 17.</b> Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de <i>Peperomia alata</i> . ....	47
<b>Figura 18.</b> Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Peperomia alata</i> . ....	48
<b>Figura 19.</b> Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de <i>Peperomia glabella</i> .....	51
<b>Figura 20.</b> Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Peperomia glabella</i> .....	52
<b>Figura 21.</b> Estruturas dos cromenos isolados das folhas de <i>Piper mollicomum</i> . ....	62

<b>Figura 22.</b> Estrutura da di-hidrochalcona <b>3</b> isolada das folhas de <i>Piper mollicomum</i> .....	63
<b>Figura 23.</b> Estruturas das flavanonas <b>7</b> e <b>8</b> isoladas das folhas de <i>Piper marginatum</i> .....	65
<b>Figura 24.</b> Estruturas das propiofenonas <b>4</b> e <b>5</b> isoladas das folhas de <i>Piper marginatum</i> .....	67
<b>Figura 25.</b> Estrutura de <b>6</b> isolado das folhas de <i>Piper marginatum</i> .....	69
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>6</b> (300 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ ).....	70
<b>Figura 27.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>6</b> (300 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ ).....	71
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>6</b> (75 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ ).....	72
<b>Figura 29.</b> Espectro no IV (KBr) de <b>6</b> .....	73
<b>Figura 30.</b> Espectro de massas de <b>6</b> (IE, baixa resolução).....	73
<b>Figura 31.</b> Desidratação intermolecular de <b>6</b> gerando <b>6a</b> .....	75
<b>Figura 32.</b> Espectro de massas do derivado <b>6a</b> (IE, baixa resolução).....	76
<b>Figura 33.</b> Preparação de (RS)- <b>6b</b> através da reação de Grignard.....	76
<b>Figura 34.</b> Resolução cinética de (RS)- <b>6b</b> catalisada por enzima e hidrólise de (R)-acetato <b>6b</b> a (R)-álcool <b>6b</b> .....	78
<b>Figura 35.</b> (a) Cromatograma de CG em fase quiral de (RS)- <b>6b</b> ; (b) Cromatograma de CG em fase quiral do produto natural <b>6</b> isolado de <i>Piper marginatum</i> .....	78
<b>Figura 36.</b> Estrutura do policetídeo <b>9</b> isolado das folhas de <i>Peperomia alata</i> .....	80
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	82
<b>Figura 38.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	83
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>9</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	84
<b>Figura 40.</b> Espectro DQF-COSY de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	85
<b>Figura 41.</b> Espectro HMQC de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	86
<b>Figura 42.</b> Correlações HMBC observadas para <b>9</b> .....	86
<b>Figura 43.</b> Espectro HMBC de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	87
<b>Figura 44.</b> Ampliação (a) do espectro HMBC de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	87
<b>Figura 45.</b> Ampliação (b) do espectro HMBC de <b>9</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	88
<b>Figura 46.</b> Espectro no IV (KBr) de <b>9</b> ( $\text{cm}^{-1}$ ).....	88
<b>Figura 47.</b> Espectros de massas de <b>9</b> : (a) IE, baixa resolução; (b) ES, alta resolução.....	89

<b>Figura 48.</b> Principais fragmentações observadas no espectro de massas (IE) de <b>9</b> .....	89
<b>Figura 49.</b> Estrutura do policetídeo <b>10</b> isolado das folhas de <i>Peperomia alata</i> . .....	91
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	92
<b>Figura 51.</b> Ampliação (a) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	93
<b>Figura 52.</b> Ampliação (b) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	94
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>10</b> (75 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	95
<b>Figura 54.</b> Espectro DQF-COSY de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	96
<b>Figura 55.</b> Espectro HMQC de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	97
<b>Figura 56.</b> Correlações HMBC observadas para <b>10</b> .....	97
<b>Figura 57.</b> Espectro HMBC de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	98
<b>Figura 58.</b> Ampliação (a) do espectro HMBC de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ). .....	99
<b>Figura 59.</b> Ampliação (b) do espectro HMBC de <b>10</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ). .....	99
<b>Figura 60.</b> Espectro no IV (KBr) de <b>10</b> (cm <sup>-1</sup> ).....	100
<b>Figura 61.</b> Espectros de massas de <b>10</b> : (a) IE, baixa resolução; (b) ES, alta resolução.....	100
<b>Figura 62.</b> Principal fragmentação observada no espectro de massas (IE) de <b>10</b> .....	101
<b>Figura 63.</b> Estruturas dos acilresorcinóis <b>11</b> – <b>14</b> isolados de <i>Peperomia glabella</i> . .....	103
<b>Figura 64.</b> Espectros de massas (IE) dos acilresorcinois <b>11</b> - <b>14</b> .....	104
<b>Figura 65.</b> Estruturas das secolignananas <b>15</b> - <b>18</b> isoladas das folhas de <i>Peperomia glabella</i> . .....	107
<b>Figura 66.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>16</b> (500 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	109
<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>16</b> (125 MHz, CDCℓ <sub>3</sub> ).....	110
<b>Figura 68.</b> Espectro no IV (KBr) de <b>16</b> (cm <sup>-1</sup> ).....	111
<b>Figura 69.</b> Espectros de massas (IE) de <b>15</b> (a) e <b>16</b> (b).....	111
<b>Figura 70.</b> Placas dos ensaios de limite de detecção dos metabólitos isolados de <i>Peperomia alata</i> ( <b>9</b> e <b>10</b> ) e da substância controle nistatina.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Metabólitos secundários isolados em estudos anteriores realizados com <i>Piper marginatum</i> .....	21
<b>Tabela 2.</b> Metabólitos secundários isolados em estudos anteriores realizados com <i>Peperomia glabella</i> .....	26
<b>Tabela 3.</b> Espécies de <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> e seus metabólitos acumulados, isolados através de estudos fitoquímicos biomonitorados. ....	27
<b>Tabela 4.</b> Metabólitos secundários isolados das espécies de <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> estudadas por fracionamento biomonitorado.....	53
<b>Tabela 5.</b> Parte ampliada do banco de extratos do LQPN: dados sobre espécie, parte da planta utilizada, solvente de extração e potencial biológico.....	57
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>1</b> e <b>2</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	62
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>3</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	64
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) de <b>7</b> e <b>8</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	65
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>4</b> e <b>5</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	68
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>6</b> ( $\delta$ ppm, $\text{C}_6\text{D}_6$ ).....	71
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) <b>6</b> e <b>6a</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	75
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>9</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	81
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>10</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	91
<b>Tabela 14.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) dos acilresorcinois <b>11 - 14</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ). ....	103
<b>Tabela 15.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>15</b> e <b>16</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	108
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>17</b> e <b>18</b> ( $\delta$ ppm, $\text{CDCl}_3$ ).....	108
<b>Tabela 17.</b> Atividade antifúngica dos produtos naturais isolados <b>1 a 18</b> , e dos compostos padrão nistatina e miconazol, frente a <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> . ....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\varnothing$	Diâmetro
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDC $\ell_3$	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COSY	Correlation spectroscopy – espectroscopia de correlação
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dt	Duplo tripleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer – intensificação da distorção por transferência de polarização
DQF-COSY	Double quantum filtered-COSY – filtro duplo-quântico
EM	Espectrometria de massas
ES	Elétron spray
Hex	Hexano
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation – correlação heteronuclear múltiplo-quântica
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence – coerência heteronuclear através de muitas ligações
IE	Impacto eletrônico
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
mult.	Multiplicidade
m	Multiplete
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
q	Quarteto
quint	Quinteto
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono
s	Singleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
(v:v)	Relação volume:volume

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1. A família Piperaceae .....	17
1.2. O gênero <i>Piper</i> .....	17
1.2.1. <i>Piper mollicomum</i> Kunth.....	19
1.2.2. <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	20
1.3. O gênero <i>Peperomia</i> .....	24
1.3.1. <i>Peperomia alata</i> Ruiz & Pav.....	25
1.3.2. <i>Peperomia glabella</i> (Sw.) A. Dietr. ....	25
1.4. Potencial biológico de espécies de Piperaceae.....	27
1.4.1. Atividade antifúngica.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. Instrumentação.....	33
3.2. Materiais cromatográficos .....	34
3.3. Solventes e reagentes.....	35
3.4. Material vegetal .....	35
3.5. Obtenção dos extratos .....	35
3.6. Análise dos extratos .....	36
3.7. Ensaio de bioautografia com fungos .....	36
3.8. Fracionamento biomonitorado dos extratos.....	40
3.8.1. Fracionamento do extrato de <i>Piper mollicomum</i> .....	40
3.8.2. Fracionamento do extrato de <i>Piper marginatum</i> .....	43
3.8.3. Fracionamento do extrato de <i>Peperomia alata</i> .....	46
3.8.4. Fracionamento do extrato de <i>Peperomia glabella</i> .....	49
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1. Prospecção de atividade antifúngica nos extratos de <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> ...	56
4.2. Elucidação e identificação estrutural dos produtos naturais isolados .....	60
4.2.1. Cromenos .....	60
4.2.2. Di-hidrochalcona.....	63
4.2.3. Flavanonas .....	64

4.2.4. Fenilpropanóides .....	66
4.2.4.1. Determinação da configuração absoluta do marginatumol ...	74
4.2.5. Derivados policetídicos.....	79
4.2.6. Acilresorcinóis.....	101
4.2.7. Secolignanas .....	105
4.3. Atividade antifúngica .....	112
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>118</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>SÚMULA CURRICULAR .....</b>	<b>130</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Substâncias de origem vegetal têm sido utilizadas, desde o desenvolvimento das primeiras civilizações, para o tratamento de diferentes males, sendo que uma das maiores fontes desses medicamentos provém de plantas superiores (Montanari e Bolzani, 2001; Newman e Cragg, 2007).

O metabolismo primário dos vegetais origina diversos produtos extremamente importantes, como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos graxos, aminoácidos e açúcares, considerados essenciais para a manutenção das células. O metabolismo secundário, processo pelo qual produtos naturais são originados, envolve um grande conjunto de reações tanto de síntese quanto de catabolismo, que são frequentemente mediadas por enzimas com elevada especificidade (Luckner, 1990).

Os metabólitos secundários são produzidos a partir de intermediários-chave provenientes do metabolismo primário, destacando-se o acetato, piruvato, alguns açúcares (por exemplo, eritrose e fosfato de metil eritriol), aminoácidos, entre outros. Os metabólitos secundários assim originados têm sido prioritariamente classificados de acordo com as vias biossintéticas, mas podem ser agrupados em policetídeos, alcalóides, compostos fenólicos e isoprenóides (Mann, 1994).

Segundo Demain e Fang (2000), os metabólitos secundários exercem funções de sobrevivência nos organismos que os produzem, servindo como agentes de defesa (contra herbívoros, insetos, bactérias e fungos), agentes químicos (na simbiose entre plantas e micróbios, insetos ou animais de grande porte), agentes protetores ou hormônios sexuais, e atrativos para polinizadores.

Além dessas funções fundamentais para o desenvolvimento das espécies vegetais, os metabólitos secundários também têm sido amplamente utilizados pelo



homem para outros fins, sendo extraídos e utilizados como corantes, perfumes, inseticidas e principalmente fármacos (Balandrin *et al.*, 1985).

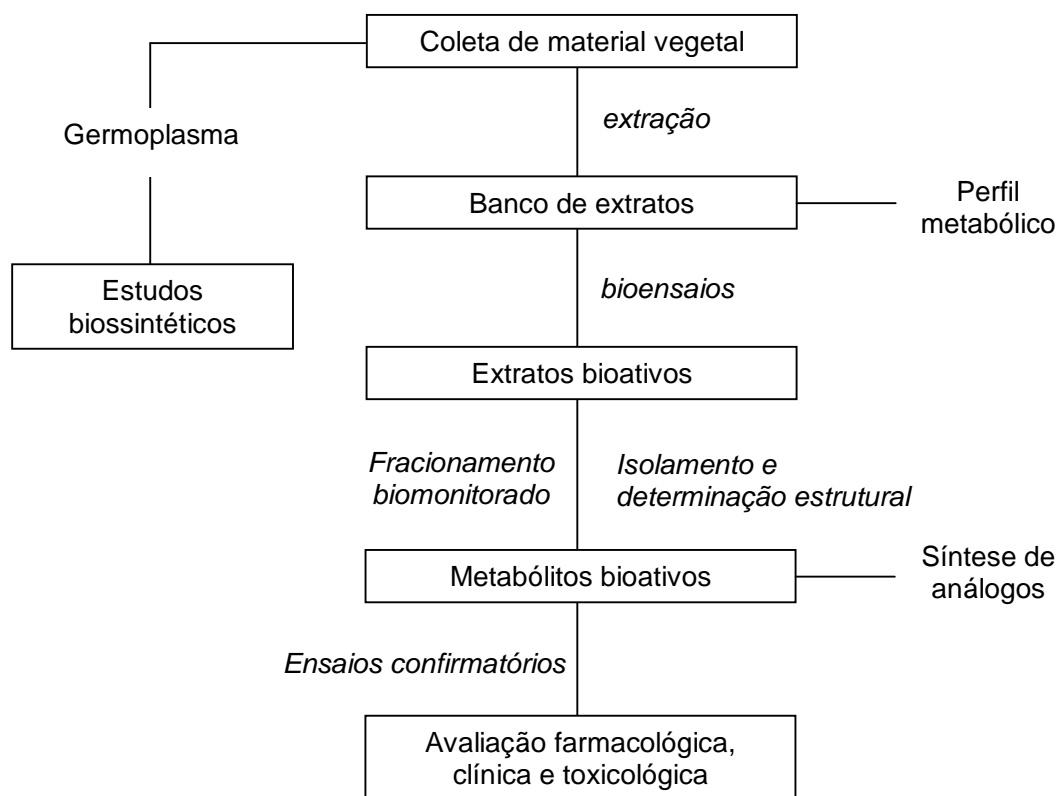
Até recentemente, a maioria dos trabalhos na área de química de produtos naturais no país esteve mais voltada para os estudos de isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários do que para a avaliação do potencial biológico dos produtos naturais identificados. Atualmente, a busca de princípios ativos de plantas através de estudos fitoquímicos biomonitorados tem se constituído em uma alternativa para a pesquisa em espécies vegetais, com o desenvolvimento de bioensaios simples e rápidos, facilmente executados em laboratórios de fitoquímica (Montanari e Bolzani, 2001). A mudança de enfoque é notória quando se observam os requisitos impostos pelos principais periódicos da área, nos quais não somente o ineditismo estrutural é considerado, mas também os aspectos biossintéticos ou de atividade biológica. A perspectiva unificadora entre a química e a biologia tende a constituir-se numa tendência cada vez mais presente na compreensão dos sistemas biológicos, especificamente das vias biossintéticas, e também na busca de produtos biologicamente ativos (Poulter, 2009).

A pesquisa em produtos naturais no Brasil tem sido uma das áreas mais tradicionais da química devido à grande biodiversidade do país. O potencial para os estudos de bioprospecção é imenso e seria um caminho excelente para agregar valor às espécies vegetais nativas, buscando contribuir com as propostas de preservação e de uso sustentável de reservas biológicas.

Dentro desse contexto, as atividades de pesquisas no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química na Universidade de São Paulo (LQPN IQ-USP) envolvem a bioprospecção e estudos biossintéticos e filogenéticos. A primeira abrange o estudo de diversas espécies de Piperaceae coletadas em

diferentes regiões da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, e encontra-se inserida no projeto temático *Conservation and Sustainable use of the Plant Diversity from Cerrado and Atlantic Forrest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs* (BIOTA-FAPESP), coordenado pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani (IQ-UNESP – Araraquara); a segunda envolve o estudo filogenético, através do uso de marcadores moleculares, visando determinar possíveis correlações com o perfil de metabólitos secundários.

A Figura 1 ilustra a abordagem atual para o desenvolvimento das pesquisas em química de produtos naturais, voltadas para a determinação de novos metabólitos secundários bioativos, e assim, produção de novos fármacos.



**Figura 1.** Abordagem atual de pesquisas voltadas para a bioprospecção de novos fármacos.

## 1.1. A família Piperaceae

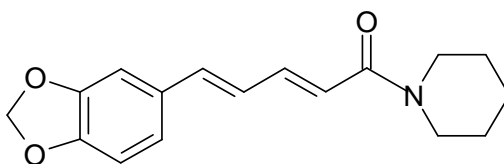
A família Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, constitui-se em uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas (Wanke *et al.*, 2007) e por possuir metabolismo secundário peculiar, conduz à formação de diversos metabólitos secundários, muitos dos quais biologicamente ativos.

Esta família compreende atualmente quatro gêneros, *Piper*, *Peperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia* (Kato e Furlan, 2007), sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais representativos, com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente (Quijano-Abril *et al.*, 2006; Wanke *et al.*, 2006).

As espécies representantes da família Piperaceae são plantas herbáceas, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas, e estão distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios (Kato e Furlan, 2007). No Brasil, ocorrem cerca de 450 espécies da família Piperaceae, sendo 265 espécies de *Piper* e 166 de *Peperomia* (Yuncker, 1972, 1973, 1974).

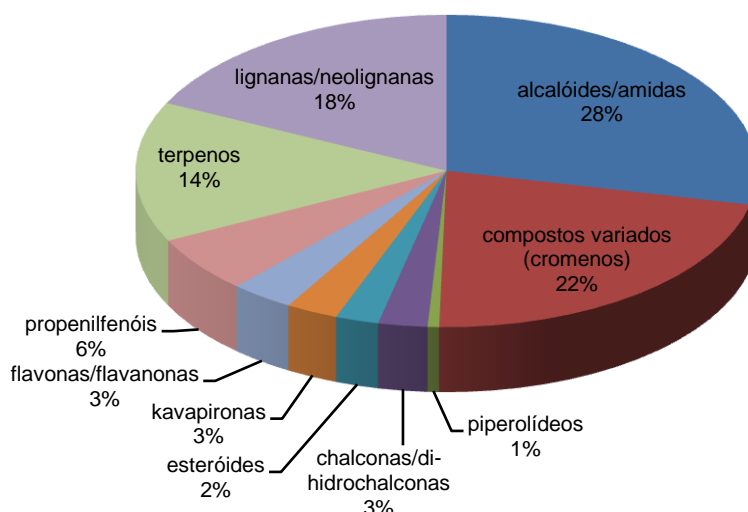
## 1.2. O gênero *Piper*

Dentre os gêneros que compreendem a família Piperaceae, o gênero *Piper* apresenta o maior potencial econômico e comercial. A espécie mais conhecida comercialmente é a *Piper nigrum*, cujos frutos são fonte natural da pimenta-do-reino, utilizada como especiaria na culinária mundial (Srinivasan, 2007). O princípio pungente da pimenta-do-reino, também conhecida como pimenta verde, pimenta branca ou pimenta preta, deve-se à presença de derivados da piperina (Figura 2), uma amida piperidínica encontrada nos frutos desta espécie (Siddiqui *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Estrutura da piperina encontrada nos frutos de *Piper nigrum*.

Apesar do grande número de espécies pertencentes ao gênero *Piper* (aproximadamente 2000), somente 112 foram investigadas fitoquimicamente, revelando a presença de 667 metabólitos secundários diferentes, distribuídos em classes conforme ilustra a Figura 3 (Dyer e Palmer, 2004).



**Figura 3.** Porcentagem de ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Piper*.

Conforme observado, o perfil fitoquímico das espécies de *Piper* apresenta-se muito diversificado, sendo isolados compostos pertencentes às mais diferentes classes de metabólitos secundários (Parmar *et al.*, 1997). O número de metabólitos isolados pertencentes à classe dos alcalóides e amidas são os mais representativos da espécie (Parmar *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2007), seguido de lignanas e neolignanas (Benevides *et al.*, 1999), terpenos (Martins *et al.*,

1998), propenilfenóis (Ramos *et al.*, 1986), pironas (Smith *et al.*, 1983), cromenos e derivados de ácidos benzóicos (Terreaux *et al.*, 1998; Baldoqui *et al.*, 1999; Lago *et al.*, 2004).

Neste trabalho, duas espécies do gênero *Piper* foram selecionadas para serem submetidas a fracionamento químico biomonitorado, a partir da análise do potencial fungitóxico de seus extratos brutos: *Piper mollicomum* e *Piper marginatum*.

### 1.2.1. *Piper mollicomum* Kunth.

Conhecida como jaborandi-manso ou simplesmente jaborandi, a espécie *Piper mollicomum* é um arbusto pequeno, de 1,0 a 1,5 m de altura, encontrada no Brasil nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso e Goiás (Guimarães e Giordano, 2004). Na medicina popular, os frutos de *Piper mollicomum* são utilizados para tratamento de problemas estomacais e suas raízes, quando mastigadas, são úteis para anestesiarem dores de dente (Guimarães e Giordano, 2004).



Foto: M. J. Kato

**Figura 4.** *Piper mollicomum* Kunth.

Nenhum estudo fitoquímico foi encontrado para *Piper mollicomum*, com exceção da composição do óleo essencial de suas folhas (Santos *et al.*, 2001).

### **1.2.2. *Piper marginatum* Jacq.**

A espécie *Piper marginatum*, variedade *Piper marginatum* Jacq., é encontrada na América do Sul, América Central e Antilhas. No Brasil, os arbustos com até 5,0 m de altura são encontrados nos estados do Amazonas, Pará, Ceará, Paraíba e Pernambuco (Guimarães e Giordano, 2004).

Na região amazônica, a espécie é popularmente conhecida como malvaíско, caapeba-cheirosa, nhandi, pimenta-do-mato e pimenta-dos-índios, e é utilizada sob a forma de chá com ação anti-espasmódica, no tratamento de doenças do fígado e baço (Pio-Corrêa, 1984; Guimarães e Giordano, 2004). Segundo os índios tenharins, a planta, conhecida por eles como nhambuí, é tóxica se ingerida. A raiz amassada é usada externamente para o alívio da dor e coceira causadas por picada de insetos, e também contra mordeduras de cobras. No Ceará, onde é conhecida como capeba-mansa, os frutos são utilizados como substituintes da pimenta-do-reino (Guimarães e Giordano, 2004).

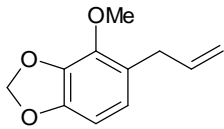
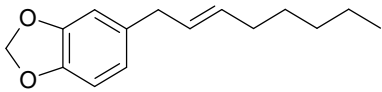
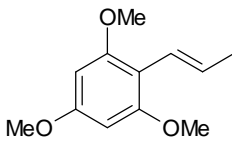
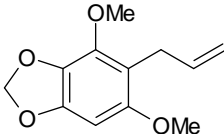
Estudos fitoquímicos previamente realizados em raízes, caules, folhas e frutos de *Piper marginatum* (Tabela 1) descrevem a ocorrência de propiofenonas, amidas, flavonóides, fenil-alcalóides e aristolactamas, além da composição química do óleo essencial das folhas (Ramos *et al.*, 1986; Andrade *et al.*, 2008).

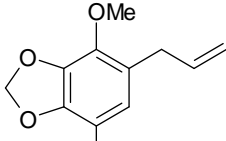
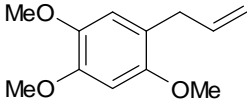
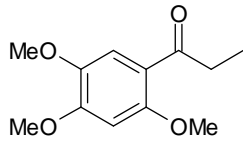
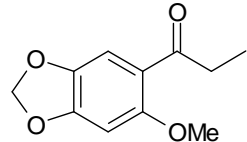
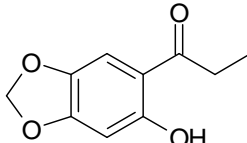
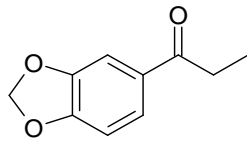
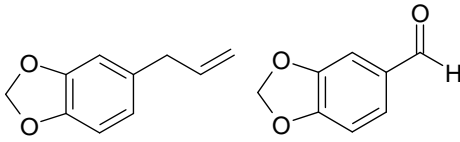
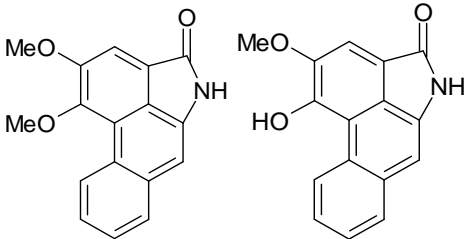


Foto: M. J. Kato

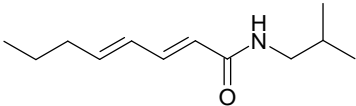
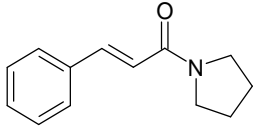
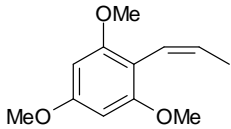
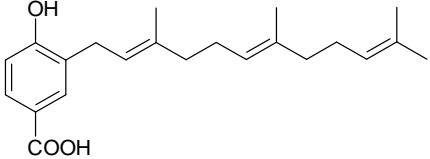
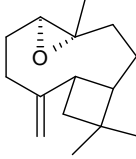
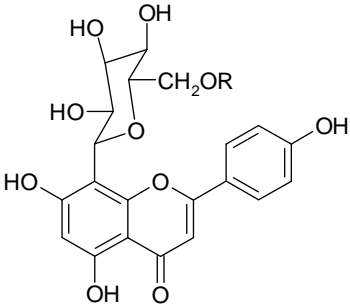
**Figura 5.** *Piper marginatum* Jacq.

**Tabela 1.** Metabólitos secundários isolados em estudos anteriores realizados com *Piper marginatum*.

Estrutura	Parte da planta	Referência
 1-álil-2-metóxi-3,4-metilenodioxibenzeno croweacin	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1997
 3,4-metilenodioxo-1-(2E-octenil)-benzeno marginatina	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1998
 1-(1E-propenil)-2,4,6-trimetoxibenzeno pipermarginina	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1998
 2,6-dimetóxi-3,4-metilenodioxo-1-(2-propenil)-benzeno	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1998

Estrutura	Parte da planta	Referência
 apiole	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1998
 isoasarone	Raízes	Santos <i>et al.</i> , 1998
 2,4,5-trimetoxipropiofenona	Raízes	Santos e Chaves, 1999
 2-metóxi-4,5-metilenodioxipropiofenona	Folhas	De Diaz e Gottlieb, 1979
 2-hidróxi-4,5-metilenodioxipropiofenona	Folhas	De Diaz e Gottlieb, 1979
 3,4-metilenodioxipropiofenona	Folhas	De Diaz e Gottlieb, 1979
 safrol e piperonal	Folhas	De Diaz e Gottlieb, 1979
 cepharanone B e piperolactama A	Planta inteira	Chaves <i>et al.</i> , 2006



Estrutura	Parte da planta	Referência
 <p>(<i>E,E</i>)-<i>N</i>-isobutil-2,4-octadienoamida</p>	Raízes	Santos e Chaves, 1999a
 <p>1-cinamoil pirrolidina</p>	Caules	Chaves <i>et al.</i> , 2003
 <p>1-(1-<i>Z</i>-propenil)-2,4,6-trimetoxibenzeno</p>	Frutos	Chaves e Santos, 2002
 <p>ácido 3-farnesil-4-hidróxibenzóico</p>	Frutos	Chaves e Santos, 2002
 <p>óxido de cariofileno</p>	Frutos	Chaves e Santos, 2002
 <p>vitexina R = H marginatosideo R = β-gentiobiosila</p>	Folhas	(Tillequin <i>et al.</i> , 1978)

### 1.3. O gênero *Peperomia*

Ao contrário do observado para *Piper*, as espécies do gênero *Peperomia* são pouco conhecidas, tanto no âmbito comercial quanto na medicina popular. São ervas pequenas, terrestres ou epífitas, e frequentemente carnosas, podendo algumas espécies ser cultivadas como plantas ornamentais.

Um exemplo de espécie popular e mais estudada pertencente ao gênero *Peperomia* é a *Peperomia pellucida*, erva terrestre, pequena e suculenta. No Brasil, em Santa Catarina, é conhecida como erva-de-jaboti ou comida-de-jaboti, mas também é denominada popularmente *corazon de hombre* e *yerba de la plata* em Cuba (Guimarães e Giordano, 2004).

Sob a forma de chá ou infusão, folhas e raízes de *Peperomia pellucida* são usadas popularmente na Amazônia para combater dor de garganta e tosse, e não raramente é consumida como salada. A planta ainda é considerada útil contra hipertensão, é diurética, anti-inflamatória e digestiva (Guimarães e Giordano, 2004).

Apesar de este gênero ser constituído por mais de 1500 espécies, os estudos fitoquímicos com espécies de *Peperomia* descritos na literatura são reduzidos quando comparados àqueles com espécies de *Piper*. Os metabólitos secundários mais comuns relatados para o gênero são derivados fenólicos prenilados, policetídeos, cromenos, secolignananas e dímeros de estireno (Kato e Furlan, 2007). Entre as espécies estudadas, podem ser citadas *Peperomia proctorii* (Seeram *et al.*, 2000), *Peperomia galiodes* (Mahiou *et al.*, 1995), *Peperomia dindigulensis* (Govindachari *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2006), *Peperomia pellucida* (Xu *et al.*, 2006) e *Peperomia villipetiola* (Salazar *et al.*, 2005).

Neste estudo, foram selecionadas duas espécies do gênero *Peperomia* para serem submetidas a fracionamento químico biomonitorado, a partir da análise do potencial fungitóxico de seus extratos brutos: *Peperomia alata* e *Peperomia glabella*.

### 1.3.1. *Peperomia alata* Ruiz & Pav.

Pouco se conhece sobre a taxonomia, distribuição geográfica, utilidades e dados como nomes populares ou propriedades medicinais de *Peperomia alata*. Também não foram encontrados na literatura estudos fitoquímicos para a espécie, com exceção da composição química do óleo essencial (Moreira *et al.*, 1999).



Foto: M. J. Kato

**Figura 6.** *Peperomia alata* Ruiz & Pav.

### 1.3.2. *Peperomia glabella* (Sw.) A. Dietr.

A espécie *Peperomia glabella* (Sw.) A. Dietr., é uma erva reptante, que se desenvolve geralmente no interior das matas. É encontrada nas Antilhas, América Central e América do Sul. No Brasil, a espécie está distribuída entre os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pará, Amapá e Santa Catarina, onde é

conhecida como erva-de-vidro (Guimarães e Giordano, 2004). Por suas características morfológicas, pode ser cultivada como planta ornamental.

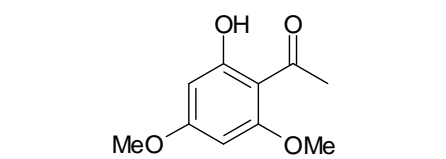
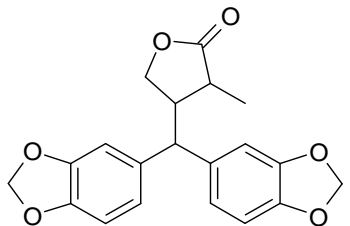
Para a espécie *Peperomia glabella*, dois estudos fitoquímicos são encontrados na literatura, revelando a presença de um derivado de acetofenona (Soares *et al.*, 2006) e uma secolignana (Monache e Compagnone, 1996) (Tabela 2).



Foto: M. J. Kato

**Figura 7.** *Peperomia glabella* (Sw.) A. Dietr.

**Tabela 2.** Metabólitos secundários isolados em estudos anteriores realizados com *Peperomia glabella*.

Estrutura	Parte da planta	Referência
 <p>2-hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona</p>	Folhas	Soares <i>et al.</i> , 2006
 <p>Peperomina D</p>	Planta inteira	Monache e Compagnone, 1996

#### 1.4. Potencial biológico de espécies de Piperaceae

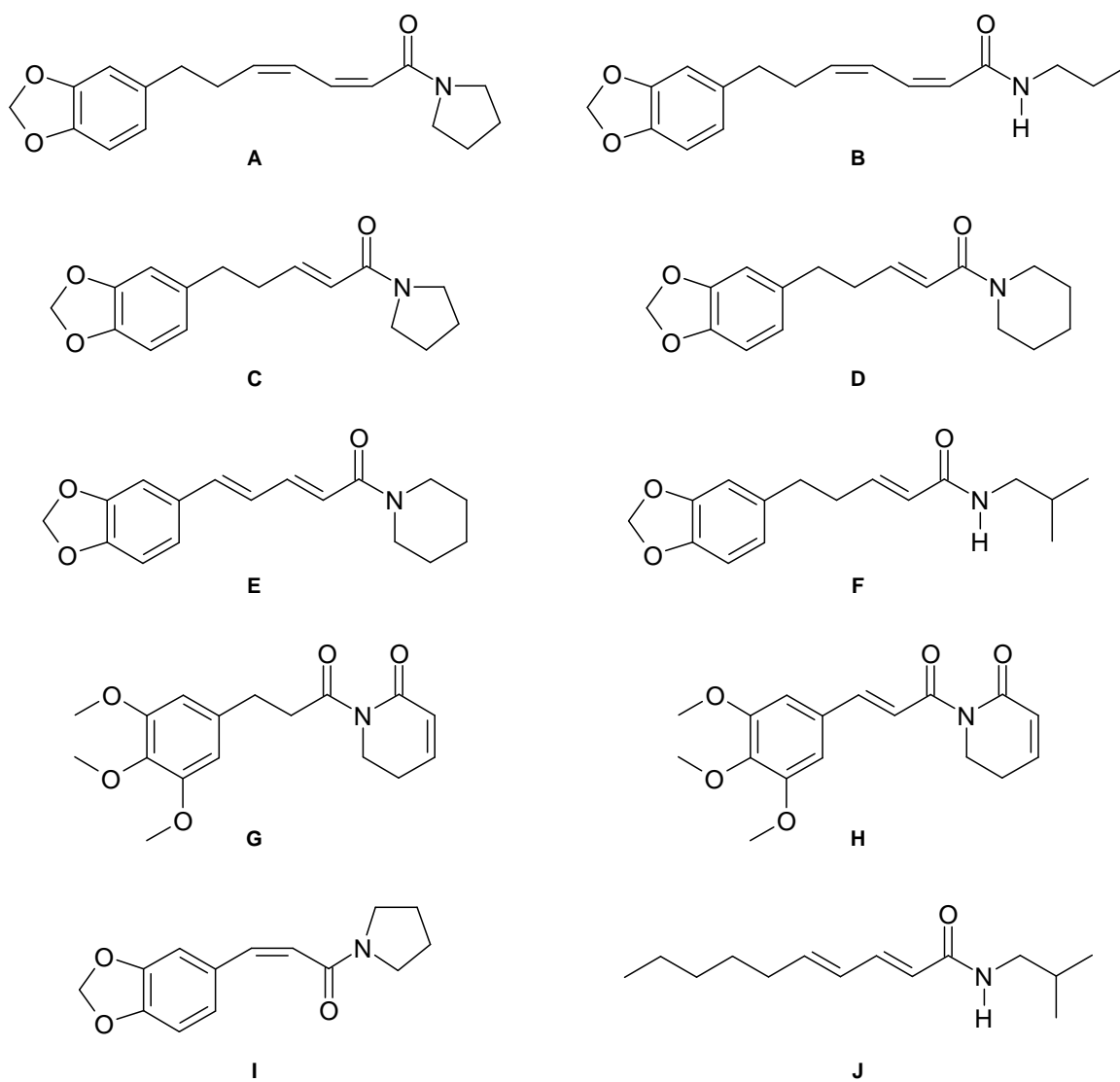
A grande diversidade química dos metabólitos secundários isolados de Piperaceae tem motivado a realização de estudos sistemáticos visando a investigação do potencial biológico destas espécies.

Bioensaios simples e rápidos, desenvolvidos para detecção de compostos com atividade antibacteriana, antitumoral, antifúngica, moluscicida, inseticida, entre outras, estão sendo utilizados pelos pesquisadores da área para a identificação de espécies com potencial biológico.

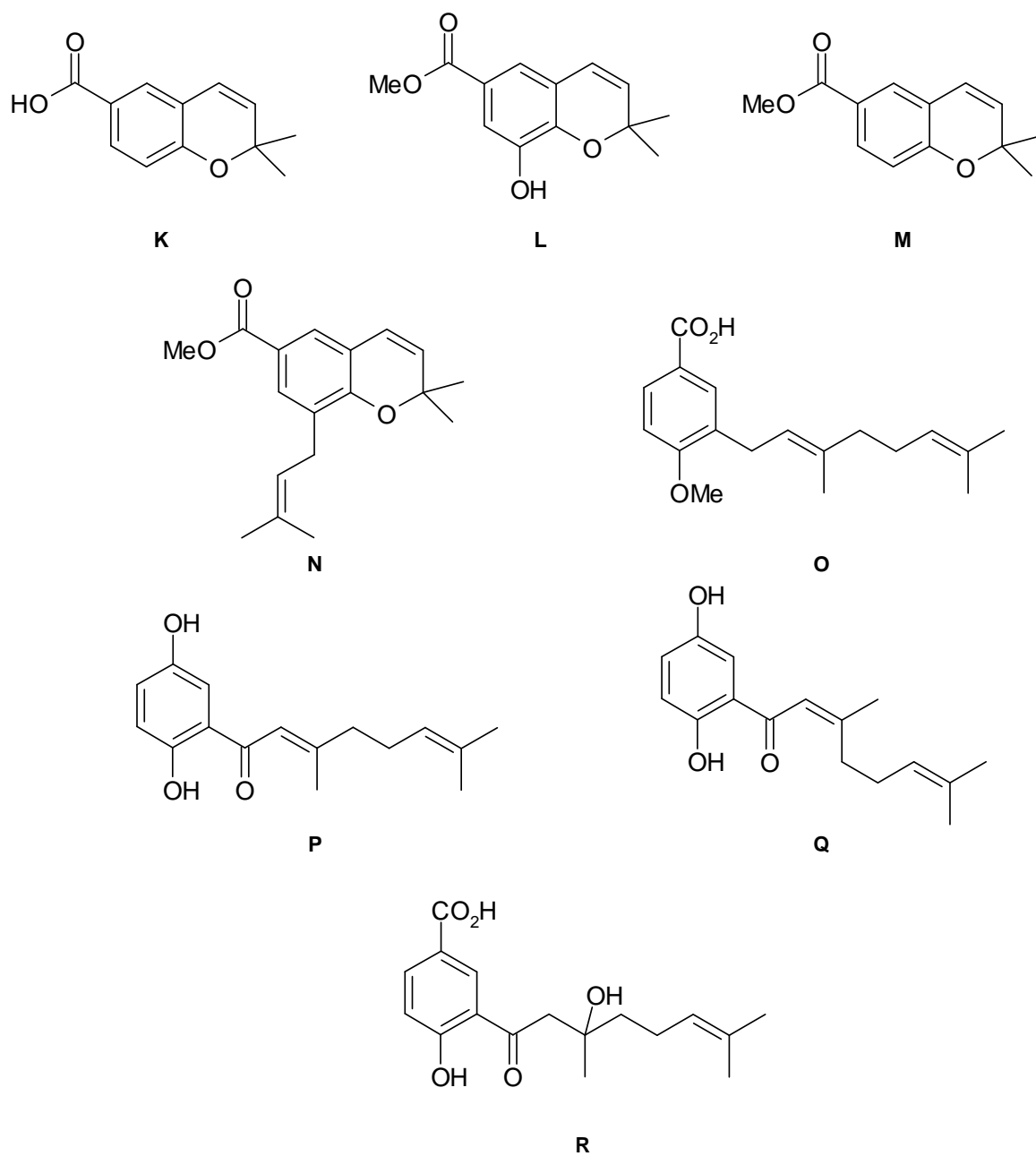
Estudos fitoquímicos biomonitorados realizados com espécies dos gêneros *Piper* (Parmar *et al.*, 1997; Dyer e Palmer, 2004) e *Peperomia* têm revelado a presença de inúmeros metabólitos secundários, como amidas, derivados de ácido benzóico, cromenos e policetídeos, com potencial atividade biológica, principalmente atividade antifúngica (Tabela 3, Figuras 8 -10).

**Tabela 3.** Espécies de *Piper* e *Peperomia* e seus metabólitos acumulados, isolados através de estudos fitoquímicos biomonitorados.

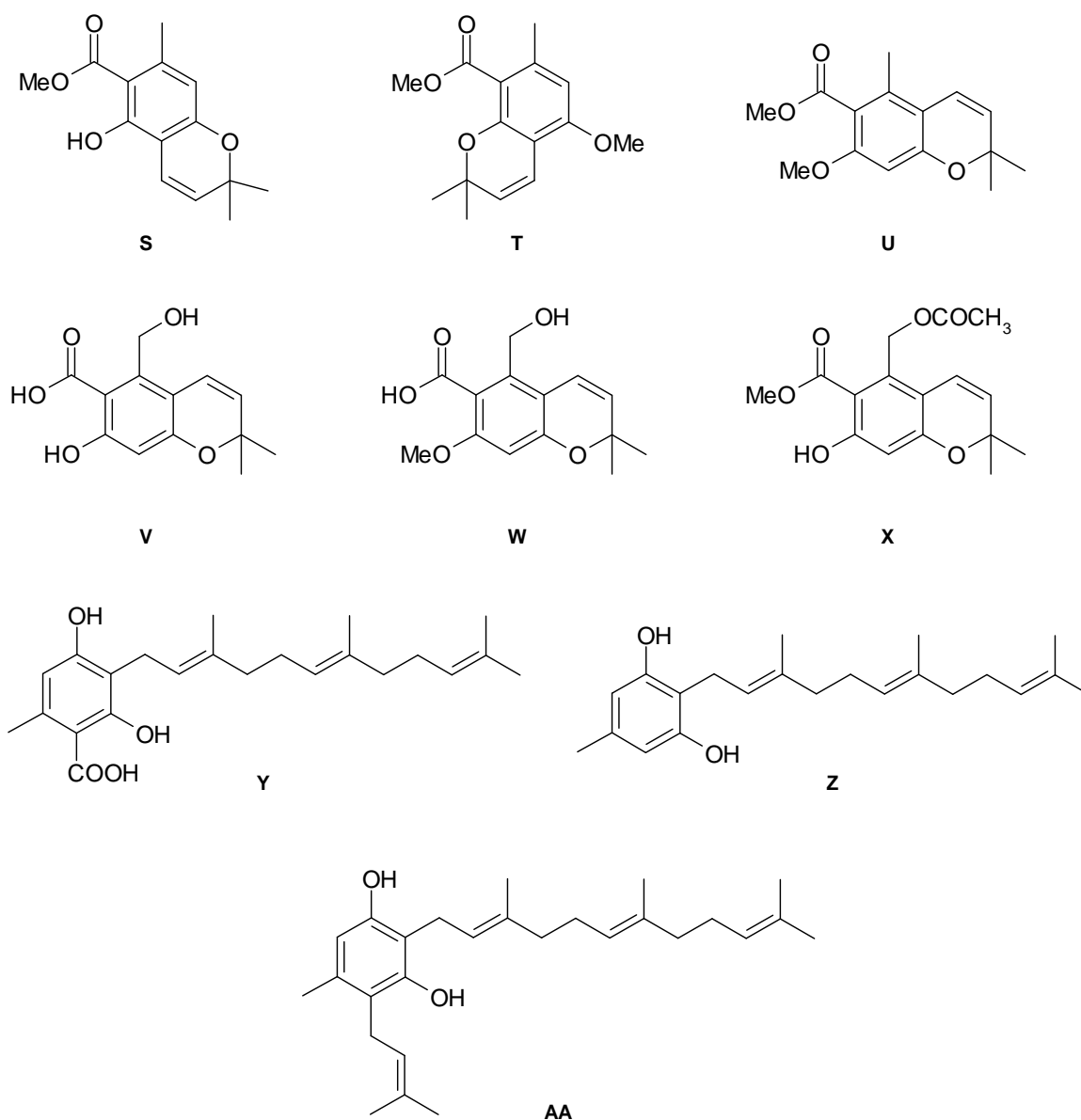
Metabólitos acumulados	Espécie	Atividade biológica	Referência
A e C	<i>Piper hispidum</i>	antifúngica	Alécio <i>et al.</i> , 1998
B	<i>Piper hispidum</i>	antifúngica	Navickiene <i>et al.</i> , 2000
D - J	<i>Piper tuberculatum</i>	antifúngica	Navickiene <i>et al.</i> , 2000
K-O	<i>Piper aduncum</i>	antifúngica antitumoral	Baldoqui <i>et al.</i> , 1999
P e Q	<i>Piper crassinervium</i>	antifúngica anti-oxidante	Danelutte <i>et al.</i> , 2003 Yamaguchi <i>et al.</i> , 2006
R	<i>Piper crassinervium</i>	antifúngica	Lago <i>et al.</i> , 2004
S - X	<i>Peperomia galiodes</i>	antiparasitária	Mahiou <i>et al.</i> , 1995
Y - AA	<i>Peperomia villipetiola</i>	antifúngica	Salazar <i>et al.</i> , 2005



**Figura 8.** Amidas com atividade biológica isoladas de espécies de *Piper*.



**Figura 9.** Cromenos e derivados de ácidos benzóicos com atividade biológica isolados de espécies de *Piper*.



**Figura 10.** Derivados policetílicos com atividade biológica isolados de espécies de *Peperomia*.



### 1.4.1. Atividade antifúngica

Estudos de bioprospecção focados em agentes antifúngicos mostram-se importantes face à crescente demanda por produtos dessa natureza, uma vez que os fungos são responsáveis, direta ou indiretamente, por uma série de doenças que afetam plantas, animais e humanos.

Nos últimos anos, com a crescente ocorrência de enfermidades causadas por fungos oportunistas, normalmente associadas a pacientes imunodeficientes, como os portadores do vírus da AIDS ou sob tratamento quimioterápico, torna-se ainda maior a importância da busca por novos agentes antifúngicos (Georgopapadaku, 1998).

Espécies pertencentes à família Piperaceae submetidas a estudos fitoquímicos biomonitorados têm revelado o acúmulo de inúmeros metabólitos secundários com potencial atividade antifúngica. Entre os estudos realizados para espécies de *Piper*, verifica-se a ocorrência de amidas antifúngicas em *P. hispidum* (Alécio *et al.*, 1998), *P. tuberculatum* (Navickiene *et al.*, 2000), *P. arboreum* (Silva *et al.*, 2001), *P. scutifolium* e *P. hoffmanseggianum* (Marques *et al.*, 2007); ácidos benzóicos prenilados em *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999), *P. gaudichaudianum*, *P. hostmannianum* e em *P. crassinervium* (Lago *et al.*, 2004); flavonóides e hidroquinonas em *P. crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006) e piperolideos em *P. malacophyllum* (Lago *et al.*, 2005).

Em espécies do gênero *Peperomia*, os dados obtidos até o presente destacam apenas dois estudos que revelam a presença de cromenos com atividade antifúngica em *Peperomia villipetiola* (Salazar *et al.*, 2005) e *Peperomia serpens* (Kitamura *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Inserido em um estudo de bioprospecção, este trabalho visou a detecção e identificação de substâncias com atividade antifúngica, extraídas das folhas, caules e raízes de diversas espécies de *Piper* e *Peperomia* (Piperaceae), através de estudo fitoquímico biomonitorado.

Além disso, este estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a composição química de espécies de Piperaceae, através da incorporação de novas informações ao banco de extratos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, incluindo dados de atividade biológica e de perfis de composição através de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Instrumentação

O Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ-USP dispôs do seguinte equipamento analítico para o desenvolvimento deste trabalho:

- Espectrofotômetro operando na região do ultravioleta/visível: os dados de UV/Vis foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1650 PC, utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Além dessa instrumentação, a Central Analítica do IQ-USP dispôs dos seguintes equipamentos:

- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear operando a 300 MHz (Varian UNIT<sup>®</sup> e Bruker DPX-300) e a 500 MHz (Bruker DRX-500) foram utilizados para realização das análises necessárias à caracterização das substâncias isoladas [<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (DEPT 135, DEPT 90), DQF-COSY, HMQC e HMBC]. Os espectros foram registrados em CDCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> e metanol-d<sub>4</sub>, e os padrões de referência internos foram TMS e o pico central do solvente.
- Sistema CG-EM: os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos através do sistema CG-EM (Shimadzu) modelo CG-17A, acoplado a um espectrômetro de massas MS-QP-5050A com analisador quadrupolo e operando via impacto eletrônico (IE) a 70 eV. A unidade CG foi equipada com coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, com fase estacionária de fenil 5% em 95% de metil-silicone; utilizou-se gás hélio como gás de arraste (1 mL/min), e as temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 280 °C, respectivamente; a rampa de temperatura variou de 100 a 260 °C, com taxa de 5 °C/min.

- Espectrômetro de massas de baixa resolução (Shimadzu 14B/QP5050A) e de alta resolução (Bruker Daltonics MicroTOF), operando por impacto eletrônico e ionização por elétron spray.
- Espectrofotômetro Bomen MB-100 operando na região do IV.

Para a determinação do excesso enantiomérico e da configuração absoluta do metabólito isolado marginatumol, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-17A equipado com coluna capilar quiral Chirasil-Dex CB  $\beta$ -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), com as seguintes condições: utilizou-se hidrogênio como gás de arraste com pressão de 100 kPa; temperaturas do injetor e do detector foram de 200 e 220 °C, respectivamente; rampa de temperatura do forno variou de 100-180 °C com taxa de 1 °C/min.
- Polarímetro Jasco DIP-378, com lâmpada de sódio e cubeta de 1 dm, foi utilizado na obtenção dos valores de rotação óptica.

### 3.2. Materiais cromatográficos

Para as análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F<sub>254</sub> sob suporte de alumínio, com espessura de 0,25 mm (Merck). As mesmas foram reveladas por visualização sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm.

Para os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC), utilizou-se sílica gel 60, com partículas de 63-200  $\mu$ m (Merck), e gel de Shepadex LH-20, com partículas de 25-100  $\mu$ m (Sigma/Pharmacia). Nas análises por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas placas de vidro de 20 x 20 cm cobertas com sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (Merck) com 1,0 mm de espessura.

### 3.3. Solventes e reagentes

Os solventes de grau PA utilizados durante as etapas de extração, purificação e análise foram fornecidos pela Synth, e submetidos à destilação fracionada na Central de Solventes do IQ-USP. Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (grau HPLC) da J.T. Baker.

A enzima Novozym 435, uma lipase imobilizada de *Candida antarctica* foi obtida gratuitamente da Novozymes Latin America Ltda. (Paraná).

### 3.4. Material vegetal

As espécies vegetais escolhidas para o desenvolvimento do projeto incluem *Piper* e *Peperomia* (família Piperaceae) que vêm sendo cultivadas nas estufas do LQPN do IQ-USP, e também outras que foram coletadas em diferentes regiões do Brasil no período de junho/2004 a outubro/2006, numeradas KATO-0400 a KATO-0789. As espécies estudadas neste trabalho foram identificadas pela Dra. Elsie Franklin Guimarães, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e suas exsicatas foram depositadas no Herbário de Instituto de Botânica (SMA-SP).

### 3.5. Obtenção dos extratos

Após a coleta do material vegetal, o mesmo foi seco em estufa a 40 °C, reduzido a pó, e parte deste (0,5 - 1,0 g) foi macerado à temperatura ambiente com MeOH ou CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (2:1) (v:v), sendo então concentrado sob vácuo.

Com o objetivo de ampliar e atualizar o banco de extratos do LQPN IQ-USP foram obtidos 125 extratos brutos de espécies de *Piper* e *Peperomia* (entre folhas,

caules, raízes e frutos), coletadas em diferentes regiões, além daquelas que vêm sendo cultivadas nas estufas do LQPN.

### 3.6. Análise dos extratos

Os extratos brutos foram submetidos aos ensaios de bioautografia (bioensaio) frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, de acordo com a metodologia descrita (Homans e Fuchs, 1970), a fim de detectar em quais extratos encontram-se os metabólitos bioativos. Além disso, os extratos foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  visando obter o perfil de metabólitos.

Parte dos extratos brutos anteriormente disponíveis no LQPN IQ-USP havia sido submetida aos mesmos bioensaios, sendo selecionadas as espécies *Piper mollicomum*, *Piper marginatum* e *Peperomia alata* para serem investigadas por fracionamento biomonitorado, uma vez que apresentaram potencial atividade fungitóxica.

Dentre os extratos brutos ativos apresentados na Tabela 5 (item 4.1.), selecionou-se a espécie *Peperomia glabella* para ser submetida a fracionamento cromatográfico biomonitorado, a fim de isolar e caracterizar os metabólitos secundários responsáveis pela atividade fungitóxica.

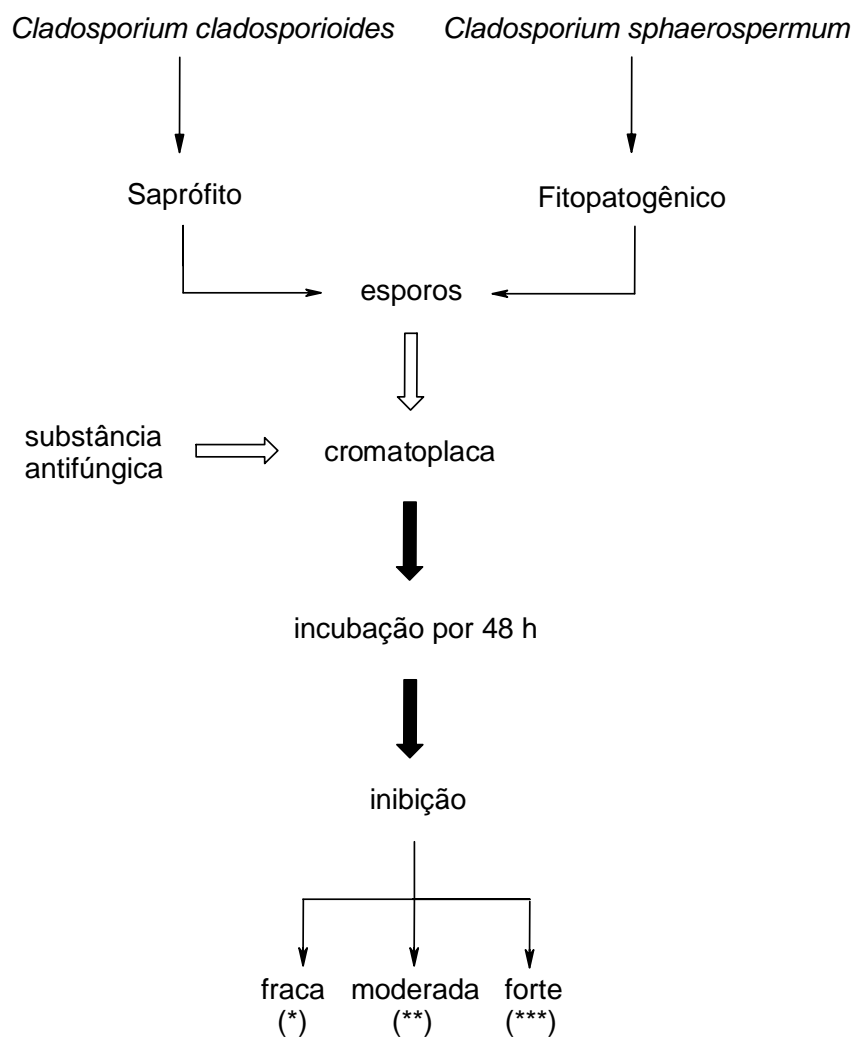
### 3.7. Ensaios de bioautografia com fungos

Após a concentração dos extratos, foi realizado o ensaio de bioautografia, um teste simples que se fundamenta na ação inibitória de extratos/substâncias antifúngicas sobre esporos de fungos utilizados para revelação das placas cromatográficas, nas quais os extratos foram aplicados (Homans e Fuchs, 1970).

Nestes ensaios de bioautografia foram utilizados como reveladores os fungos *Cladosporium cladosporioides* (saprófito) e *Cladosporium sphaerospermum* (fitopatogênico). Essas duas espécies foram escolhidas por não serem patogênicas ao homem e por apresentarem um crescimento uniforme em condições de cultura *in vitro* (Rahalison *et al.*, 1994).

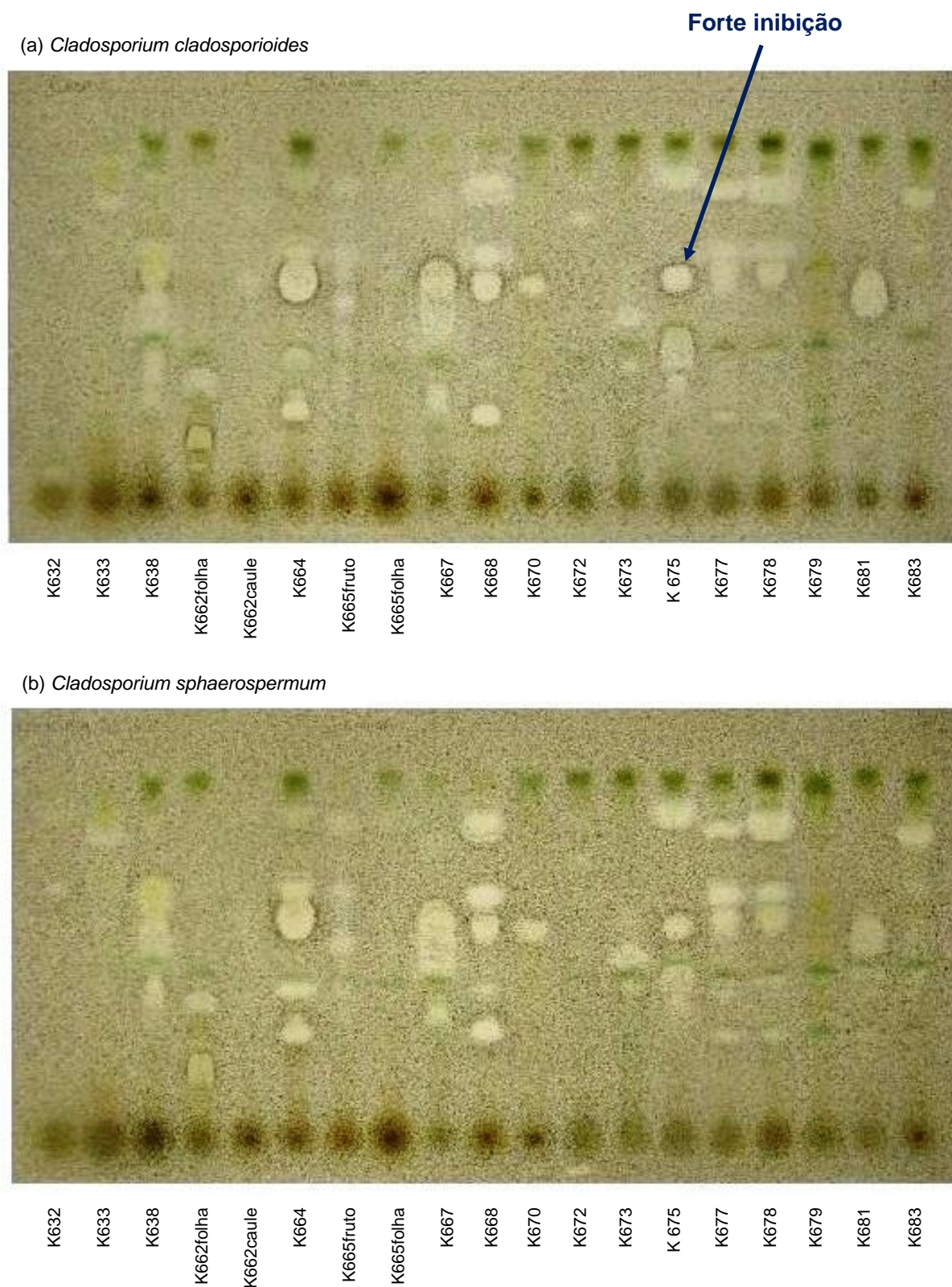
Para a realização dos experimentos, desenvolvidos no Instituto de Botânica (SMA-SP), sob supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young, as amostras (400 µg de extratos brutos e frações) foram aplicadas em placas comerciais de sílica PF<sub>254</sub> (Merck) sob suporte de alumínio e eluídas com misturas adequadas de solventes (CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1) (v:v)). Após a evaporação do eluente, as placas foram nebulizadas com uma solução de glicose e sais contendo esporos dos fungos reveladores *C. cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC 140 e *C. sphaerospermum* (Perzig) SPC 491, e em seguida incubadas a 25 °C, em câmara escura, durante 48 horas (Figura 11). Decorrido o tempo de incubação, foi observado o crescimento do fungo sob toda a placa, exceto nas áreas onde se encontravam as substâncias fungitóxicas (Figura 12).

Após a purificação dos metabólitos responsáveis pela atividade antifúngica, foram calculadas as doses limite de detecção, variando-se a concentração e o volume da amostra aplicada na placa, e comparando esses resultados com substâncias antifúngicas padrão, tais como nistatina e miconazol.



**Figura 11.** Diagrama ilustrativo da bioautografia com esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.





**Figura 12.** Exemplos de placas cromatográficas da bioautografia de extratos brutos com esporos dos fungos: (a) *C. cladosporioides* e (b) *C. sphaerospermum*.

### 3.8. Fracionamento biomonitorado dos extratos

Os extratos ativos selecionados pelo ensaio de atividade antifúngica foram submetidos a um fracionamento inicial em gel de sílica, seguido de partição solvente-solvente.

Após novo ensaio de bioautografia, as frações bioativas foram submetidas a fracionamento cromatográfico em gel de sílica ou em Sephadex LH-20, utilizando-se misturas de solventes em polaridade crescente. A avaliação do bioensaio das frações provenientes deste fracionamento indicou quais seriam submetidas a posteriores processos de separação.

As etapas finais de purificação foram baseadas em métodos usuais de separação em sílica de fase normal, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência, sempre efetuando o bioensaio para o monitoramento de cada etapa de purificação.

Após o isolamento do metabólito bioativo, a caracterização molecular foi realizada através da análise dos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , EM e comparação com os dados da literatura. As estruturas dos metabólitos isolados que são inéditos na literatura foram totalmente elucidadas pela análise dos dados de RMN 2D (COSY, HMQC e HMBC), além de EM de alta resolução. Após essa caracterização, os ensaios antifúngicos foram então repetidos, com o objetivo de determinar o limite de detecção destes metabólitos isolados.

#### 3.8.1. Fracionamento do extrato de *Piper mollicomum*

Folhas de *Piper mollicomum* Kunth. foram coletadas em Ubatuba – SP, em setembro de 2002, e identificadas pela Dra. Elsie F. Guimarães. Uma exsicata foi

depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número KATO-0301.

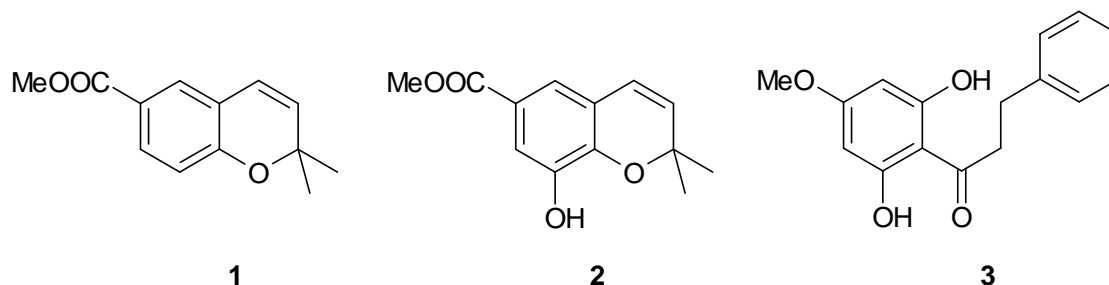
O material vegetal (folhas) seco e moído (54 g) foi extraído por maceração com metanol, à temperatura ambiente. O resíduo resultante foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob vácuo, obtendo-se o extrato bruto (1,6 g), o qual foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna ( $\varnothing$  4 cm x 25 cm) de gel de sílica em fase normal (sistema eluente: misturas de Hex:AcOEt:MeOH em modo gradiente de polaridade), obtendo-se 20 frações. Por CCDC, estas foram agrupadas em 6 novas frações, que foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , e avaliadas quanto ao potencial antifúngico. Destas, as frações 2, 4, 5 mostraram-se ativas (Figura 14).

Após análise por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (Díaz *et al.*, 1987), caracterizou-se na fração 2 (16 mg) o cromeno 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (**1**).

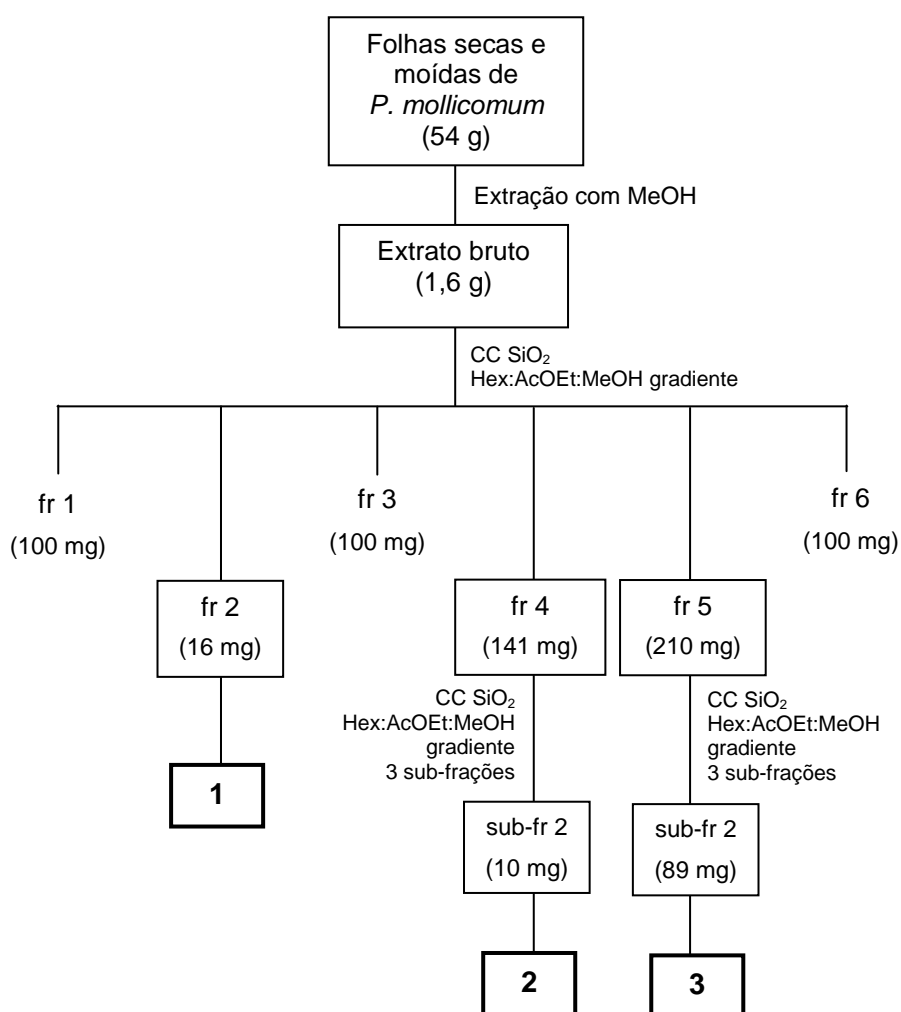
A fração 4 (141 mg) foi fracionada através de CC ( $\varnothing$  2,3 cm x 32 cm) de gel de sílica em fase normal (sistema eluente: misturas de Hex:AcOEt:MeOH em modo gradiente de polaridade) obtendo-se 3 sub-frações. Da sub-fração 2 (10 mg) foi isolado outro cromeno, 8-hidróxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (**2**), caracterizado após análise por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (Orjala *et al.*, 1993a).

A fração 5 (210 mg) foi submetida a CC ( $\varnothing$  2,3 cm x 32 cm) de gel de sílica em fase normal (sistema eluente: misturas de Hex:AcOEt:MeOH em modo gradiente de polaridade) obtendo-se 3 sub-frações. Da sub-fração 2 (89 mg) isolou-se **3**, caracterizado como uma di-hidrochalcona pela análise por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (Orjala *et al.*, 1994).

As estruturas dos metabólitos isolados, bem como o fluxograma do fracionamento biomonitorado estão representados nas Figura 13 e 14, respectivamente.



**Figura 13.** Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de *Piper mollicomum*.



**Figura 14.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Piper mollicomum*.

### 3.8.2. Fracionamento do extrato de *Piper marginatum*

Folhas de *Piper marginatum* Jacq. foram coletadas em Manaus – AM, em março de 2002, e identificadas pela Dra. Elsie F. Guimarães (exsicata KATO-0223).

O extrato metanólico das folhas de *Piper marginatum* (3,43 g) foi solubilizado em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (v:v) e extraído com AcOEt. Após evaporação do solvente, a fase AcOEt (1,22 g) foi submetida à separação em coluna (Ø 4 cm x 25 cm) de gel de sílica de fase normal (sistema eluente: misturas de Hex:AcOEt em modo gradiente de polaridade). Após comparação por CCDC as frações foram reunidas em 9 novas frações, que foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico. Destas, as frações 1, 2 e 3 mostraram inibição do crescimento dos fungos, indicando a presença de substâncias fungitóxicas (Figura 16).

A fração 1 (200 mg) foi fracionada através de separação em coluna (Ø 2,3 cm x 32 cm) de gel de sílica em fase normal (eluente: misturas de Hex:AcOEt em modo gradiente de polaridade), obtendo-se 3 sub-frações. A sub-fração 2 após análise por RMN de <sup>1</sup>H mostrou-se constituída por 3,4-metilenodioxipropiofenona (**4**), anteriormente isolada de *P. marginatum* (De Diaz e Gottlieb, 1979).

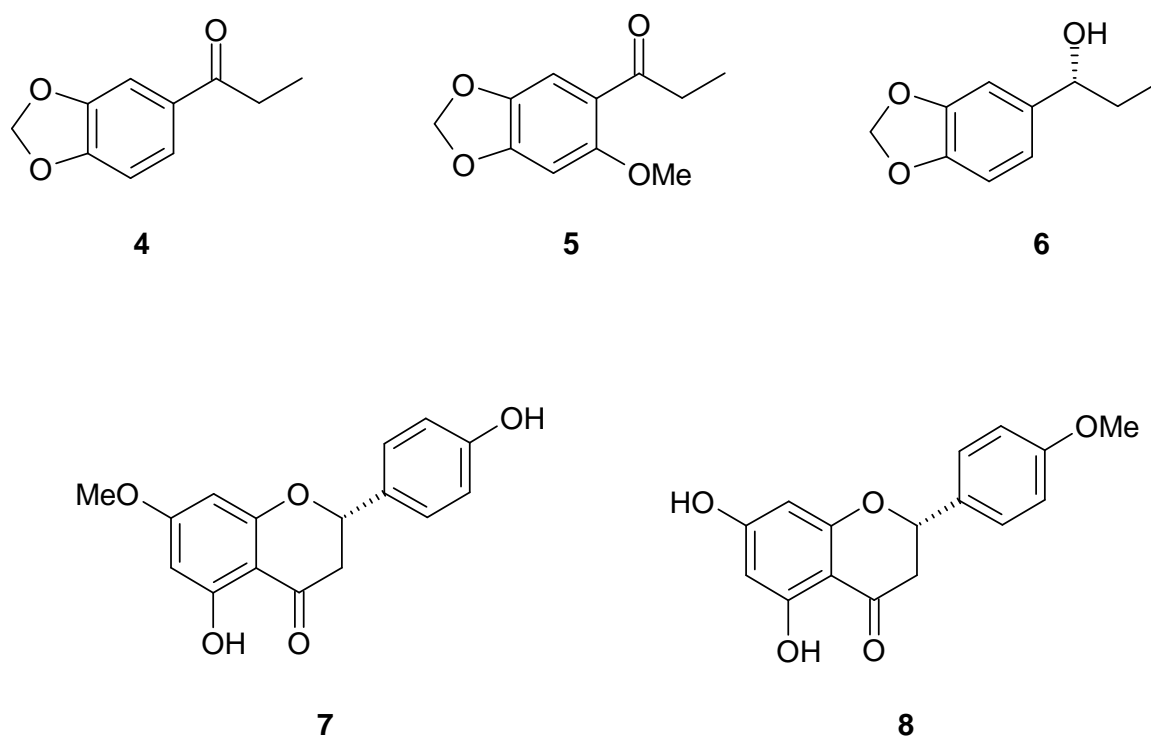
A fração 2 (100 mg) foi fracionada através de cromatografia em camada delgada preparativa (sistema eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hex (8:2) (v:v)), obtendo-se 3 sub-frações. Após análise por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, associado a EM, verificou-se que a sub-fração 2 (39 mg) era constituída por 2-metóxi-4,5-metilenodioxipropiofenona (**5**), também descrita na literatura para *P. marginatum* (De Diaz e Gottlieb, 1979).

Prosseguindo com o fracionamento do extrato das folhas de *P. marginatum*, a fração bioativa 3 (59 mg), após análise por RMN de <sup>1</sup>H, apresentou-se como uma mistura complexa de substâncias. Esta fração foi então fracionada através de permeação em gel de Sephadex LH-20 (coluna Ø 1,2 cm x 43 cm) utilizando-se

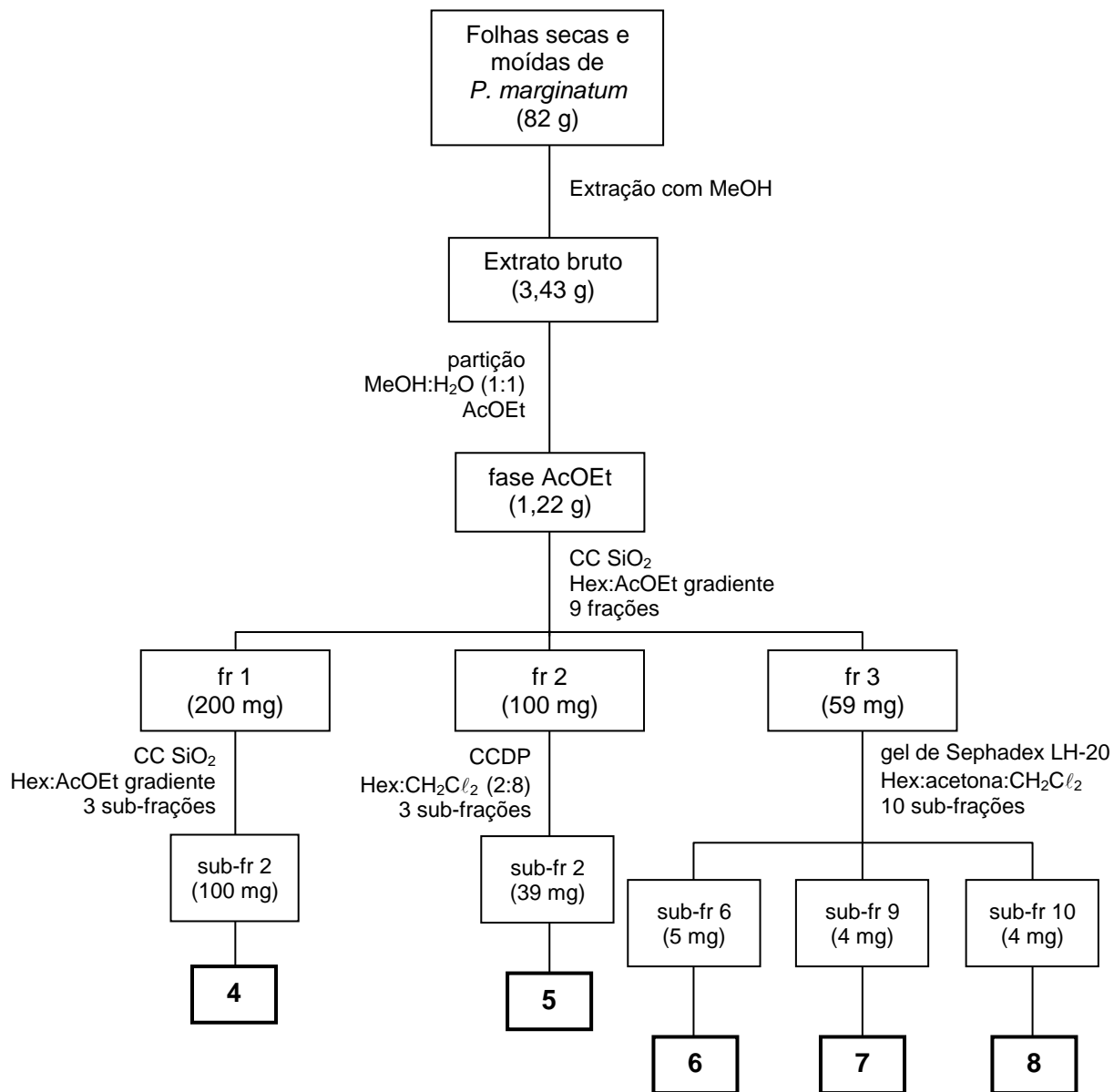
como sistema eluente Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4) e acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:2) e (1:4) (v:v), obtendo-se 10 sub-frações. Após ensaio de bioautografia, as frações 6, 9 e 10 mostraram-se ativas. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e EM da fração 6 (5 mg) indicou que a mesma era constituída por 3,4-metilenodioxil-1-(1'-hidroxipropil) benzeno (**6**), inédito na literatura.

As frações 9 (4 mg) e 10 (4 mg), após análise dos respectivos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e análise por CG-EM, mostraram-se constituídas por duas flavanonas, as quais foram identificadas como sakuranetina (**7**) e 4'-O-metil-naringenina (**8**), respectivamente (Danelutte *et al.*, 2003).

As Figuras 15 e 16 representam, respectivamente, as estruturas dos metabólitos isolados de *P. marginatum* e o fluxograma do fracionamento biomonitorado do extrato bruto das folhas.



**Figura 15.** Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de *Piper marginatum*.



**Figura 16.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Piper marginatum*.

### 3.8.3. Fracionamento do extrato de *Peperomia alata*

Folhas de *Peperomia alata* Ruiz & Pav. foram coletadas em Ubatuba – SP, em abril de 2004, e identificadas pela Dra. Elsie Guimarães (exsicata KATO-0291).

O material vegetal seco e moído (18 g) foi extraído exaustivamente por maceração à temperatura ambiente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obtendo-se 2,68 g de extrato bruto após evaporação do solvente. O extrato bruto foi submetido ao fracionamento em coluna de gel de sílica ( $\varnothing$  4 cm x 25 cm) em fase normal usando misturas de Hex:AcOEt:MeOH (gradiente de polaridade), obtendo-se 12 frações que foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico. Destas, as frações 5 e 6 apresentaram maior inibição do crescimento dos fungos, indicando a presença de substâncias fungitóxicas.

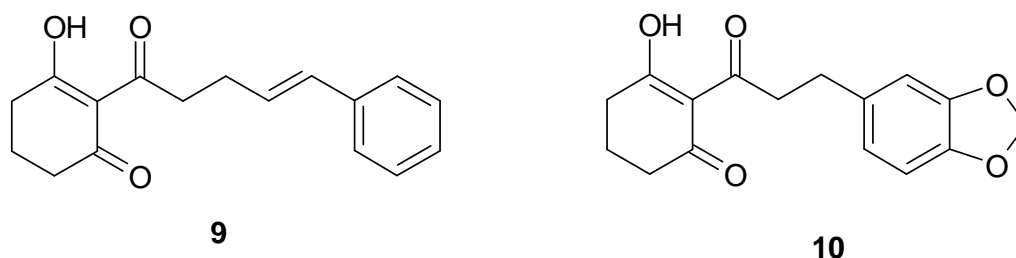
A fração 5 (790 mg) foi fracionada através de permeação em gel de Sephadex LH-20 (coluna  $\varnothing$  1,2 cm x 45 cm, sistema eluente Hex: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:4) seguido de acetona: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3:2) e (4:1) (v:v)), obtendo-se 8 sub-frações. Após análise por RMN de  $^1\text{H}$ , verificou-se que as sub-frações 3, 4 e 5 eram semelhantes. Estas foram então reunidas e a fração resultante (720 mg) foi submetida à separação em coluna ( $\varnothing$  2,3 cm x 32 cm) de gel de sílica em fase normal, usando misturas de Hex: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt:MeOH em modo gradiente de polaridade, obtendo-se novamente 8 sub-frações.

A análise por bioautografia indicou que a atividade estava concentrada na sub-fração 1 (421 mg) a qual foi analisada através de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e EM. A substância foi determinada como 3-hidróxi-2-(5'-fenil-4'-pentenoil)-2-cicloexen-1-ona (**9**), inédita na literatura.

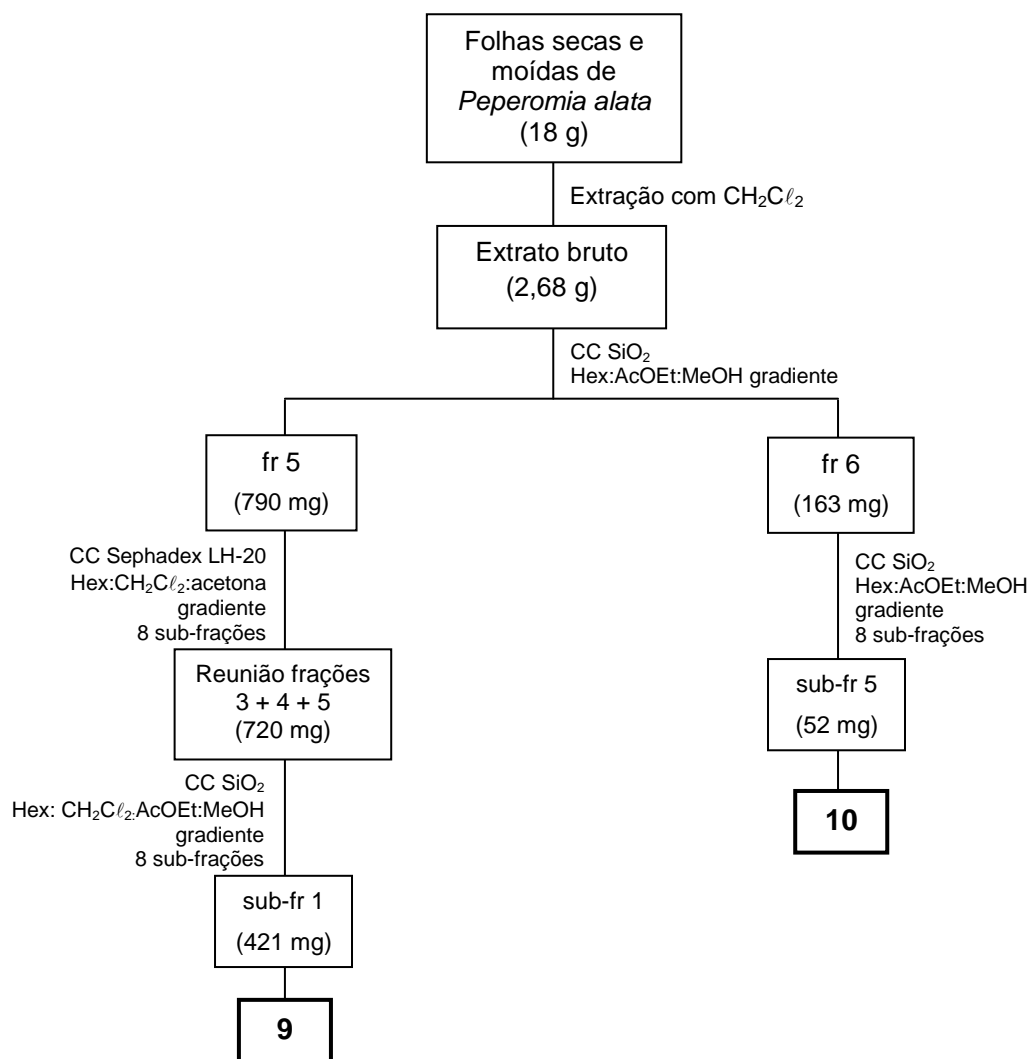


A fração 6 (163 mg) foi submetida à separação em coluna ( $\varnothing$  2,3 cm x 32 cm) de gel de sílica em fase normal (sistema eluente: misturas de Hex:AcOEt:MeOH em modo gradiente de polaridade), obtendo-se 8 sub-frações, as quais foram analisadas quanto ao potencial fungitóxico, concentrado na sub-fração 5 (52 mg). A análise por RMN de  $^1\text{H}$  desta fração mostrou que a mesma estava pura. Então, foram registrados os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e EM, que permitiram a caracterização de 3-hidróxi-2-(3'-fenil-6'-metilenodioxipropanoil)-2-cicloexen-1-ona (**10**), também inédito na literatura.

As estruturas de **9** e **10**, bem como o fluxograma do fracionamento biomonitorado das folhas de *Peperomia alata*, estão representadas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.



**Figura 17.** Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de *Peperomia alata*.



**Figura 18.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Peperomia alata*.

### 3.8.4. Fracionamento do extrato de *Peperomia glabella*

Dentre os extratos brutos ativos presentes no banco de extratos do LQPN, selecionou-se também a espécie *Peperomia glabella* (SW.) A. Dietrich (exsicata KATO-0511), cultivada nas estufas do LQPN IQ-USP, para ser submetida a fracionamento cromatográfico biomonitorado.

Assim, maior quantidade de folhas secas de *Peperomia glabella* (21 g) foi extraída exaustivamente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (2:1) (v:v), obtendo-se 3,9 g de extrato bruto. Parte desse extrato (1,5 g) foi solubilizada em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (v:v) e extraída com AcOEt. Após evaporação do solvente, a fase AcOEt (1,2 g) foi submetida à cromatografia a vácuo em gel de sílica flash utilizando-se como eluentes Hex,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH.

Após análise por RMN de <sup>1</sup>H e bioautografia destas fases, selecionou-se a fase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (304 mg), a qual foi então submetida a fracionamento em coluna (Ø 4 cm x 25 cm) de gel de sílica (eluentes: Hex:AcOEt:MeOH em gradiente de polaridade) obtendo-se 7 frações.

Destas, selecionou-se primeiramente a fração 2 (27 mg), a qual foi fracionada através de cromatografia em camada delgada preparativa em gel de sílica (Hex:AcOEt (7:3) (v:v)), obtendo-se 5 sub-frações. Após análise por RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e CG-EM, a sub-fração 2 (11 mg) mostrou-se constituída por uma mistura de quatro acilresorcínóis de cadeia longa (**11** – **14**), ainda não descritos em *Peperomia glabella*. A literatura descreve a ocorrência das estruturas **11**, **12** (Gonzalez *et al.*, 1996) e **13** (Kato *et al.*, 1985) isoladas de espécies vegetais, mas essa é a primeira vez que a substância **14** é reportada como produto natural.

Em seguida, foi selecionada a fração 4 (106 mg), a qual foi fracionada através de permeação em gel de Sephadex LH-20 (coluna Ø 1,2 cm x 45 cm) utilizando

como sistema eluente Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4) e acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:2) e (4:1) (v:v), obtendo-se 6 sub-frações. A sub-fração 2 (10 mg), após análise dos respectivos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C seguido de comparação com os dados da literatura (Monache e Compagnone, 1996) mostrou-se constituída por uma mistura de duas secolignanas.

A mistura foi então purificada por CCDP de sílica impregnada com nitrato de prata (sistema eluente Hex:AcOEt (4:1) (v:v)), obtendo-se 4,0 mg de **15** e 3,5 mg de **16**. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e CG-EM das substâncias isoladas permitiu a identificação de **15** como peperomina D, anteriormente isolada de *Peperomia glabella* (Monache e Compagnone, 1996), e a caracterização de **16** como peperomina G, cuja estrutura é inédita na literatura.

Em continuação ao estudo fitoquímico, foi selecionada também a fração 5 (99 mg), a qual após análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e CG-EM, seguido de comparação com os dados da literatura (Chen *et al.*, 1989; Govindachari *et al.*, 1998), mostrou-se constituída por uma mistura de outras duas secolignanas, as quais foram identificadas como peperomina A (**17**) e peperomina E (**18**), ambas anteriormente descritas em espécies de *Peperomia* (Chen *et al.*, 1989; Govindachari *et al.*, 1998).

As substâncias isoladas estão apresentadas na Figura 19 e o fluxograma do fracionamento cromatográfico de *Peperomia glabella* está representado na Figura 20.

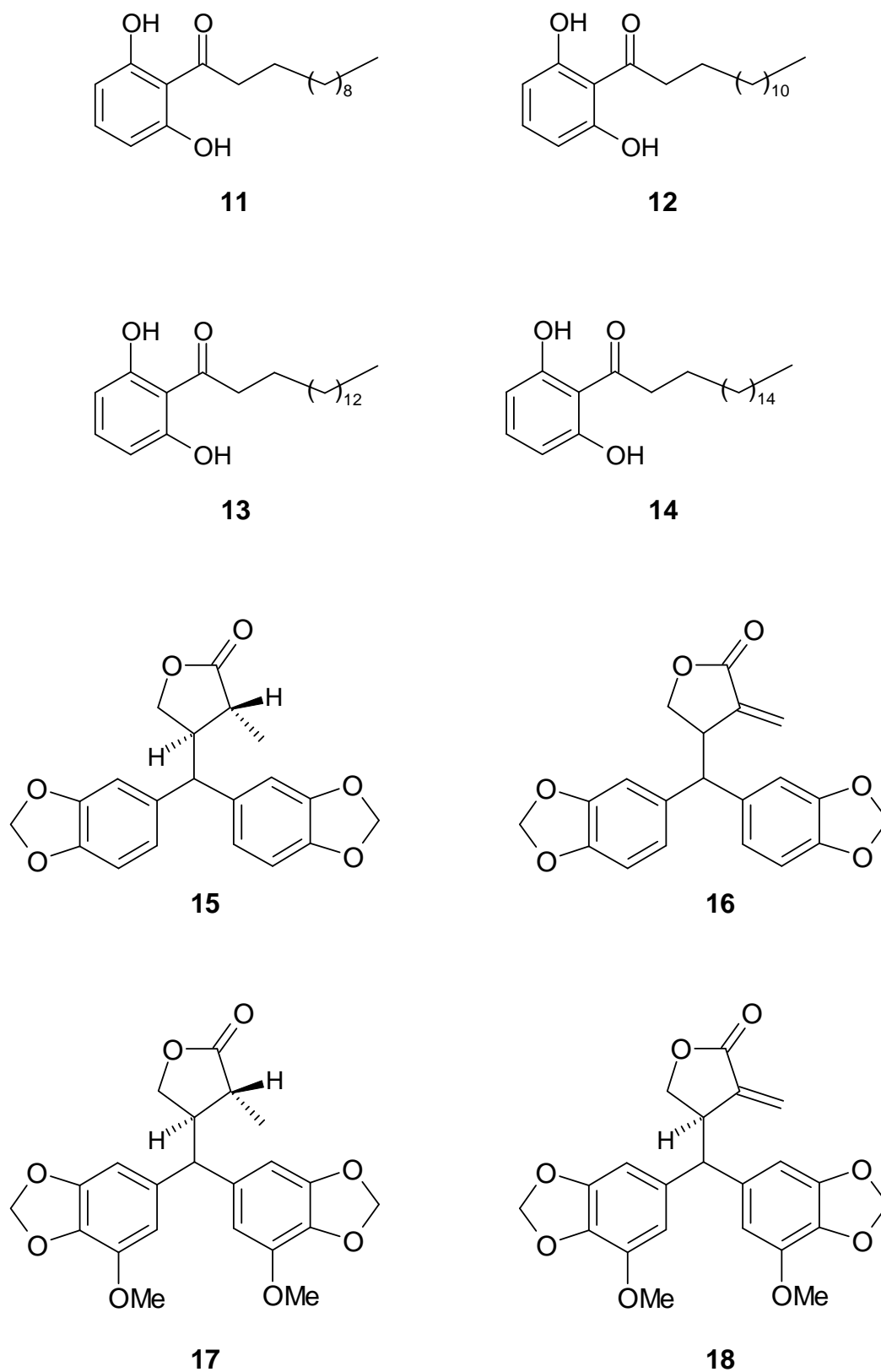
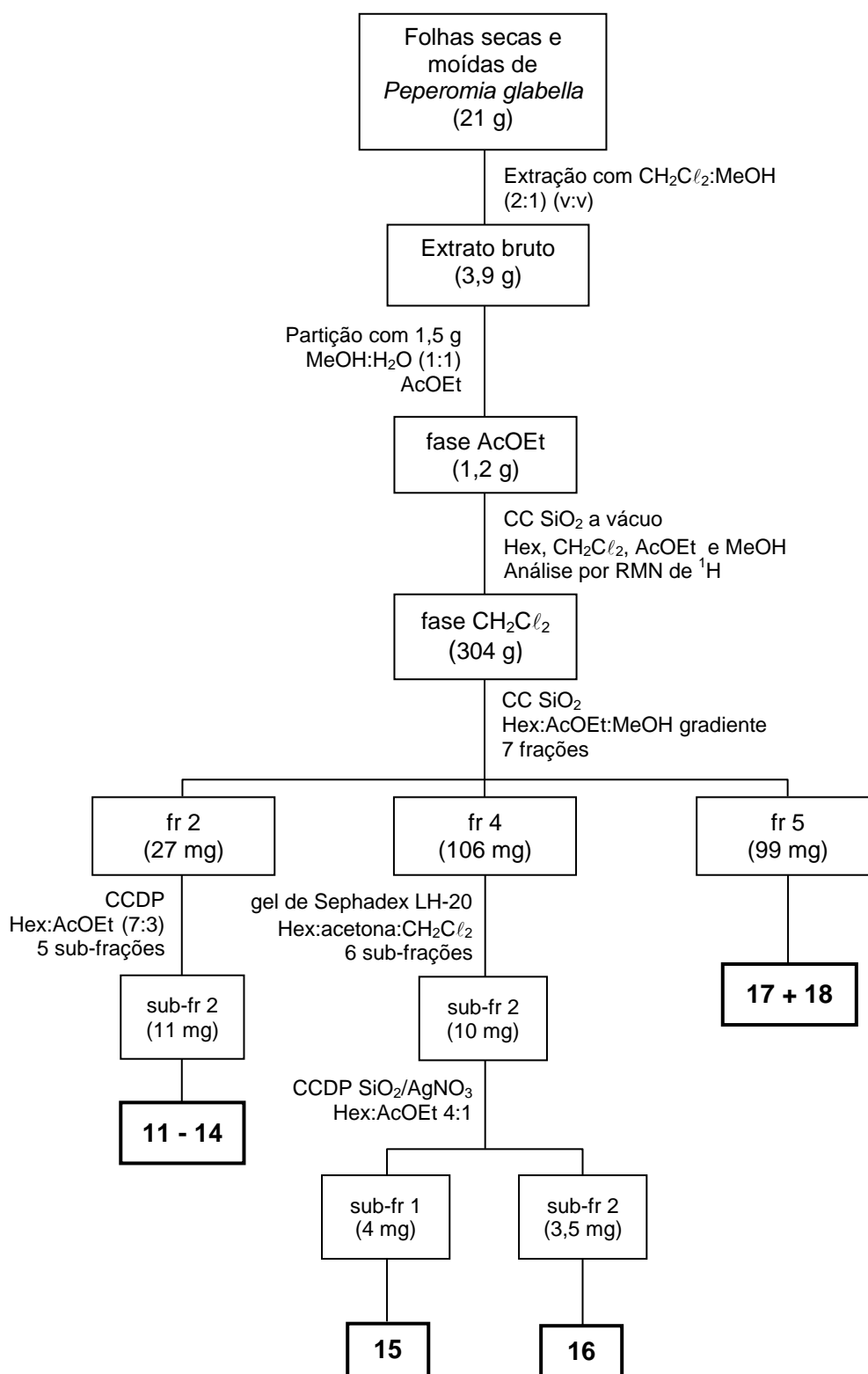


Figura 19. Metabólitos secundários antifúngicos isolados das folhas de *Peperomia glabella*.

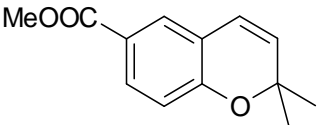
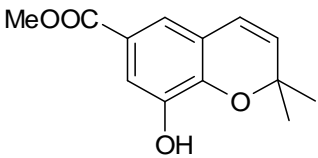
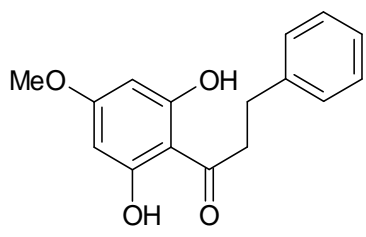


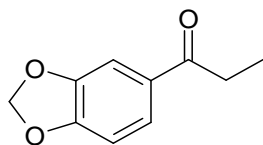
**Figura 20.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Peperomia glabella*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos fitoquímicos biomonitorados das espécies apresentadas resultaram no isolamento e caracterização de metabólitos secundários provenientes de diferentes rotas metabólicas: cromenos (**1** e **2**) e di-hidrochalcona (**3**) de *Piper mollicomum* (Lago *et al.*, 2007); fenilpropanóides (**4** – **6**) e flavanonas (**7** e **8**) de *Piper marginatum* (Reigada *et al.*, 2007); policetídeos (**9** e **10**) de *Peperomia alata*; acilresorcinóis (**11** – **14**) e secolignananas (**15** – **18**) de *Peperomia glabella* (Tabela 4).

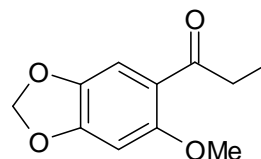
**Tabela 4.** Metabólitos secundários isolados das espécies de *Piper* e *Peperomia* estudadas por fracionamento biomonitorado.

<i>Piper mollicomum</i>	
	
<b>1</b> 2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila	<b>2</b> 8-hidróxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila
	
<b>3</b> 2',6'-dihidróxi-4'-metóxidi-hidrochalcona	

*Piper marginatum*

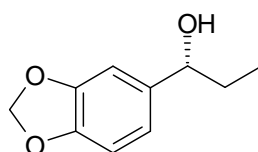
4

3,4-metilenodioxipropiofenona



5

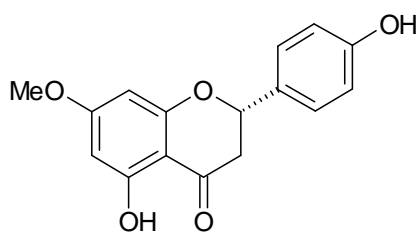
2-metóxi-4,5-metilenodioxipropiofenona



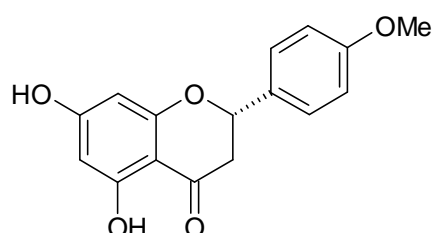
6

(R)-3,4-metilenodioxi-1-(1'-hidróxi-propil) benzeno

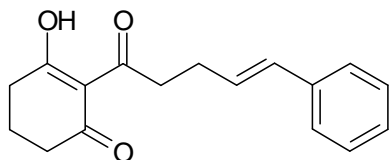
(+)-(R)-marginatumol



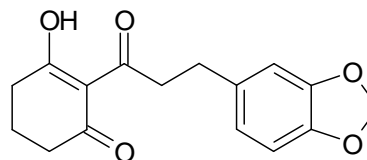
7

5,4'-dihidróxi-7-metoxiflavanona  
sakuranetina

8

5,7-dihidróxi-4'-metoxiflavanona  
4'-O-metil-naringenina*Peperomia alata*

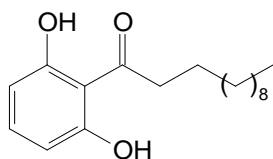
9

3- hidróxi-2-(5'-fenil-4'-pentenoil)-2-cicloexen-  
1-ona  
alatanona A

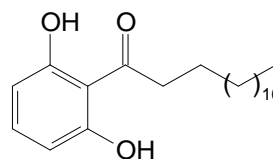
10

3-hidróxi-2-(3'-fenil-6'-metilenodioxipropanoil)-  
2-cicloexen-1-ona  
alatanona B

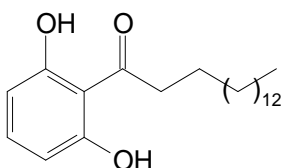


*Peperomia glabella***11**

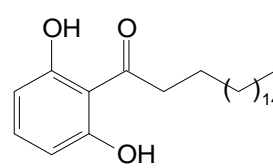
1-(2,6-di-hidróxifenil)dodecan-1-ona

**12**

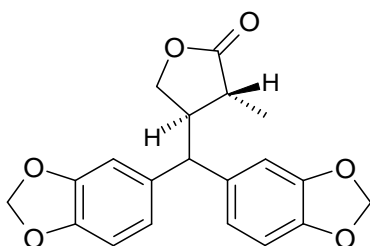
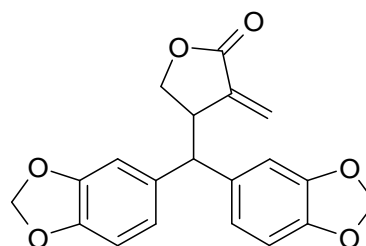
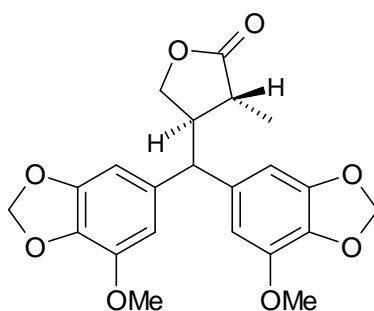
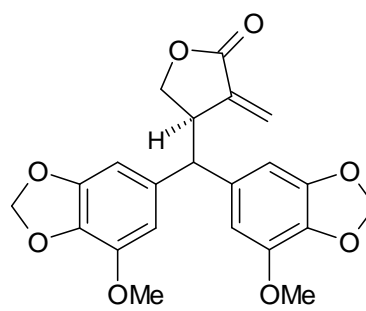
1-(2,6-di-hidróxifenil)tetradecan-1-ona

**13**

1-(2,6-di-hidróxifenil)hexadecan-1-ona

**14**

1-(2,6-di-hidróxifenil)octadecan-1-ona

**15**2-metil-3-[bis(3',4'-metilendioóxifenil)metil]butirolactona  
peperomina D**16**2-metileno-3-[bis(3',4'-metilendioóxifenil)metil]butirolactona  
peperomina G**17**2-metil-3-[bis(3',4'-metilendioóxi-5'-metóxiifenil)metil]butirolactona  
peperomina A**18**2-metileno-3-[bis(3',4'-metilendioóxi-5'-metóxiifenil)metil]butirolactona  
peperomina E

#### 4.1. Prospecção de atividade antifúngica nos extratos de *Piper* e *Peperomia*

Indivíduos adultos pertencentes à família Piperaceae foram coletados no período entre 2004 e 2006 em diferentes localidades, e após triagem em suas diversas partes, foram secos e extraídos com solventes orgânicos (Tabela 5). Os extratos brutos obtidos foram avaliados quanto à presença de substâncias fungitóxicas.

Assim, dos 125 extratos brutos obtidos de espécies de *Piper* e *Peperomia*, sendo 40 extratos de *Piper*, 20 de *Peperomia* e 65 de espécies em fase de classificação, observou-se que mais da metade dos extratos (88) apresentou potencial atividade antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* quando submetidos ao ensaio de bioautografia. Destes extratos ativos, 28 eram de espécies de *Piper* e 12 de *Peperomia*.

O percentual observado na bioprospecção é bastante elevado quando comparado com resultados obtidos para extratos de outras espécies coletadas dentro do projeto Biota (*Conservation and Sustainable use of the Plant Diversity from Cerrado and Atlantic Forrest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs* - BIOTA/FAPESP 2003/02176-7).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a importância da família Piperaceae, especialmente do gênero *Piper*, como fonte de substâncias com atividade biológica.

**Tabela 5.** Parte ampliada do banco de extratos do LQPN: dados sobre espécie, parte da planta utilizada, solvente de extração e potencial biológico.

Código	Espécie	Parte da planta	Solvente de extração	Atividade antifúngica	
				<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
KATO 0400	<i>Piper arboreum</i>	folhas	MeOH	**	**
KATO 0401	<i>Peperomia sincorana</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0402	não classificada	folhas	MeOH	**	**
KATO 0421	<i>Piper mollicomum</i> Kunth	folhas	MeOH	***	***
KATO 0422	<i>Piper mollicomum</i> Kunth	folhas	MeOH	***	***
KATO 0431	<i>Piper diospyrifolium</i> Kunth	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	*	***
KATO 0469	<i>Piper cubataonum</i> C. DC.	folhas	MeOH	***	i
KATO 0472	não classificada	folhas	MeOH	***	*
KATO 0473	<i>Piper solmsianum</i> C. DC.	folhas	MeOH	**	i
KATO 0474	<i>Piper cubataonum</i> C. DC.	folhas	MeOH	*	i
KATO 0475	<i>Piper malacophyllum</i> (Presl.) C.DC.	folhas	MeOH	**	***
KATO 0476	<i>Piper solmsianum</i> C. DC.	folhas	MeOH	i	i
KATO 0477	<i>Piper caldense</i> C. DC.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
KATO 0480	<i>Piper caldense</i> C. DC.	folhas	MeOH	*	**
KATO 0482	<i>Peperomia nitida</i> Dahlst.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	*
KATO 0484	<i>Piper caldense</i> C. DC.	folhas	MeOH	*	**
KATO 0486	Ref. <i>Piper belvedere</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0488	Ref. <i>Piper solmsianum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0493	<i>Piper cubataonum</i> C. DC.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
KATO 0494	Ref. <i>Piper richardifolium</i>	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	*	**
KATO 0496	não classificada	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	*	*
KATO 0497	não classificada	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	***	***
KATO 0500	<i>Piper amalago</i> L.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	*	***
KATO 0501	<i>Peperomia glabella</i> (Sw.) A. Dietr	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	**	i
KATO 0502	<i>Peperomia arifolia</i> Miq.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
KATO 0503	não classificada	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
KATO 0505	<i>Peperomia rupestris</i> Humb., Bonpl. & Kunth	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
KATO 0507	<i>Peperomia rubricaulis</i> (Ness) A. Dietr.	folhas	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 2:1	i	i
<b>KATO 0511</b>	<b><i>Peperomia glabella</i> (Sw.) A. Dietr</b>	<b>folhas</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 2:1</b>	<b>**</b>	<b>*</b>
KATO 0517	<i>Peperomia blanda</i> (Jacq.) Humb., Bonpl. & Kunth	folhas	MeOH	i	i
KATO 0519	não classificada	folhas	MeOH	**	*
KATO 0520	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0525	Ref. <i>Piper crassinervium</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0526	Ref. <i>Peperomia blanda</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0528	não classificada	frutos	MeOH	*	*
KATO 0533	não classificada	folhas	MeOH	**	**

Código	Espécie	Parte da planta	Solvente de extração	Atividade antifúngica	
				<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
KATO 0534	não classificada	folhas	MeOH	i	**
KATO 0535	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0536	Ref. <i>Peperomia pereskiaefolia</i>	folhas	MeOH	i	**
KATO 0537	não classificada	folhas	MeOH	*	*
KATO 0543	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0544	Ref. <i>Piper regnelli</i>	folhas	MeOH	**	***
KATO 0545	Ref. <i>Piper crassinervium</i>	folhas	MeOH	**	***
KATO 0547	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0564	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0567	não classificada	folhas	MeOH	*	*
KATO 0571	Ref. <i>Piper solmsianum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0572	não classificada	folhas	MeOH	**	*
KATO 0573	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0574	não classificada	folhas	MeOH	*	*
KATO 0575	não classificada	folhas	MeOH	**	**
KATO 0576	não classificada	folhas	MeOH	*	***
KATO 0577	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0578	Ref. <i>Peperomia galioides</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0579	Ref. <i>Peperomia oreophila</i>	folhas	MeOH	**	***
KATO 0584	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0585	não classificada	folhas	MeOH	**	**
KATO 0587	Ref. <i>Piper amplum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0588	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0592	<i>Peperomia blanda</i>	folhas	MeOH	*	i
KATO 0593	<i>Piper richardiaefolium</i>	folhas	MeOH	*	i
KATO 0596	<i>Piper laevicarpu</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0597	<i>Piper truncatum</i>	folhas	MeOH	*	*
KATO 0598	<i>Piper pseudopothifolium</i> C. DC.	folhas	MeOH	***	***
KATO 0600	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0601	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0604	Ref. <i>Piper solmsianum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0605	Ref. <i>Piper crassinervium</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0608	<i>Peperomia choroniana</i> C.DC.	folhas	MeOH	*	**
KATO 0609	<i>Peperomia tetraphylla</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0611	não classificada	folhas	MeOH	*	i
KATO 0612	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0615	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0616	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0618	Ref. <i>Peperomia pseudoestrellensis</i>	folhas	MeOH	**	**
KATO 0621	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0623	não classificada	folhas	MeOH	i	*
KATO 0624	<i>Peperomia subrubripica</i> C. DC.	folhas	MeOH	i	*

Código	Espécie	Parte da planta	Solvente de extração	Atividade antifúngica	
				<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
KATO 0628	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0629	<i>Peperomia quadrifolia</i> (L.) Kunth	folhas	MeOH	***	*
KATO 0630	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0631	não classificada	folhas	MeOH	i	*
KATO 0632	não classificada	folhas	MeOH	*	*
KATO 0633	não classificada	folhas	MeOH	*	*
KATO 0635	Ref. <i>Piper crassinervium</i>	folhas	MeOH	i	*
KATO 0638	não classificada	folhas	MeOH	**	**
KATO 0647	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0662	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0662	não classificada	caules	MeOH	*	i
KATO 0664	Ref. <i>Piper hostmanianum</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0665	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0665	não classificada	frutos	MeOH	*	*
KATO 0667	Ref. <i>Piper crassinervium</i>	folhas	MeOH	**	**
KATO 0668	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0670	não classificada	folhas	MeOH	**	**
KATO 0672	<i>Piper hispidum</i>	folhas	MeOH	*	i
KATO 0673	não classificada	folhas	MeOH	*	**
KATO 0675	<i>Piper hispidum</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0677	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0678	não classificada	folhas	MeOH	**	***
KATO 0679	<i>Piper divaricatum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0681	não classificada	folhas	MeOH	**	*
KATO 0683	<i>Piper arboreum</i>	folhas	MeOH	***	**
KATO 0684	não classificada	folhas	MeOH	**	*
KATO 0685	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0685	não classificada	raízes	MeOH	***	***
KATO 0686	<i>Piper hispidum</i>	folhas	MeOH	i	i
KATO 0687	<i>Piper aduncum</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0688	<i>Piper arboreum</i>	folhas	MeOH	***	***
KATO 0690	<i>Peperomia sincorana</i>	folhas	MeOH	*	*
KATO 0698	<i>Peperomia nitida</i>	folhas	MeOH	*	**
KATO 0760	<i>Piper hostmanianum</i>	folhas	MeOH	*	**
KATO 0760	<i>Piper hostmanianum</i>	raízes	MeOH	***	***
KATO 0761	não classificada	folhas	MeOH	***	*
KATO 0762	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0763	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0764	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0768	não classificada	folhas	MeOH	***	***
KATO 0772	não classificada	folhas	MeOH	***	**
KATO 0777	não classificada	folhas	MeOH	i	i

Código	Espécie	Parte da planta	Solvente de extração	Atividade antifúngica	
				<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
KATO 0777	não classificada	frutos	MeOH	i	i
KATO 0777	não classificada	raízes	MeOH	**	*
KATO 0782	não classificada	folhas	MeOH	i	i
KATO 0782	não classificada	frutos	MeOH	*	**
KATO 0789	não classificada	folhas	MeOH	*	i

\* inibição fraca;

\*\* inibição moderada;

\*\*\* inibição forte;

i inativo;

Ref.: referência à espécie citada; as espécies não citadas não foram classificadas.

## 4.2. Elucidação e identificação estrutural dos produtos naturais isolados

### 4.2.1. Cromenos

Os cromenos **1** e **2** foram isolados das folhas de *Piper mollicomum*. Ambos foram caracterizados pela análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparados aos dados da literatura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** (Tabela 6) revela a presença de hidrogênios de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, devido aos sinais em  $\delta$  7,72 (dd,  $J = 8,7$  e  $1,5$  Hz, 1H), em  $\delta$  7,58 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H) e em  $\delta$  6,69 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H). Estes sinais, associados à presença de dois dubletos em  $\delta$  6,25 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  5,55 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), característicos de hidrogênios de uma ligação dupla de configuração *cis*, sugerem a ocorrência de um cromeno. Essa classe de metabólitos é confirmada pela presença de um singlete intenso em  $\delta$  1,36 (6H, H-9 e 10), atribuído aos dois grupos metílicos do anel pirânico. Neste espectro, observa-se ainda um singlete em  $\delta$  3,78 que pode ser atribuído a um grupo carboximetílico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **1** (Tabela 6) apresenta sinais de carbonos aromáticos em  $\delta$  116,1 - 157,2, e um sinal de carbono carbinólico em  $\delta$  77,4 (C–O) que associado a um pico intenso  $\delta$  28,3 (2 x  $\text{CH}_3$ ) e carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  121,7 e 128,1 (C-3 e 4, respectivamente) sugere também a ocorrência de um cromeno.

Assim, a estrutura do cromeno **1** foi definida como 2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 21), cujos dados espectroscópicos são idênticos aos descritos na literatura (Díaz *et al.*, 1987).

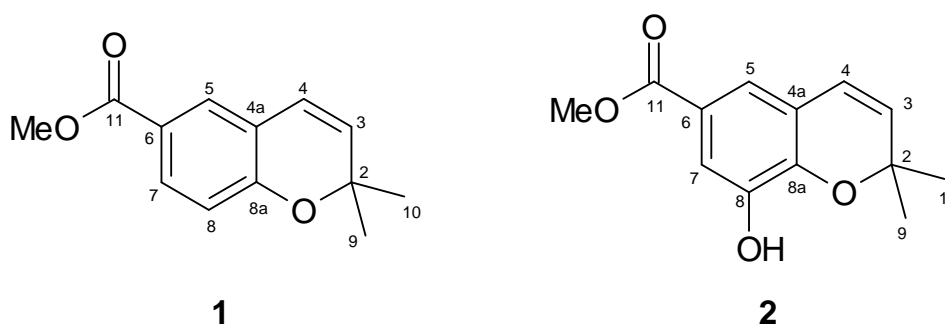
Do mesmo modo, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** (Tabela 6) sugere a ocorrência de um cromeno, visto que foram observados dois dubletos em  $\delta$  5,63 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e em 6,33 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), e um singlete intenso em  $\delta$  1,46 (6H, H-9 e 10). No entanto, a análise da região referente aos hidrogênios do anel aromático sugere um perfil distinto de **1**, pois foram observados apenas dois dubletos em  $\delta$  7,45 ( $J = 1,8$  Hz, 1H) e em  $\delta$  7,30 ( $J = 1,8$  Hz, 1H), característicos de um sistema 1,2,3,5-tetrassubstituído. Esses dados, associados aos obtidos a partir da EM, na qual o pico do íon molecular foi detectado em  $m/z$  234 Da, indicam a adição de um grupo hidroxílico ao anel aromático.

Assim, por apresentar dados espectroscópicos idênticos aos descritos na literatura (Orjala *et al.*, 1993a), a estrutura **2** foi definida como 8-hidróxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila (Figura 21).

Os cromenos **1** e **2**, descritos pela primeira vez em *P. mollicomum*, são encontrados em outras espécies do mesmo gênero, como *P. hostmannianum* (Díaz *et al.*, 1987), *P. aduncum* (Orjala *et al.*, 1993a; Baldoqui *et al.*, 1999), *P. taboganum* (Roussis *et al.*, 1990) e *P. dilatatum* (Terreaux *et al.*, 1998). A ocorrência de outros derivados dessa classe de compostos está descrita para

*P. Ihotzkyanum* (Moreira *et al.*, 1998; Lago *et al.*, 2007) e *P. gaudichaudianum* (Lago *et al.*, 2004).

Os cromenos são também encontrados em algumas espécies do gênero *Peperomia*, como *Peperomia villipetiola* (Salazar *et al.*, 2005), *Peperomia serpens* (Kitamura *et al.*, 2006) e *Peperomia blanda* (Veloza *et al.*, 2006).



**Figura 21.** Estruturas dos cromenos isolados das folhas de *Piper mollicomum*.

**Tabela 6.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **1** e **2** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	-	77,4	-	78,5
3	5,55 (d, 10,0)	121,7	5,63 (d, 10,0)	130,8
4	6,25 (d, 10,0)	128,1	6,33 (d, 10,0)	122,8
4a	-	120,6	-	120,5
5	7,58 (d, 1,5)	131,1	7,30 (d, 1,8)	119,9
6	-	122,6	-	122,8
7	7,72 (dd, 8,7 e 1,5)	131,0	7,45 (d, 1,8)	116,3
8	6,69 (d, 8,7)	116,1	-	143,4
8a	-	157,2	-	144,1
9 e 10	1,36 (s) (x 2)	28,3 (x 2)	1,46 (s) (x 2)	28,3 (x 2)
11	-	166,8	-	166,8
-OMe	3,78 (s)	51,8	3,84 (s)	51,9



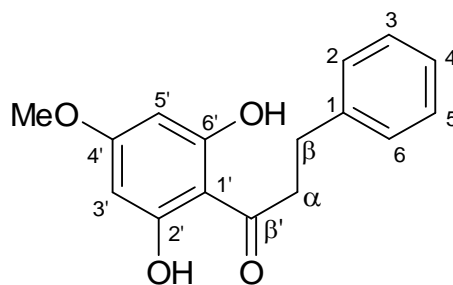
### 4.2.2. Di-hidrochalcona

A di-hidrochalcona **3** (Figura 22) foi isolada após fracionamento biomonitorado das folhas de *Piper mollicomum*.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **3** (Tabela 7), a presença de dois tripletos em  $\delta$  3,02 ( $J = 7,3$  Hz, 2H) e 3,40 ( $J = 7,3$  Hz, 2H), associada a um pico em  $\delta$  5,91 (2H) e um multipletto em  $\delta$  7,1 - 7,3 (5H), sugere a estrutura de uma di-hidrochalcona.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **3** (Tabela 7) apresenta sinais referentes a um grupo carbonílico em  $\delta$  204,8 (C=O), anel aromático em  $\delta$  93,7 - 165,6, além de carbonos alifáticos em  $\delta$  45,5 (CH<sub>2</sub>), 30,6 (CH<sub>2</sub>) e 55,3 (CH<sub>3</sub>). Esses dados, quando comparados aos da literatura (Orjala *et al.*, 1994), confirmam a estrutura da di-hidrochalcona **3**, e sua identificação como 2',6'-dihidroxi-4'-metóxidi-hidrochalcona.

Apesar da alta ocorrência de flavonóides em espécies de *Piper* (Parmar *et al.*, 1997), a presença de di-hidrochalconas no gênero está restrita a *P. aduncum* (Orjala *et al.*, 1993; Orjala *et al.*, 1994; Burke e Nair, 1986), *P. hispidum* (Burke e Nair, 1986; Vieira *et al.*, 1980), *P. longicaudatum* (Joshi *et al.*, 2001), *P. hostmannianum* (Portet *et al.*, 2007) e *P. fadyenii* (Nair *et al.*, 1986).



**Figura 22.** Estrutura da di-hidrochalcona **3** isolada das folhas de *Piper mollicomum*.

**Tabela 7.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **3** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	141,8
2	*	128,5
3	*	128,3
4	*	125,8
5	*	128,3
6	*	128,5
$\alpha$	3,40 (t, 7,3)	45,5
$\beta$	3,02 (t, 7,3)	30,6
$\beta'$	-	204,8
1'	-	105,1
2'	-	165,6
3'	5,91 (s)	93,7
4'	-	163,2
5'	5,91 (s)	93,7
6'	-	165,6
-OMe	3,79 (s)	55,3

\*sinais sobrepostos dos hidrogênios de anel aromático em  $\delta$  7,1 - 7,3 (m).

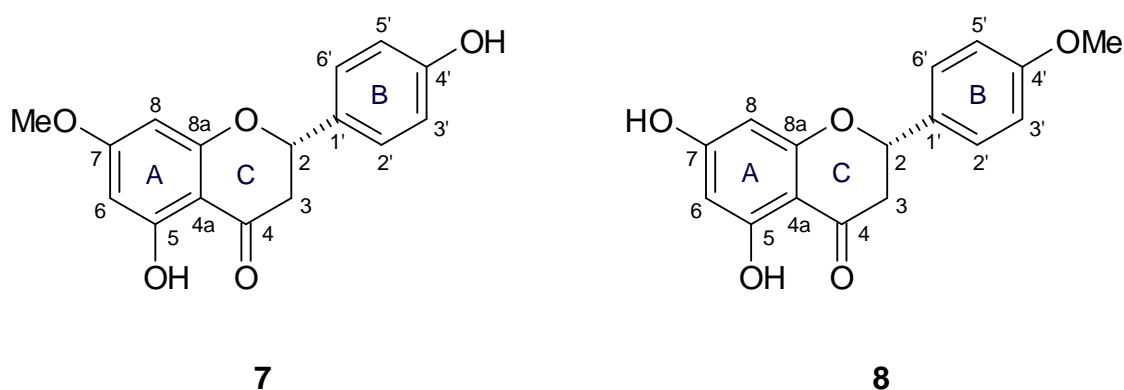
### 4.2.3. Flavanonas

Duas flavanonas, sakuranetina (**7**) e 4'-O-metil-naringenina (**8**) (Figura 23), foram isoladas das folhas de *Piper marginatum*.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **7** e **8** (Tabela 8) apresentam sinais característicos de hidrogênios que compõem os anéis aromáticos de flavonóides, além de hidrogênios metoxílicos ligados a anel aromático. Os dois dubletos em  $\delta$  6,05 ( $J = 2,4$  Hz, 1H) e em  $\delta$  6,02 ( $J = 2,4$  Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, indicam o anel aromático *A* com substituintes nas posições 5, 7, 4a e 8a.

Para o anel *B*, os dubletos observados em  $\delta$  6,86 ( $J = 8,4$  Hz, 2H), referentes aos hidrogênios H-3' e H-5', e em  $\delta$  7,31 ( $J = 8,7$  Hz, 2H), referentes aos hidrogênios H-2' e H-6', indicam a presença de um anel aromático *para*-dissubstituído. Um grupo metoxílico ligado a um anel aromático é indicado pelo singlete em  $\delta$  3,78 (3H).

A definição da natureza das substâncias **7** e **8** como flavanonas foi inferida através da presença de três duplos dubletos em  $\delta$  5,33 ( $J = 12,9$  e 3,0 Hz, 1H), em  $\delta$  3,07 ( $J = 17,1$  e 12,9 Hz, 1H, H-3b<sub>trans</sub>) e em  $\delta$  2,76 ( $J = 17,1$  e 3,0 Hz, 1H, H-3a<sub>cis</sub>), que indicam a ausência de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 nestas estruturas.



**Figura 23.** Estruturas das flavanonas **7** e **8** isoladas das folhas de *Piper marginatum*.

**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) de **7** e **8** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>7 e 8</b>
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)
2	5,33 (dd, 12,9 e 3,0)
3a	2,76 (dd, 17,1 e 3,0)
3b	3,07 (dd, 17,1 e 12,9)
6	6,05 (d, 2,4)
8	6,02 (d, 2,4)
2' e 6'	7,31 (d, 8,7)
3' e 5'	6,86 (d, 8,7)
-OMe	3,78 (s)

De particular importância para a determinação da flavanona **7** foi a fragmentação clássica Retro Diels-Alder no espectro de massas, indicada pelos íons em  $m/z$  167/120, que permitiram posicionar o grupo metoxílico em C-7. Assim, com dados espectroscópicos idênticos aos descritos na literatura (Danelutte *et al.*, 2003 e Liu *et al.*, 1992), a estrutura de **7** foi definida como 5,4'-dihidróxi-7-metóxi-flavonona (sakuranetina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **8** apresentou-se muito próximo ao da substância **7**. A análise por CG-EM possibilitou a verificação de que se tratava da mesma substância, porém, com inversão nas posições dos grupos metóxi e hidroxílicos, indicada pelos íons em  $m/z$  134/152 no espectro de massas, que permitiram posicionar o grupo metoxílico em C-4'. Assim, a estrutura **8** foi identificada como 5,7-dihidróxi-4'-metóxi-flavonona (Danelutte *et al.*, 2003 e Liu *et al.*, 1992).

A ocorrência de flavanonas está descrita para diversas espécies de *Piper*, como por exemplo *P. hostmanianum* (Díaz *et al.*, 1987), *P. hispidum* (Vieira *et al.*, 1980; Burke e Nair, 1986), *P. carniconnectivum* (Facundo *et al.*, 2004), *P. aduncum* (Burke e Nair, 1986), *P. crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003) e *P. lhotzkyanum* (Moreira *et al.*, 2000).

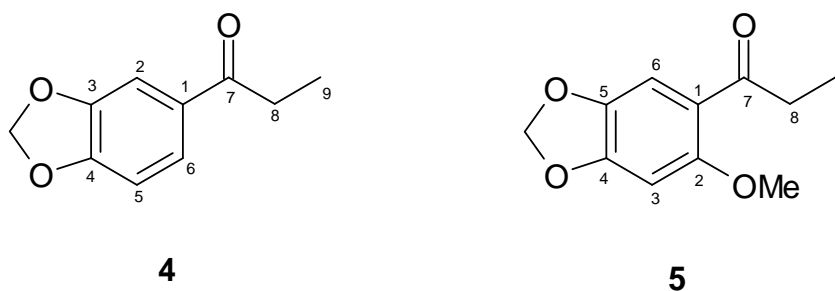
#### 4.2.4. Fenilpropanóides

Três derivados fenilpropanóicos **4** - **6** foram isolados do extrato metanólico das folhas de *Piper marginatum*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** (Tabela 9) indica um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído, devido aos sinais  $\delta$  7,65 (dd,  $J = 8,5$  e  $1,5$  Hz, 1H), em  $\delta$  7,51 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), e  $\delta$  6,92 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H). Esses sinais,

associados à presença de um tripleto em  $\delta$  1,30 ( $J = 7,6$  Hz) e de quarteto em  $\delta$  3,00, típicos de um grupo  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ , sugerem a ocorrência de uma propiofenona. A literatura descreve a presença de derivados desta classe em *P. marginatum* (De Diaz e Gottlieb, 1979), o que confirma a proposta estrutural. Finalmente, um singlete em  $\delta$  6,10, característico de grupos metilenodioxílicos, indica para **4** a estrutura de 3,4-metilenodioxipropilfenona (Figura 24), cujos dados espectroscópicos conferem com os descritos na literatura (De Diaz e Gottlieb, 1979).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **4** e **5** (Tabela 9) são muito semelhantes, exceto pelo perfil dos hidrogênios de anel aromático e pela presença adicional, em **5**, de um sinal referente um grupo metoxílico em  $\delta$  3,78. Os dois singletos em  $\delta$  7,24 ( $J = 1,2$  Hz) e  $\delta$  6,46 ( $J = 1,2$  Hz) são indicativos de um anel aromático 1,2,4,5- tetrassubstituído, o que posiciona o grupo metoxílico em C-2. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e EM são concordantes com aqueles descritos na literatura (De Diaz e Gottlieb, 1979) para 2-metóxi-4,5-metilenodioxipropiofenona (**5**) (Figura 24).



**Figura 24.** Estruturas das propiofenonas **4** e **5** isoladas das folhas de *Piper marginatum*.

**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **4** e **5** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>4</b>		<b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	131,8	-	120,6
2	7,51 (d, 1,5)	107,7	-	156,6
3	-	148,1	6,46 (d, 1,2)	94,2
4	-	151,5	-	152,0
5	6,92 (d, 8,5)	107,8	-	141,6
6	7,65 (dd, 8,5, 1,5)	124,0	7,24 (d, 1,2)	109,1
7	-	198,8	-	200,6
8	3,00 (q, 7,6)	31,5	2,87 (q, 7,5)	36,8
9	1,30 (t, 7,6)	8,4	1,46 (t, 7,5)	8,5
OCH <sub>2</sub> O	6,10 (s)	101,7	6,10 (s)	101,8
-OMe	-	-	3,78 (s)	56,2

Em estudos anteriores realizados em *P. marginatum*, descreve-se a presença de derivados fenilpropanóicos (Santos e Chaves, 1999; Santos *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1997), incluindo as propiofenonas **4** e **5** (De Diaz e Gottlieb, 1979; Santos e Chaves, 2000). Não há relato da ocorrência dessas propiofenonas em outras espécies de *Piper*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  de **6** não apresentou resolução suficiente para a determinação dos acoplamentos previstos com base na estrutura proposta após a análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **6**. Desta forma, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi registrado em  $\text{C}_6\text{D}_6$ , o que possibilitou uma melhoria na resolução dos sinais.

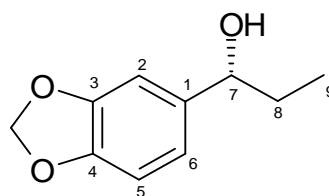
Assim, a análise da região de hidrogênios de anel aromático no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{C}_6\text{D}_6$  de **6** (Figura 26 e Tabela 10) indica a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, similar ao observado para **4**. No entanto, os valores

de deslocamentos químicos de H-2 ( $\delta$  6,82, d,  $J = 1,8$  Hz) e H-6 ( $\delta$  6,55, dd,  $J = 8,8$  e  $1,8$  Hz), mais protegidos que correspondentes em **4**, sugerem a ausência do sistema carbonílico conjugado ao anel aromático.

A presença de um tripleto em  $\delta$  4,15 ( $J = 6,6$  Hz, 1H) indica a ocorrência de um hidrogênio oxibenzílico, e a presença de um multiplete em  $\delta$  1,55 (2H) e um tripleto em  $\delta$  0,79 ( $J = 7,5$  Hz, 3H) indicam um grupo etila. Tal padrão foi confirmado pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28 e Tabela 10) que, ao invés de apresentar um sinal em aproximadamente  $\delta$  200 (C=O), mostrou um pico em  $\delta$  75,9 (CH), referente a um carbono carbinólico. Dessa forma, a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  confirma a ocorrência de um álcool secundário.

A presença do grupo hidroxílico foi confirmada pela espectroscopia no IV, devido à típica banda larga em  $3383\text{ cm}^{-1}$  (Figura 29).

Finalmente, no espectro de massas de **6** (Figura 30) observa-se o pico do íon molecular em  $m/z$  180 Da, que está de acordo com a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ . Dessa forma, a estrutura inédita de **6** foi definida como sendo o 3,4-metilenodioxi-1-(1'-hidroxipropil) benzeno, denominada marginatumol.

**6**

**Figura 25.** Estrutura de **6** isolado das folhas de *Piper marginatum*.

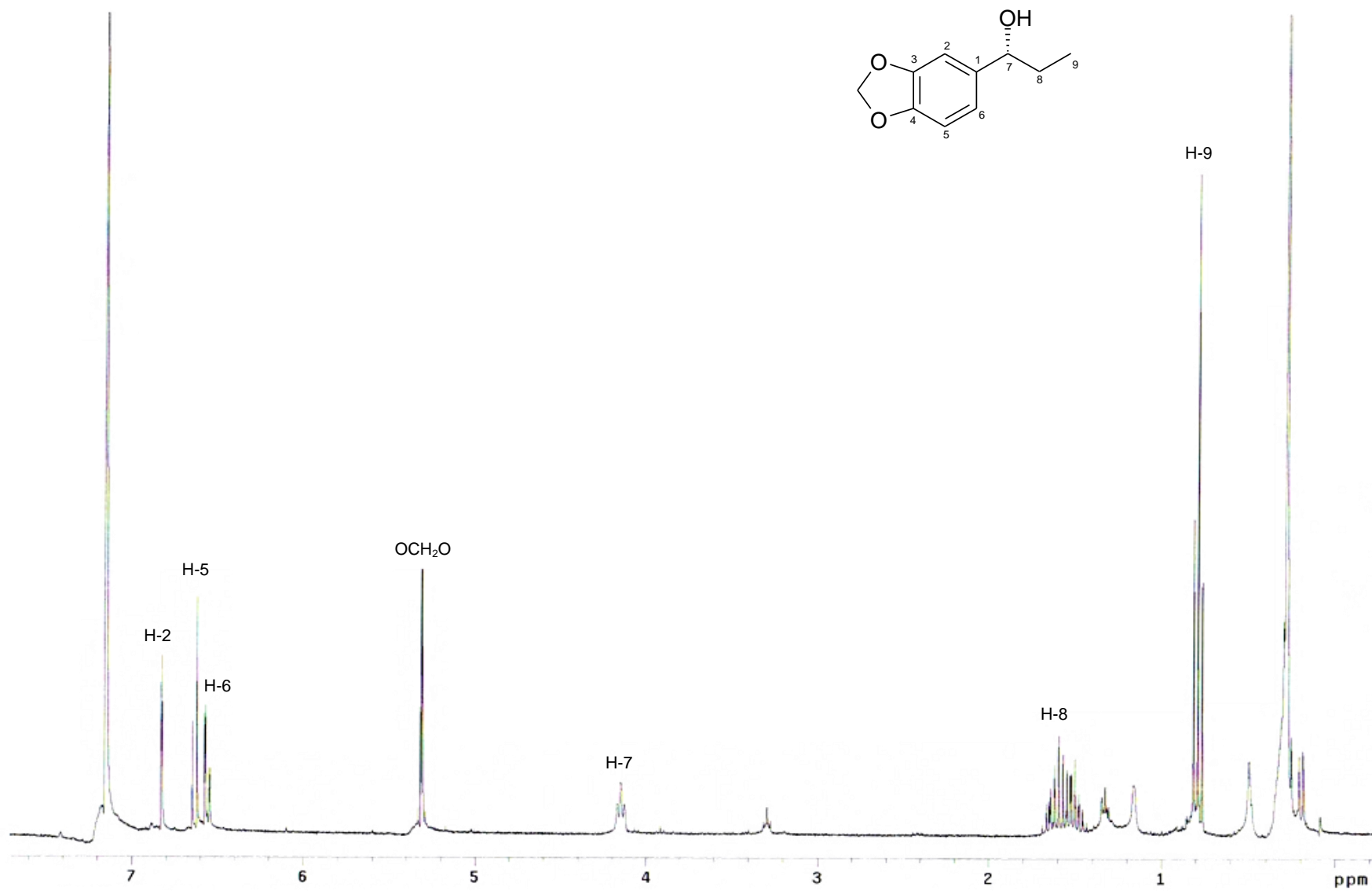
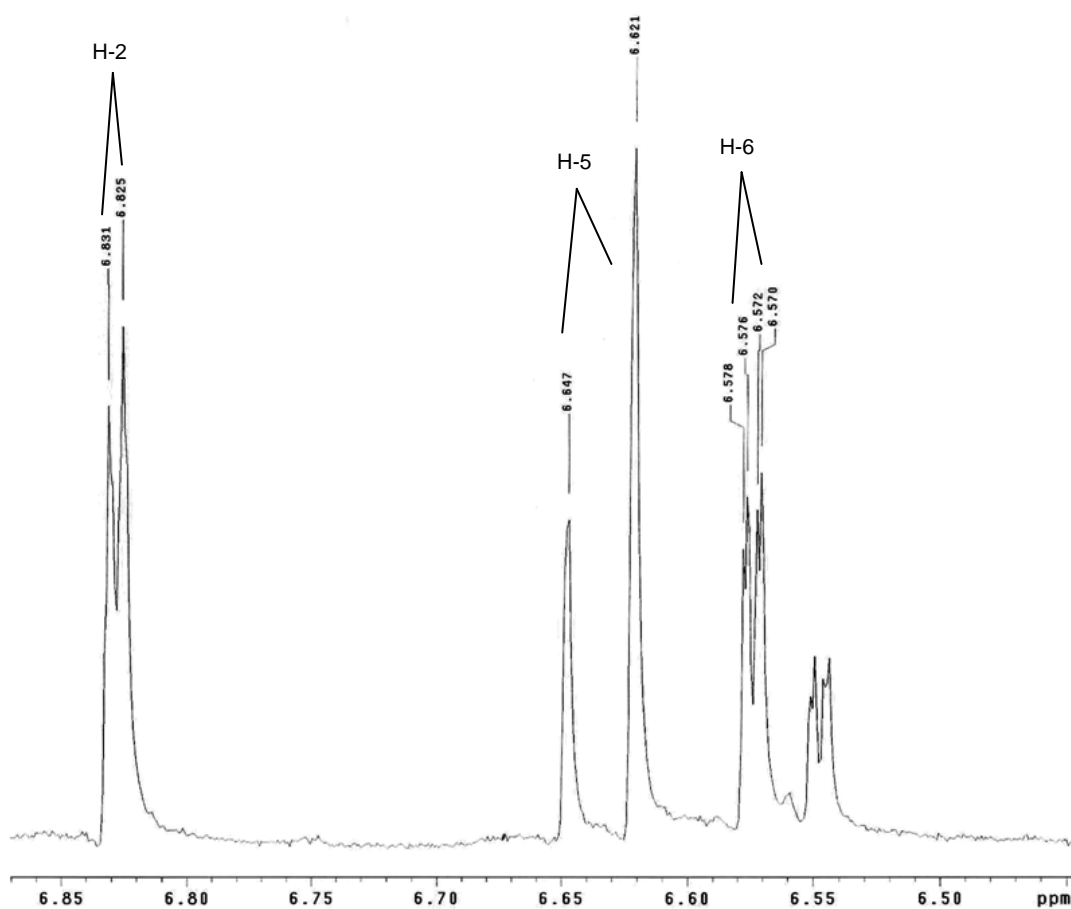


Figura 26. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (300 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).





**Figura 27.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (300 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **6** ( $\delta$  ppm,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

Posição	<b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	138,7
2	6,82 (d, 1,8)	106,4
3	-	146,9
4	-	147,8
5	6,63 (d, 8,8)	108,0
6	6,55 (dd, 8,8; 1,8)	119,4
7	4,15 (t, 6,6)	75,9
8	1,55 (m)	31,8
9	0,79 (t, 7,5)	10,1
$\text{OCH}_2\text{O}$	5,30 (s)	100,9

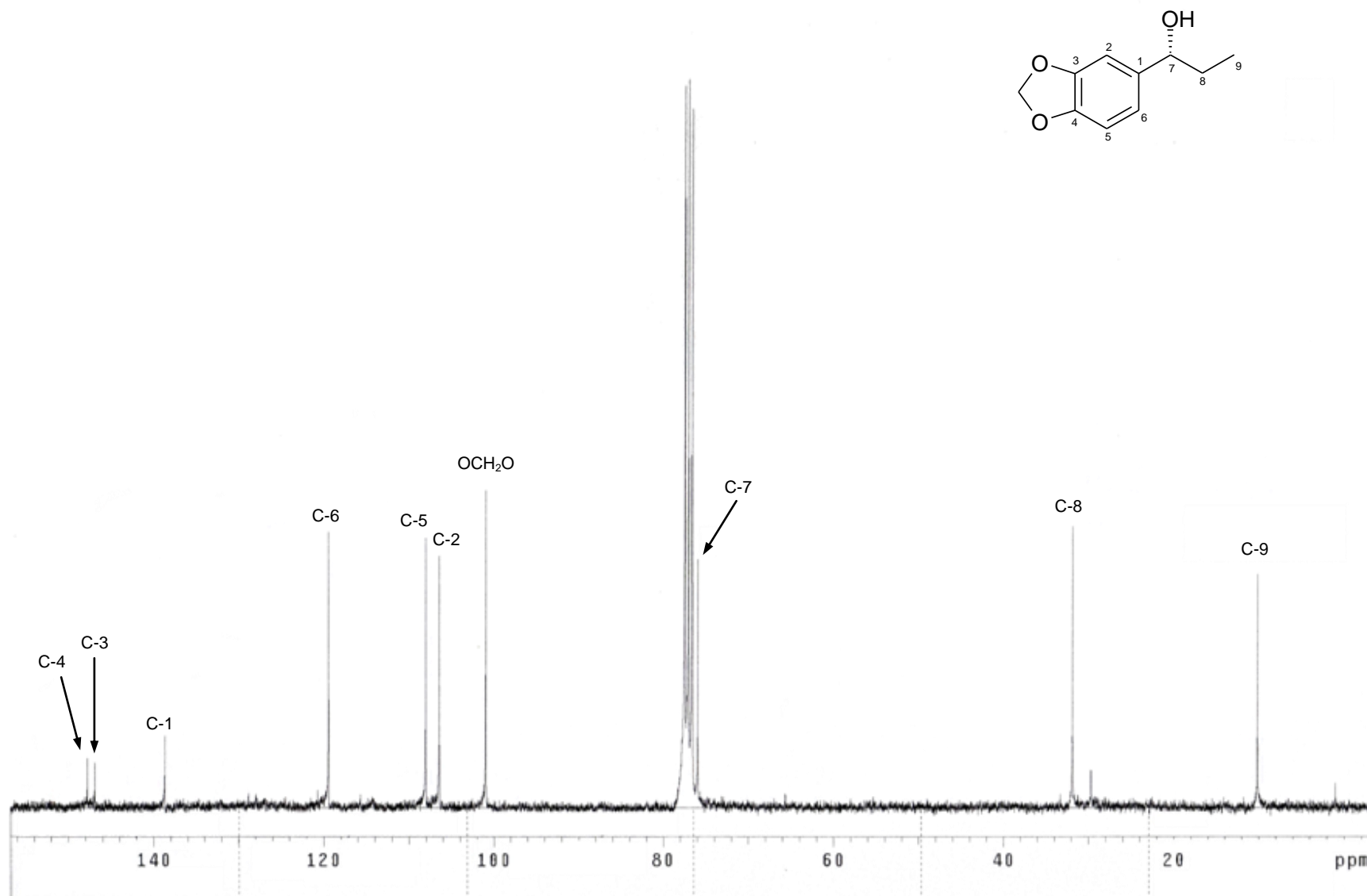


Figura 28. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **6** (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

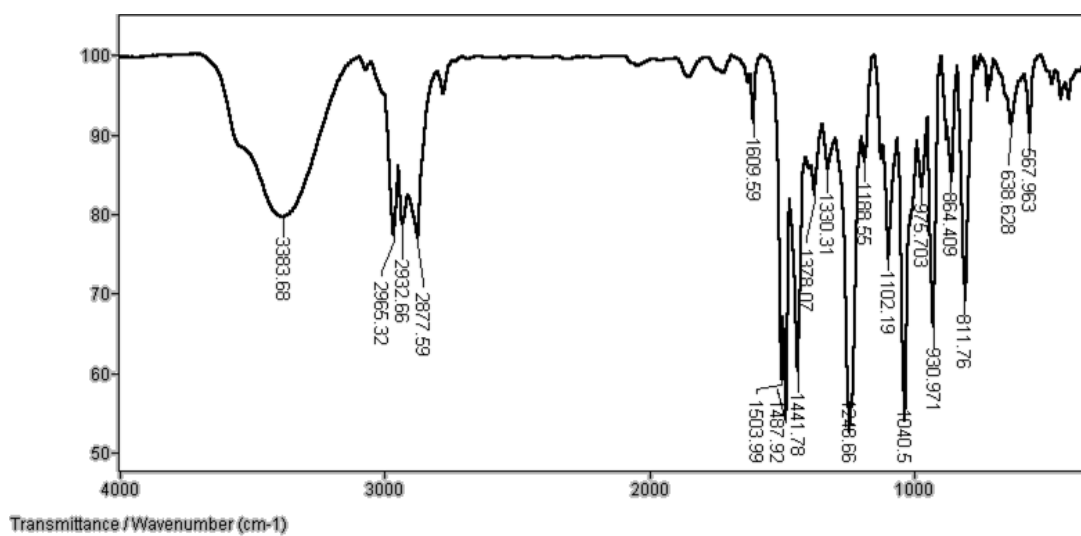


Figura 29. Espectro no IV (KBr) de 6.

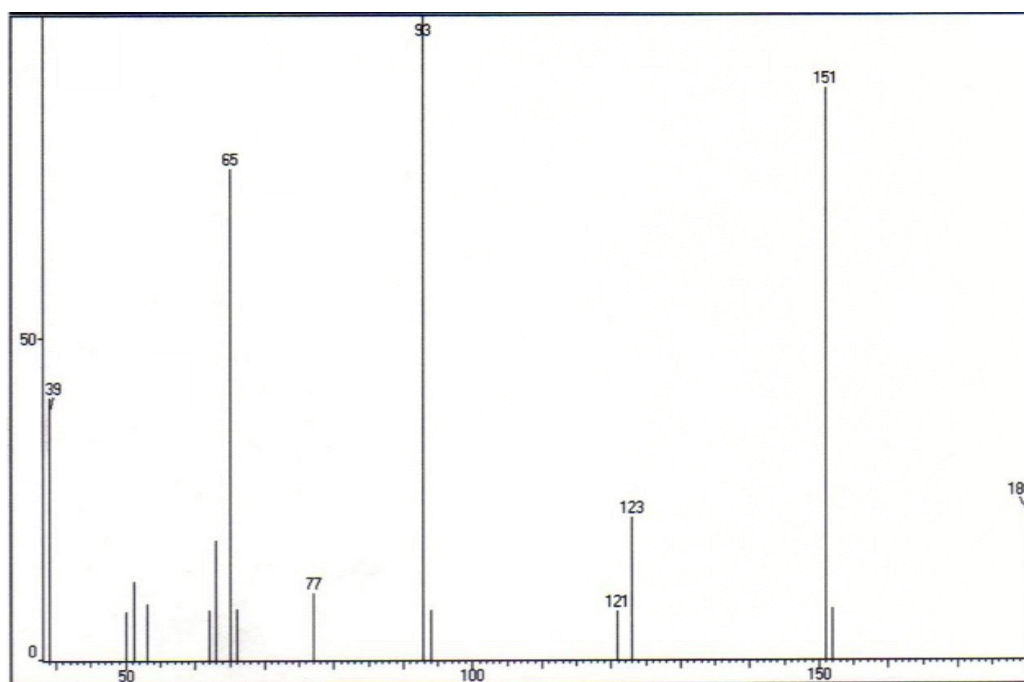


Figura 30. Espectro de massas de 6 (IE, baixa resolução).

#### 4.2.4.1. Determinação da configuração absoluta do marginatumol

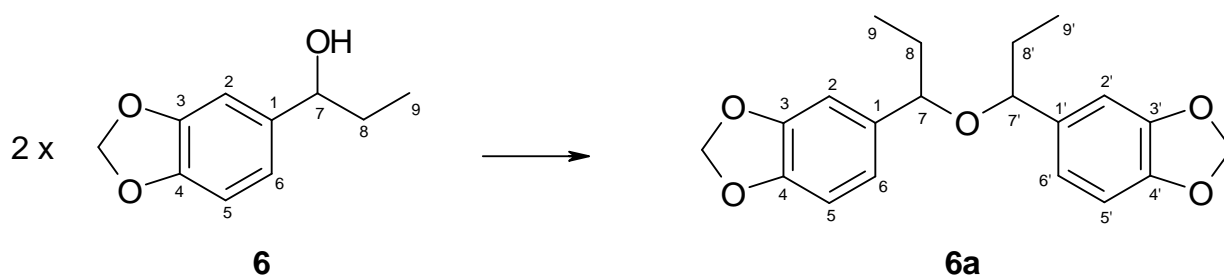
Após o isolamento e elucidação de **6**, obteve-se um cromatograma em CG em fase quiral (coluna de  $\beta$ -ciclodextrina) do produto natural, que indicou a presença de duas substâncias de tempo de retenção  $t_R = 49,3$  e  $49,8$  min, com excesso enantiomérico de 48% do  $t_R = 49,3$ .

Durante o processo de determinação da configuração de **6**, novos espectros foram obtidos, e observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , o aparecimento de dois tripletos em  $\delta$  0,76 ( $J = 7,4$  Hz) e  $\delta$  0,69 ( $J = 7,4$  Hz), outros dois tripletos em  $\delta$  4,08 ( $J = 6,5$  Hz) e  $\delta$  3,79 ( $J = 6,9$  Hz), e um multipletto em  $\delta$  1,73 sugerindo a formação de outro derivado (Figura 31).

A identidade do produto formado foi sugerida através de experimento de CG-EM (Figura 32), no qual foram observados dois picos, sendo o majoritário (70%) correspondente a uma substância de massa molecular 180 Da [3,4-metilenodioxil-1-(1'-hidróxilpropil) benzeno (**6**)] e outro correspondente a uma substância com massa molecular 342 Da (**6a**).

O registro do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura e a análise dos sinais confirmam a identidade de **6a** devido aos dois sinais em  $\delta$  80,6 (CH) e  $\delta$  79,6 (CH), atribuídos aos carbonos carbinólicos, além daqueles referentes a carbonos aromáticos e alifáticos, todos esses obtidos após a separação dos picos correspondentes aos carbonos de **6** (Tabela 11).

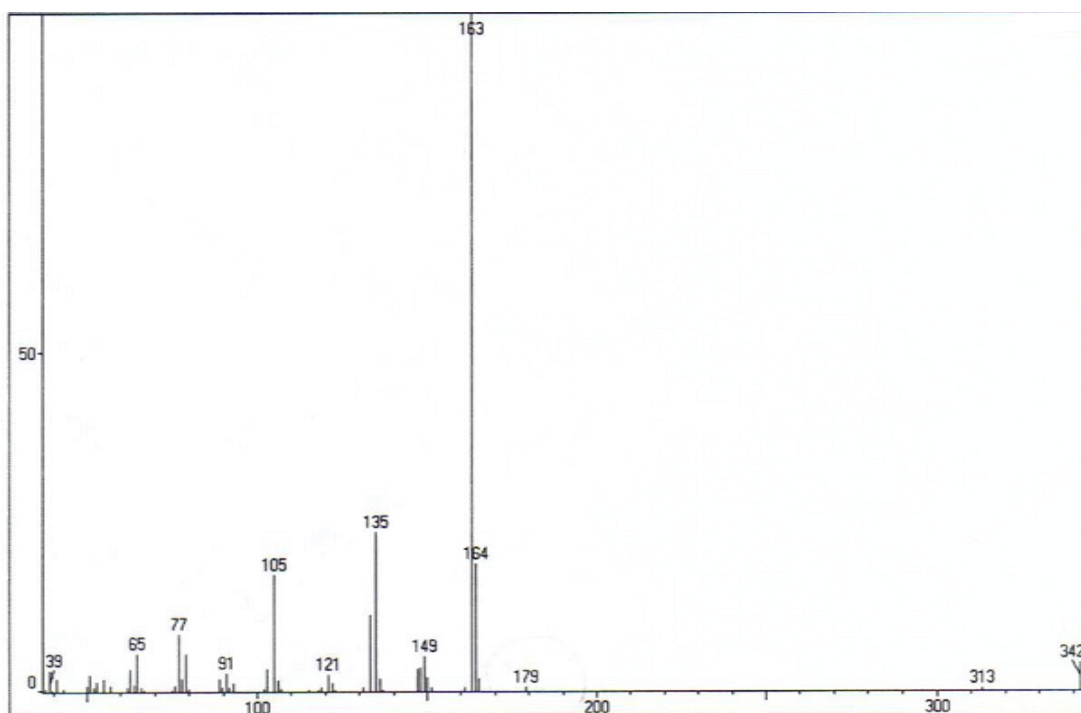
Tal formação pode ser sugerida através da ação dos solventes utilizados para purificação e registro dos espectros ( $\text{CDCl}_3$ ), que por serem polares próticos, favoreceriam a desidratação intermolecular.



**Figura 31.** Desidratação intermolecular de **6** gerando **6a**.

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) **6** e **6a** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

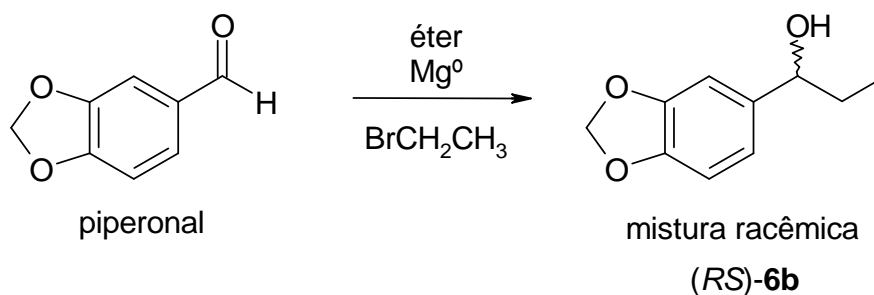
Posição	<b>6</b>		<b>6a</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	138,7	-	137,1
2	6,82 (d, 1,8)	106,4	6,82 (d, 1,8)	107,2
3	-	146,9	-	146,4
4	-	147,8	-	147,4
5	6,63 (d, 8,8)	108,0	6,63 (d, 8,8)	107,8
6	6,55 (dd, 8,8; 1,8)	119,4	6,55 (dd, 8,8; 1,8)	120,7
7	4,44 (t, 6,6)	75,9	4,08 (t, 6,5)	80,6
8	1,62 (m)	31,8	1,49 (m)	31,2
9	0,82 (t, 7,4)	10,1	0,76 (t, 7,4)	10,4
OCH <sub>2</sub> O	5,88 (s)	100,9	5,88 (s)	100,9
1'	-	-	-	136,9
2'	-	-	6,80 (d, 1,8)	107,1
3'	-	-	-	146,4
4'	-	-	-	147,4
5'	-	-	6,58 (d, 8,8)	107,6
6'	-	-	6,52 (dd, 8,8; 1,8)	120,2
7'	-	-	3,79 (t, 6,9)	79,6
8'	-	-	1,73 (m)	29,7
9'	-	-	0,69 (t, 7,4)	9,8
OCH <sub>2</sub> O'	-	-	5,89 (s)	100,7



**Figura 32.** Espectro de massas do derivado **6a** (IE, baixa resolução).

Devido à baixa quantidade do produto natural isolado **6** (5 mg), associada a sua desidratação intermolecular espontânea e a falta de padrões para utilização de técnicas quiróticas, tornou-se necessária a obtenção de novas quantidades de **6** para dar continuidade ao estudo de determinação de sua configuração absoluta.

Sendo assim, foi preparada a mistura racêmica de **6** através de uma reação de Grignard, partindo-se de piperonal e de brometo de etil magnésio (Reigada *et al.*, 2007), obtendo-se como produto final o álcool secundário (*RS*)-**6b** (Figura 33).



**Figura 33.** Preparação de (*RS*)-**6b** através da reação de Grignard.

A mistura racêmica (*RS*)-**6b** foi então submetida à reação de esterificação quimio-enzimática, utilizando-se uma lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435, CALB), acetato de vinila como doador do grupo acetato, e hexano (Raminelli *et al.*, 2004). Através dessa metodologia, foram obtidos (*S*)-álcool **6b** e (*R*)-acetato **6b** (Figura 34), os quais foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) e CG-EM.

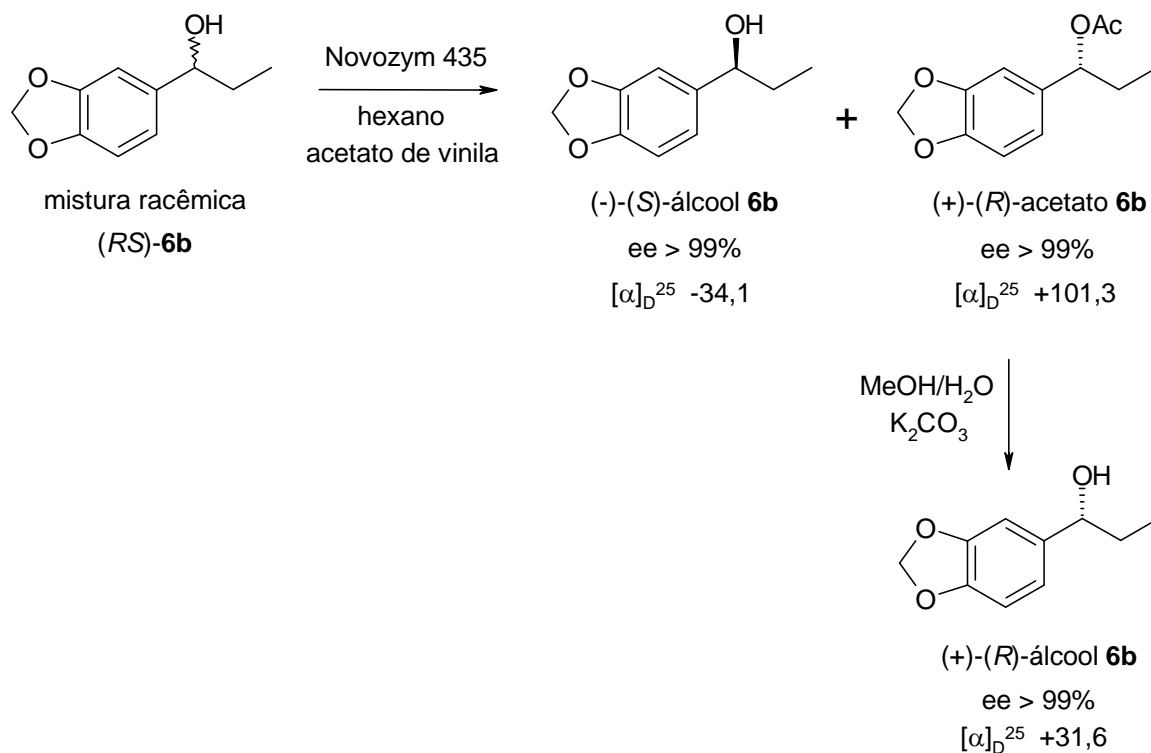
Os excessos enantioméricos do álcool **6b** e do acetato **6b** foram calculados a partir das áreas dos picos dos cromatogramas de CG em fase quiral, e a configuração absoluta de ambos foi sugerida pela estereoquímica preferencial da enzima CALB, baseada na regra de Kazlauskas (Kazlauskas *et al.*, 1991).

Após confirmação estrutural, determinou-se o ângulo específico de rotação dos produtos como: (-)-(*S*)-álcool **6b**  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -34,1$  (*c* 3,26,  $\text{CHCl}_3$ ), e (+)-(*R*)-acetato **6b**,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +101,3$  (*c* 3,10,  $\text{CHCl}_3$ ).

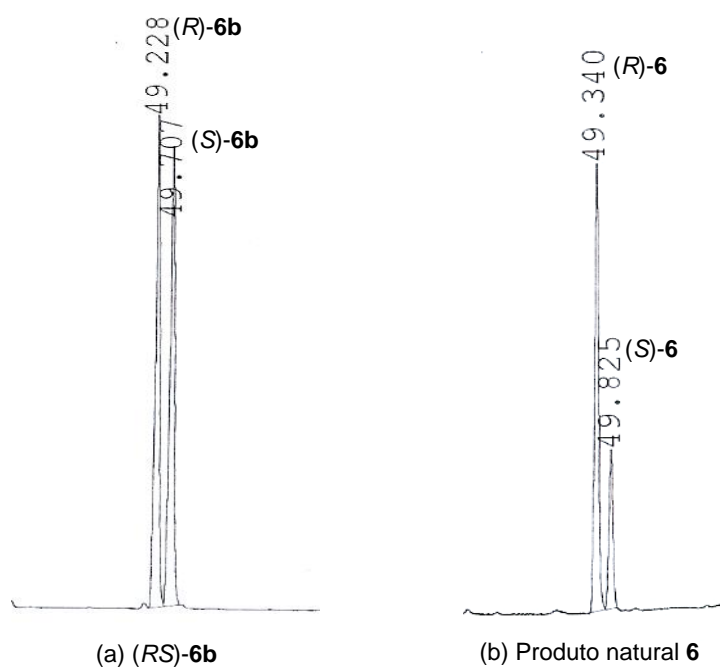
Para a obtenção do enantiômero (+)-(*R*)-álcool **6b**, foi realizada a hidrólise do acetato quiral (+)-(*R*)-acetato **6b** (Figura 34). A rotação específica para este enantiômero foi  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +31,6$  (*c* 3,20,  $\text{CHCl}_3$ ), que confirmou o produto resultante da hidrólise como sendo o (+)-(*R*)-álcool **6b**.

Os alcoóis (-)-(*S*)-álcool **6b** e (+)-(*R*)-álcool **6b** foram analisados por CG em fase quiral. A comparação dos  $t_{\text{R}}$  obtidos com o do produto natural (Figura 35) permitiu concluir que o produto natural **6** é composto predominantemente pelo enantiômero (+)-(*R*)-**6**, denominado (+)-(*R*)-marginatumol (Reigada *et al.*, 2007).

Sínteses quirais envolvidas em processos biocatalíticos, como o apresentado neste trabalho de configuração absoluta, têm provado ser uma efetiva ferramenta na preparação de compostos enantiomericamente puros.



**Figura 34.** Resolução cinética de **(RS)-6b** catalisada por enzima e hidrólise de **(R)-acetato 6b** a **(R)-álcool 6b**.



**Figura 35.** (a) Cromatograma de CG em fase quiral de **(RS)-6b**; (b) Cromatograma de CG em fase quiral do produto natural **6** isolado de *Piper marginatum*.



#### 4.2.5. Derivados policetídicos

Os policetídeos **9** e **10** foram isolados das folhas de *Peperomia alata*, após fracionamento biomonitorado do extrato bruto em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** (Tabela 12, Figura 37 e 38) revela a presença de um grupo fenila monosubstituído ( $\delta$  7,17 - 7,32, multipletto, 5H), que associado à presença de um duplo dubleto em  $\delta$  6,43 ( $J = 15,8$  e  $1,4$  Hz, 1H) e um duplo-tripletto em  $\delta$  6,25 ( $J = 15,8$  e  $7,0$  Hz, 1H) sugere a ocorrência de um sistema aromático contendo uma ligação dupla conjugada. Observou-se também a presença de dois tripletos em  $\delta$  2,47 ( $J = 6,4$  Hz, 2H) e 2,64 ( $J = 6,4$  Hz, 2H), e de um quinteto em  $\delta$  1,95 ( $J = 6,4$  Hz, 2H) característicos de um derivado de cicloexan-1,3-diona (Kato *et al.*, 1985).

Além destes sinais, foi observado um tripletto em  $\delta$  3,22 ( $J = 7,2$  Hz, 2H) e um duplo duplo dubleto (ddd) em  $\delta$  2,53 ( $J = 7,2$ ;  $7,0$  e  $1,4$  Hz, 2H), que quando comparados a dados da literatura (Azevedo *et al.*, 1997), indicam a ocorrência de um sistema fenil-pentenoil, que foi confirmado pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BBD e DEPT 135) através dos sinais em  $\delta$  205,2; 40,4; 27,8; 129,1; 130,7; 137,5; 126,0; 128,4; 126,9, 128,4 e 126,0 (Tabela 12, Figura 39). O espectro indicou ainda a presença de seis sinais, dois relativos a uma carbonila conjugada ( $\delta$  195,2 e 198,1), um referente à ligação dupla ( $\delta$  113,2), e três relativos a carbonos saturados ( $\delta$  33,0, 19,0 e 38,7). Desta forma, foi sugerida a ocorrência de um sistema do tipo 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona, similar a surinona B, isolada anteriormente de *Peperomia sui* (Cheng *et al.*, 2003).

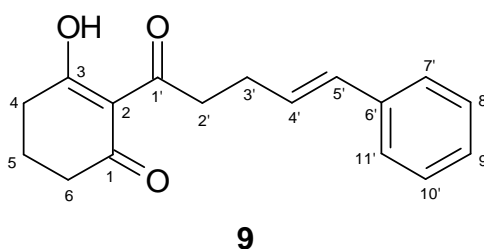
A análise dos espectros de DQF-COSY (Figura 40) e HMQC (Figura 41) permitiu a completa atribuição dos sinais dos hidrogênios e carbonos da estrutura **9**,

devido à correlações de sinais em  $\delta$  3,22 (H-2')/40,4 (C-2')  $\rightarrow$  2,53 (H-3')/27,8 (C-3')  $\rightarrow$  6,25 (H-4')/129,1 (C-4')  $\rightarrow$  6,43 (H-5')/130,7 (C-5') e sinais em  $\delta$  2,64 (H-4)/33,0 (C-4)  $\rightarrow$  1,95 (H-5)/19,0 (C-5)  $\rightarrow$  2,47 (H-6)/38,7 (C-6). O espectro de HMBC (Figura 42 - 45) apresentou correlações a longa distância de H-5 com C-1/C-3, H-6 com C-2/C-4, H-3' com C-1'/C-5' e H-7' com C-5'.

O espectro no infravermelho (Figura 46) apresentou bandas de absorção características de grupo hidroxila quelatado ( $3057\text{ cm}^{-1}$ ), anel aromático ( $2952\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carbonila conjugado ( $1665\text{ cm}^{-1}$ ) e grupo carbonila conjugado e quelatado ( $1558\text{ cm}^{-1}$ ).

A proposta estrutural foi confirmada por espectrometria de massas, que indicou o íon-molecular  $[M^+]$  em  $m/z$  270 (CG-EM, baixa resolução), correspondente à fórmula  $C_{17}H_{18}O_3$ . A espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS) mostrou o pico correspondente ao íon  $[M+H]^+$  em  $m/z$  271,1335 (cálculo para  $C_{17}H_{18}O_3$   $m/z$  271,1335), também confirmando a estrutura proposta (Figura 47).

Assim, a comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (Azevedo *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003; Blumenthal *et al.*, 1997) permitiu a determinação de **9** como sendo 3-hidróxi-2-(5'-fenil-4'-pentenoil)-2-cicloexen-1-ona, de estrutura inédita, denominado alatanona A.



**Figura 36.** Estrutura do policetídeo **9** isolado das folhas de *Peperomia alata*.

**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **9** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>9</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC (H $\rightarrow$ C)	DQF-COSY
1	-	195,2	-	-
2	-	113,2	-	-
3	-	198,1	-	-
4	2,64 (t, 6,4)	33,0	C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>6</sub>	H <sub>5</sub>
5	1,95 (quint, 6,4)	19,0	C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub>	H <sub>4</sub> , H <sub>6</sub>
6	2,47 (t, 6,4)	38,7	C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub>	H <sub>5</sub>
1'	-	205,2	-	-
2'	3,22 (t, 7,2)	40,4	C <sub>1'</sub> , C <sub>3'</sub> , C <sub>4'</sub>	H <sub>3'</sub>
3'	2,53 (ddd, 7,2; 7,0; 1,4)	27,8	C <sub>1'</sub> , C <sub>2'</sub> , C <sub>5'</sub>	H <sub>2'</sub> , H <sub>4'</sub> , H <sub>5'</sub>
4'	6,25 (dt, 15,8; 7,0)	129,1	C <sub>2'</sub> , C <sub>3'</sub> , C <sub>6'</sub>	H <sub>3'</sub> , H <sub>5'</sub>
5'	6,43 (dd, 15,8; 1,4)	130,7	C <sub>3'</sub> , C <sub>6'</sub> , C <sub>7'</sub>	H <sub>3'</sub> , H <sub>4'</sub>
6'	-	137,5	-	-
7'	7,32 (m)	126,0	C <sub>5'</sub>	H <sub>8'</sub>
8'	7,27 (m)	128,4	C <sub>6'</sub> , C <sub>10'</sub>	H <sub>7'</sub> , H <sub>9'</sub>
9'	7,17 (m)	126,9	C <sub>11'</sub>	H <sub>8'</sub>
10'	7,27 (m)	128,4	C <sub>8'</sub>	H <sub>9'</sub> , H <sub>11'</sub>
11'	7,32 (m)	126,0	C <sub>9'</sub>	H <sub>10'</sub>



Figura 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

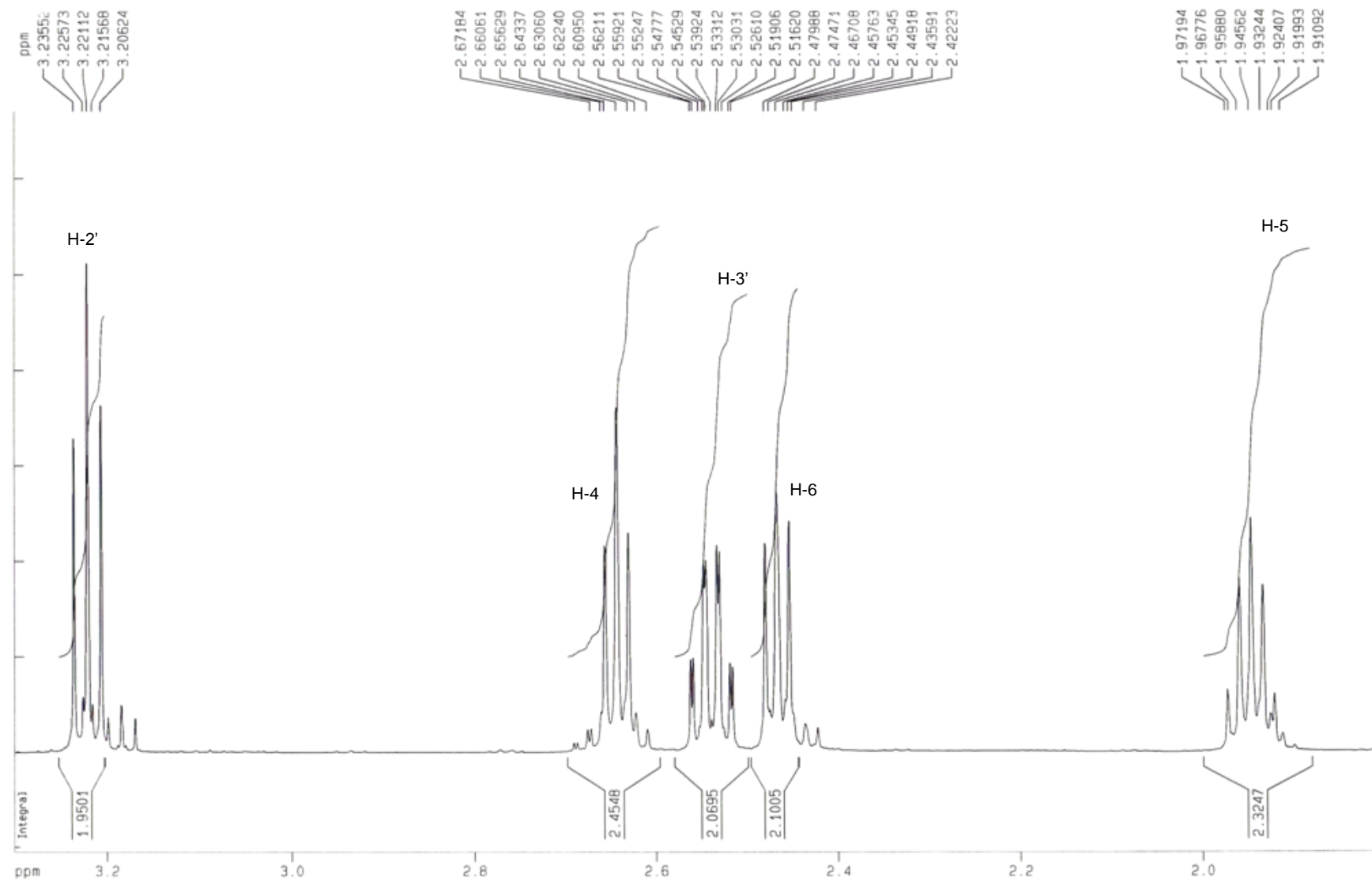


Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 9 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

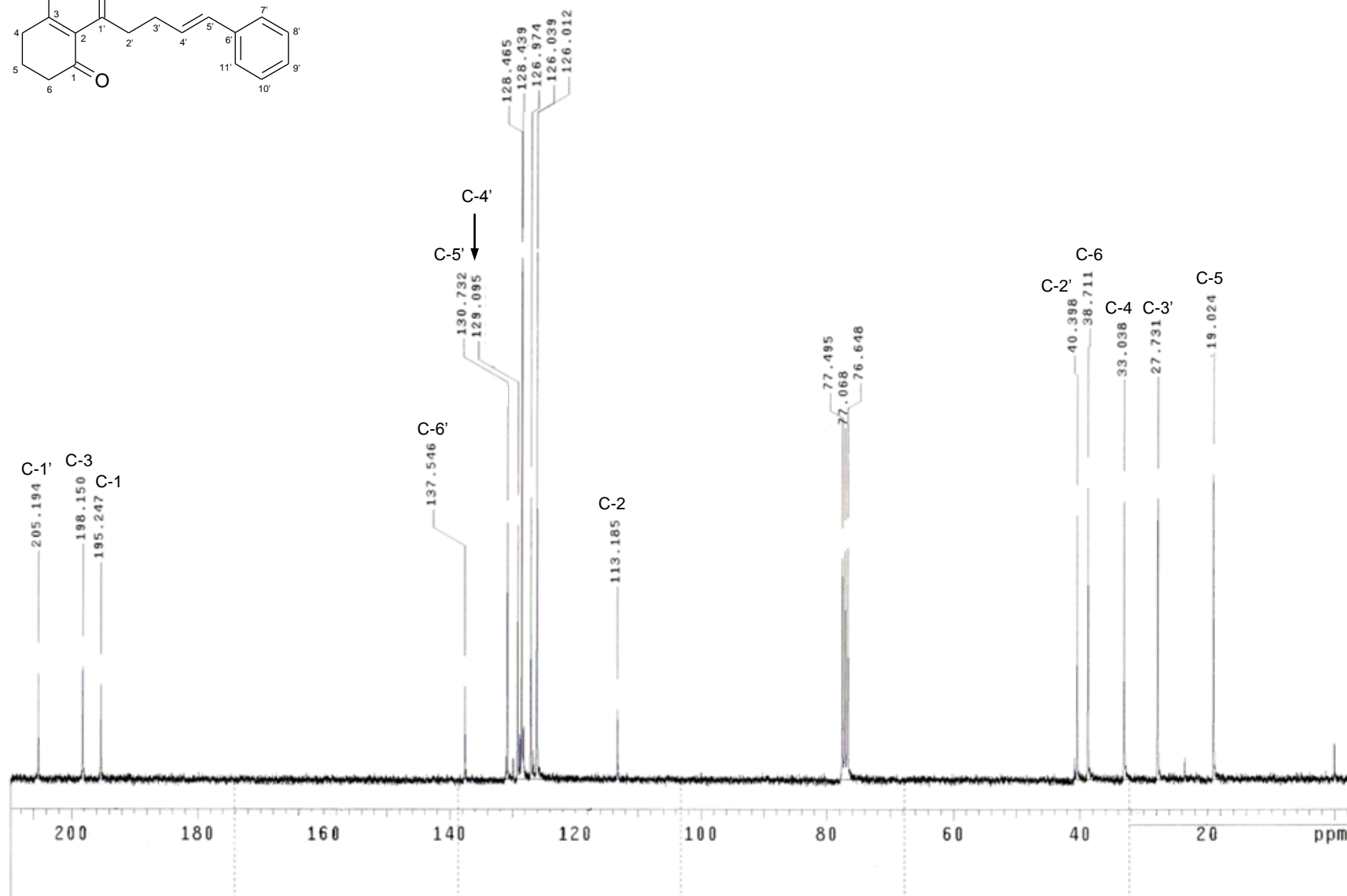
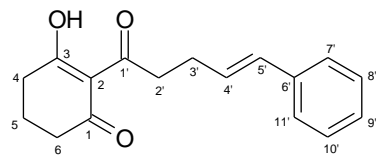
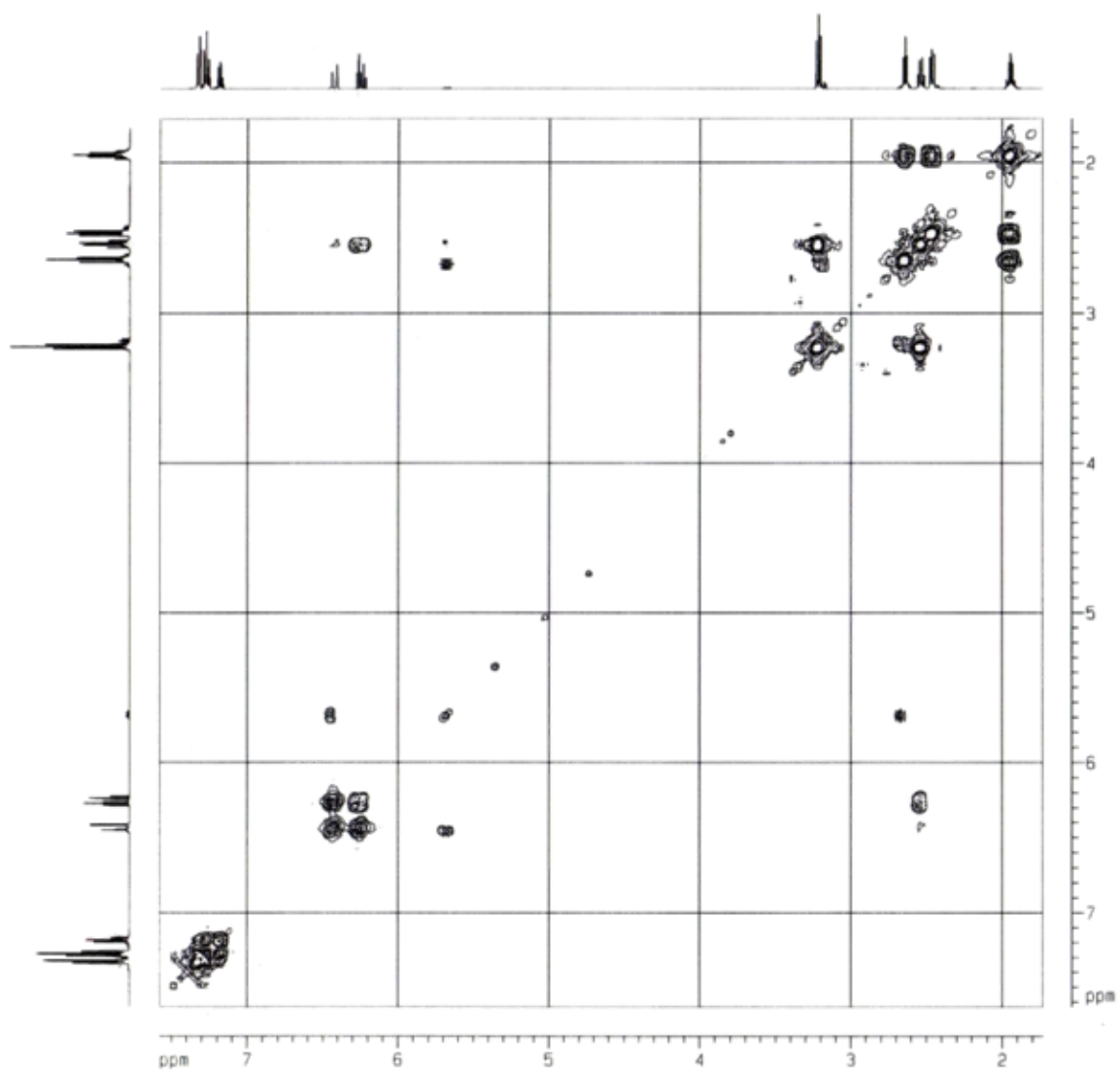


Figura 39. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **9** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 40.** Espectro DQF-COSY de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

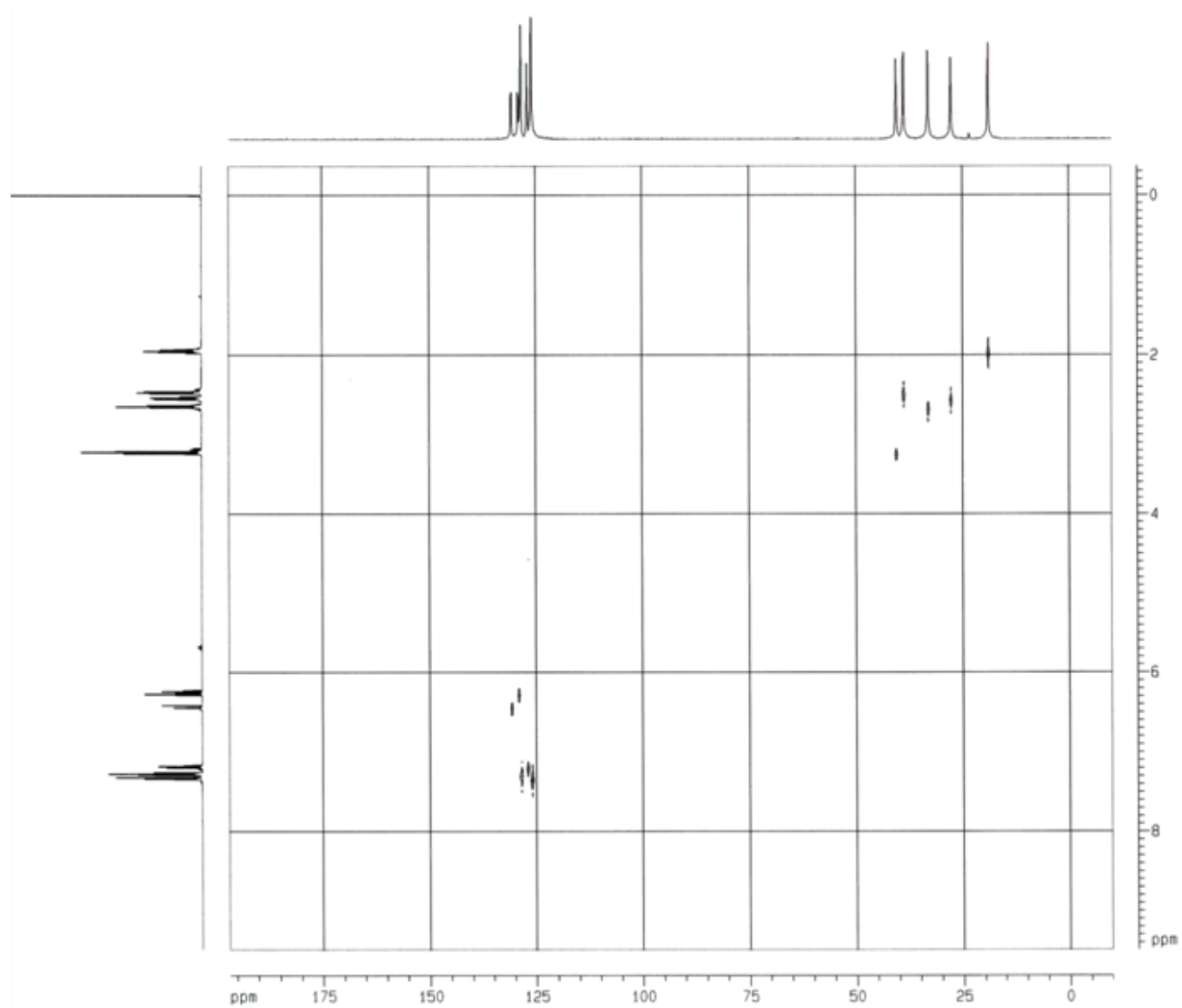


Figura 41. Espectro HMQC de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

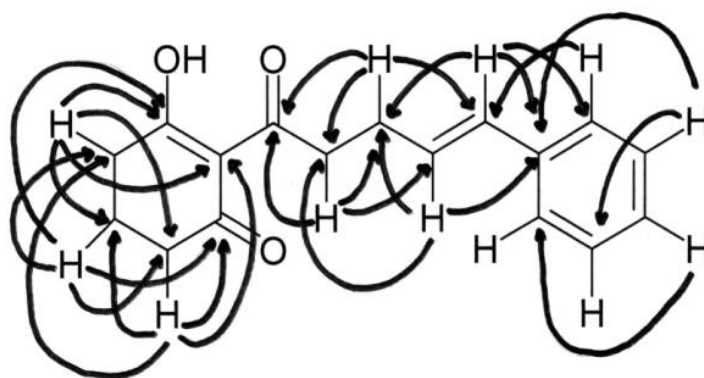


Figura 42. Correlações HMBC observadas para **9**.



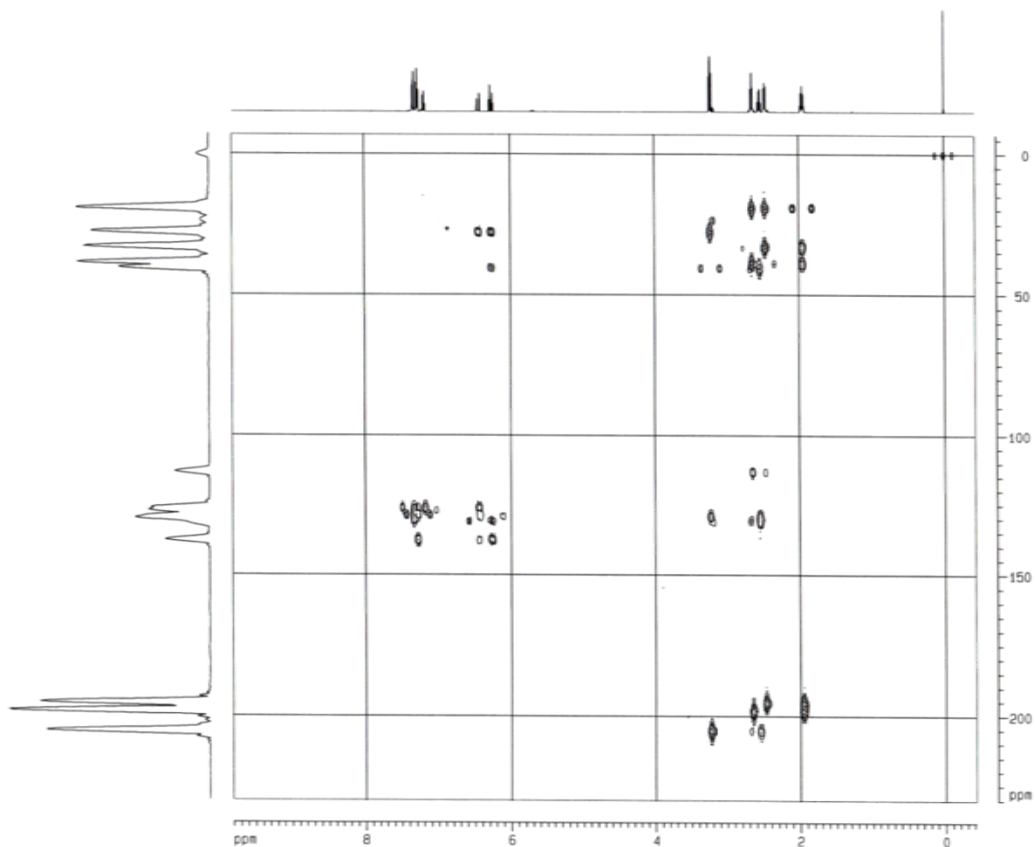


Figura 43. Espectro HMBC de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

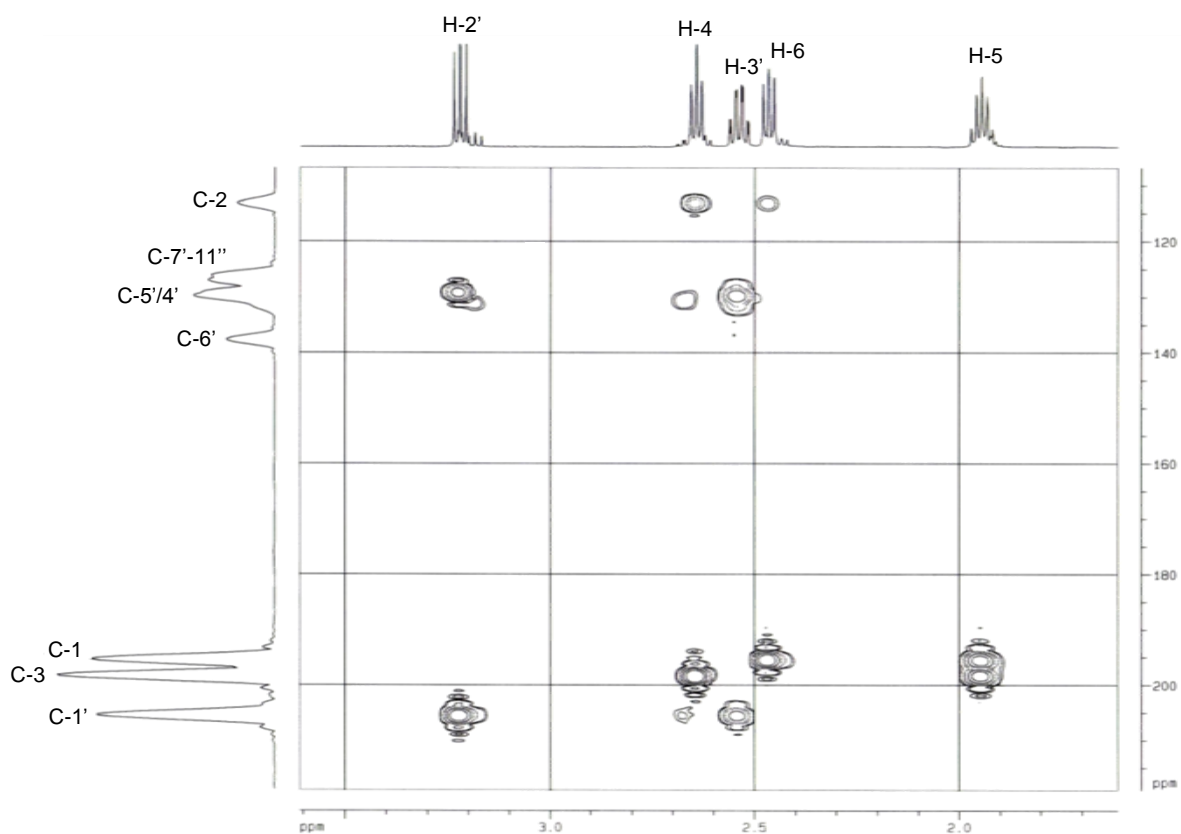


Figura 44. Ampliação (a) do espectro HMBC de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

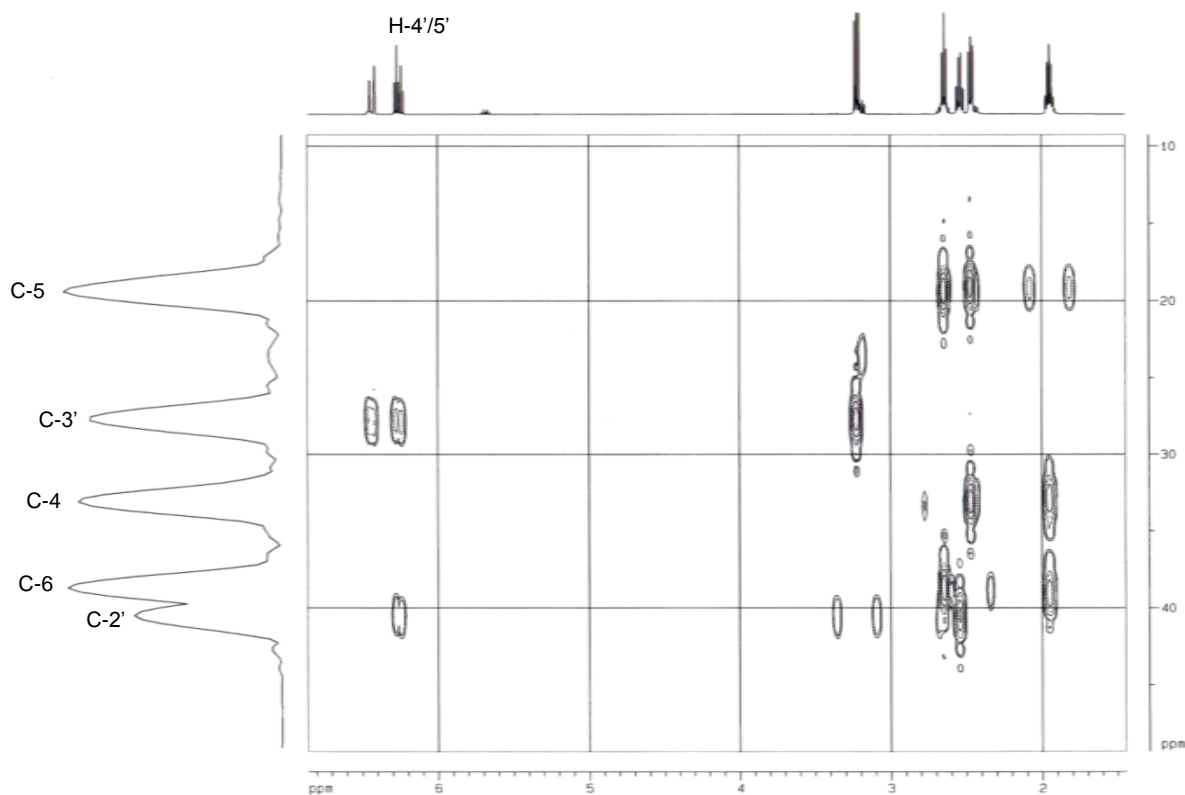


Figura 45. Ampliação (b) do espectro HMBC de **9** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

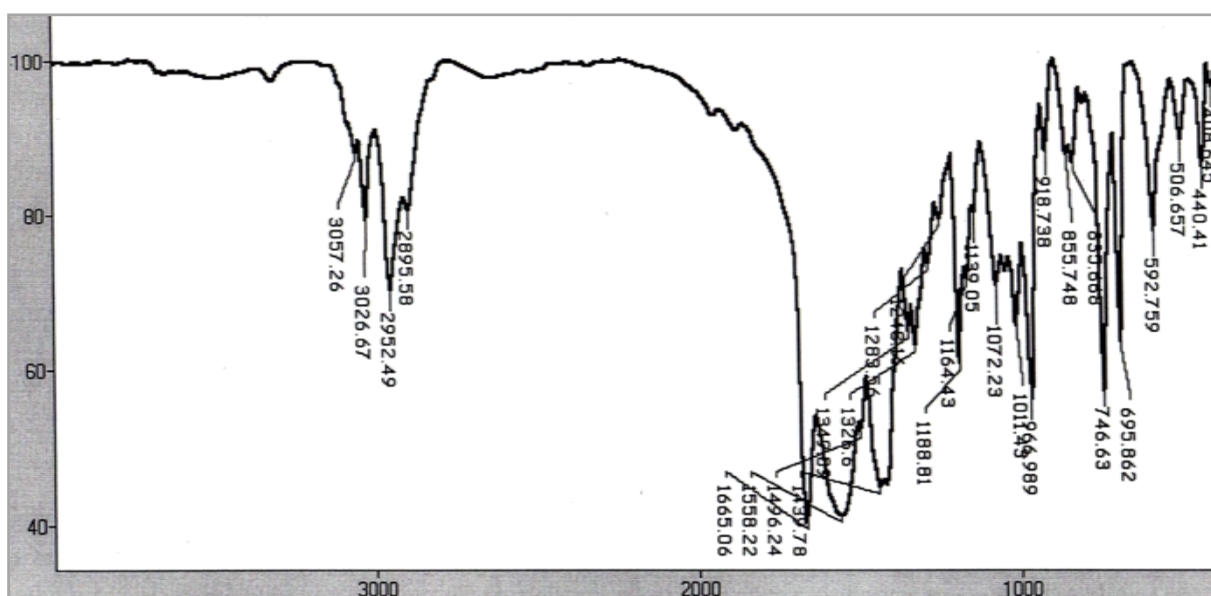
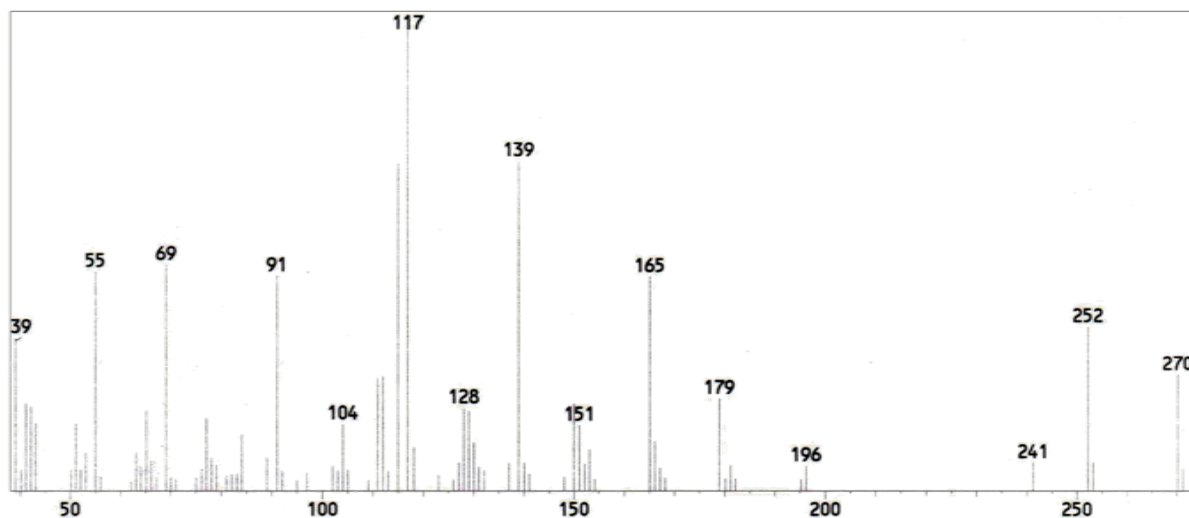


Figura 46. Espectro no IV (KBr) de **9** ( $\text{cm}^{-1}$ ).

(a)



(b)

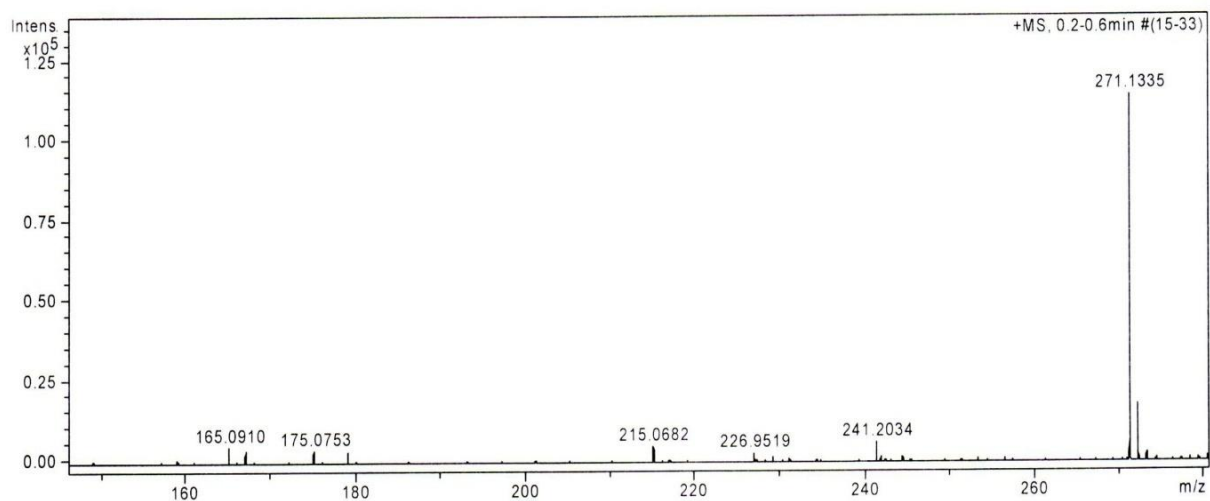


Figura 47. Espectros de massas de 9: (a) IE, baixa resolução; (b) ES, alta resolução.

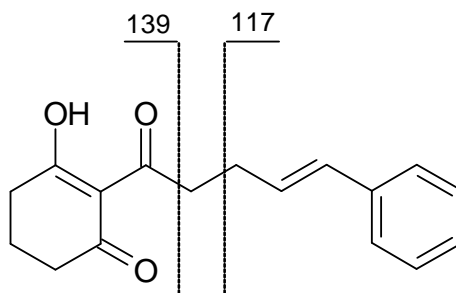


Figura 48. Principais fragmentações observadas no espectro de massas (IE) de 9.

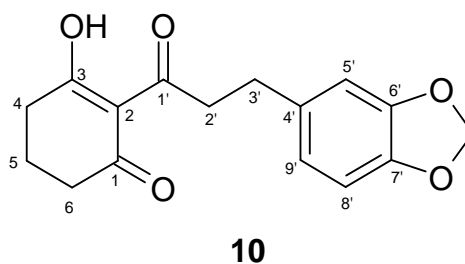
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 50 - 52) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 53) de **10** revelam a ocorrência de um sistema do tipo 3-hidróxi-2-cicloexen-1-ona, idêntico àquele proposto para **9**. Além disso, a presença dos sinais em  $\delta$  6,75 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H),  $\delta$  6,71 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,69 (dd,  $J = 7,8$  e  $1,5$  Hz, 1H), indica a ocorrência de um anel aromático 4', 6', 7'-trissubstituído (Tabela 13).

Pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **10**, observa-se um número inferior de carbonos presentes em **10** quando comparado a **9**, o que sugere a ocorrência de uma cadeia carbônica menor. Por fim, a ausência do sinal referente à ligação dupla conjugada ao sistema aromático, e a presença de um singlete em  $\delta$  5,90 (2H), característico de grupo metilenodioxílico, indicam para a substância a estrutura de 3-hidróxi-2-(3'-fenil-6'-metilenodioxipropanoil)-2-cicloexen-1-ona, denominada alatanona B, para a qual também não foram encontrados dados na literatura.

O acoplamento entre os sinais dos hidrogênios H-2' e H-3' no espectro DQF-COSY (Figura 54), e suas correlações com os sinais em  $\delta$  42,7 ( $\text{CH}_2$ ) e 30,3 ( $\text{CH}_2$ ) no espectro HMQC (Figura 55), permitiram a atribuição destes sinais aos carbonos C-2' e C-3', respectivamente.

O espectro no infravermelho (Figura 60) apresentou-se similar ao obtido para a alatanona A, com bandas de absorção características em 1664 e 1558  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a grupo carbonila conjugado e quelatado, respectivamente.

Por espectrometria de massas, obteve-se o íon-molecular  $[\text{M}^+]$  em  $m/z$  288 (CG-EM, baixa resolução), correspondente a fórmula  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ . A espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS) mostrou o pico correspondente ao íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  288,1073 (cálculo para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$   $m/z$  288,1077) (Figura 61).



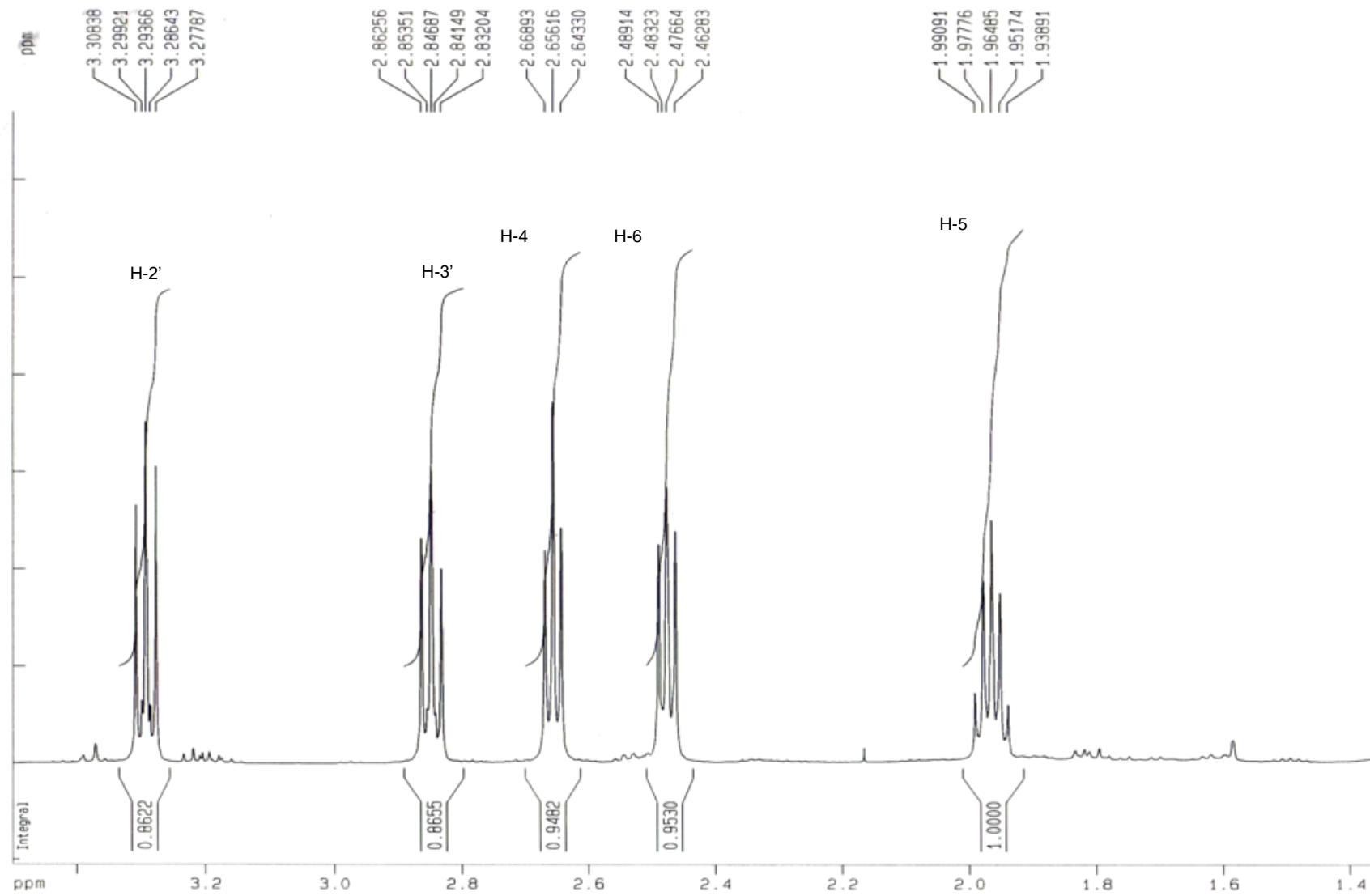
**Figura 49.** Estrutura do policetídeo **10** isolado das folhas de *Peperomia alata*.

**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **10** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>10</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC (H $\rightarrow$ C)	DQF - COSY
1	-	195,2	-	-
2	-	113,2	-	-
3	-	198,3	-	-
4	2,66 (t, 6,5)	33,1	C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>6</sub>	H <sub>5</sub>
5	1,96 (quint, 6,5)	19,1	C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub>	H <sub>4</sub> , H <sub>6</sub>
6	2,48 (t, 6,5)	38,7	C <sub>1</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub>	H <sub>5</sub>
1'	-	204,9	-	-
2'	3,30 (t, 7,6)	42,7	C <sub>1'</sub> , C <sub>3'</sub> , C <sub>4'</sub>	H <sub>3'</sub>
3'	2,85 (t, 7,6)	30,3	C <sub>1'</sub> , C <sub>2'</sub> , C <sub>4'</sub> , C <sub>5'</sub> , C <sub>9'</sub>	H <sub>2'</sub>
4'	-	134,8	-	-
5'	6,75 (d, 1,5)	109,1	C <sub>3'</sub> , C <sub>7'</sub> , C <sub>9'</sub>	-
6'	-	147,6	-	-
7'	-	145,8	-	-
8'	6,71 (d, 7,8)	108,2	C <sub>4'</sub> , C <sub>6'</sub>	H <sub>9'</sub>
9'	6,69 (dd, 7,8; 1,5)	121,3	C <sub>3'</sub> , C <sub>5'</sub>	H <sub>8'</sub>
OCH <sub>2</sub> O	5,90 (s)	100,8	C <sub>6'</sub> , C <sub>7'</sub>	-



Figura 50. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 51.** Ampliação (a) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

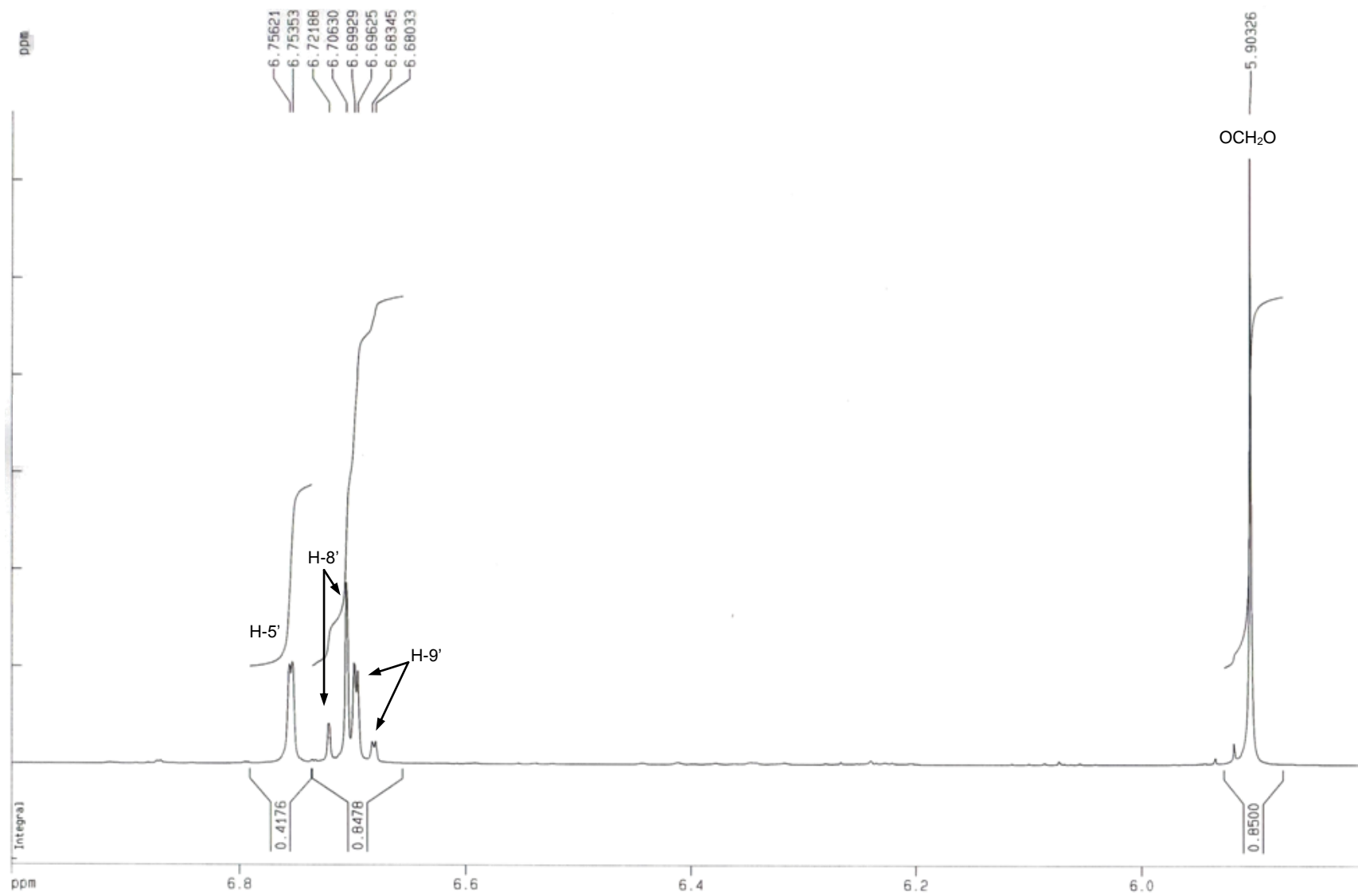


Figura 52. Ampliação (b) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



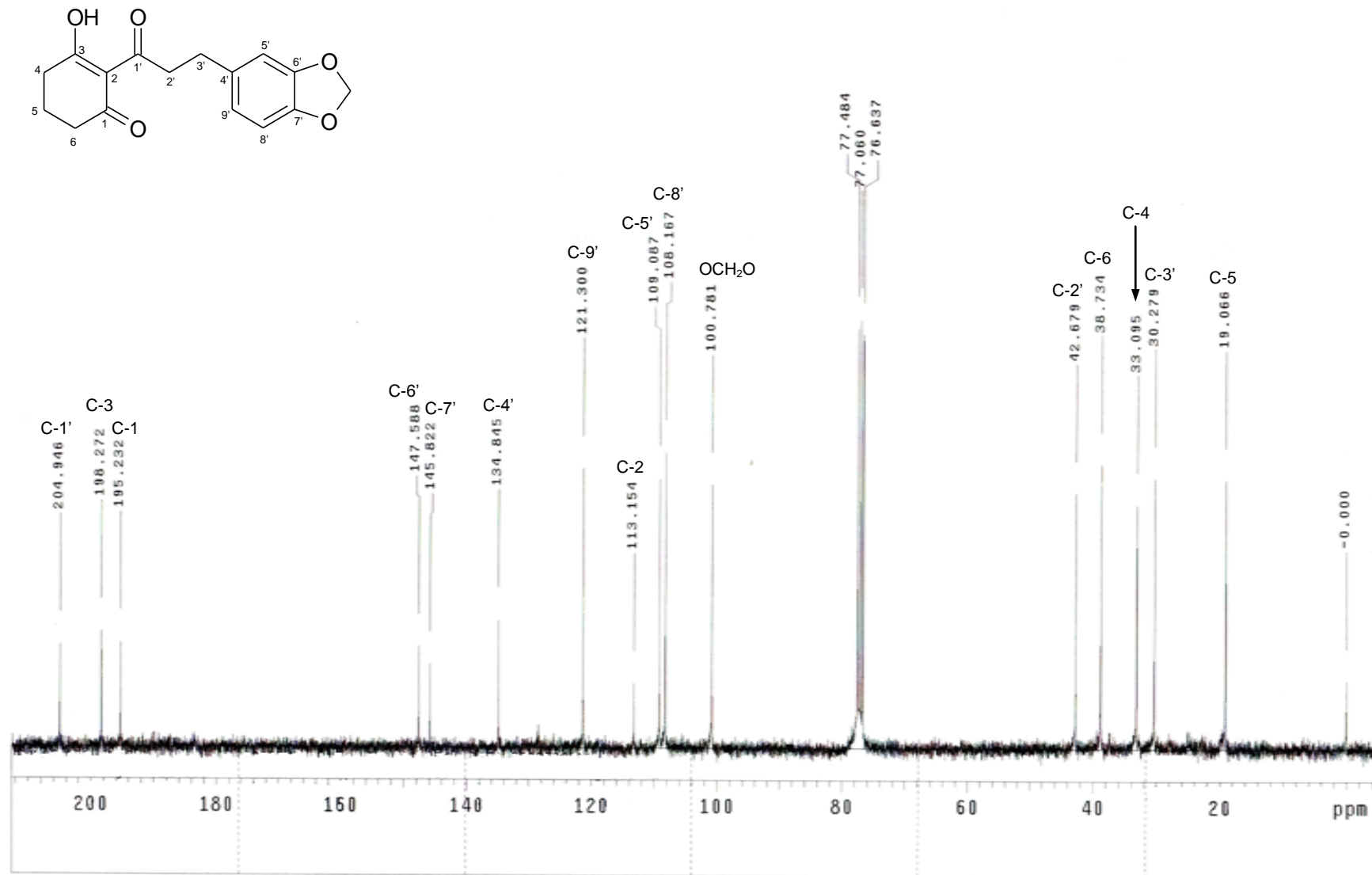
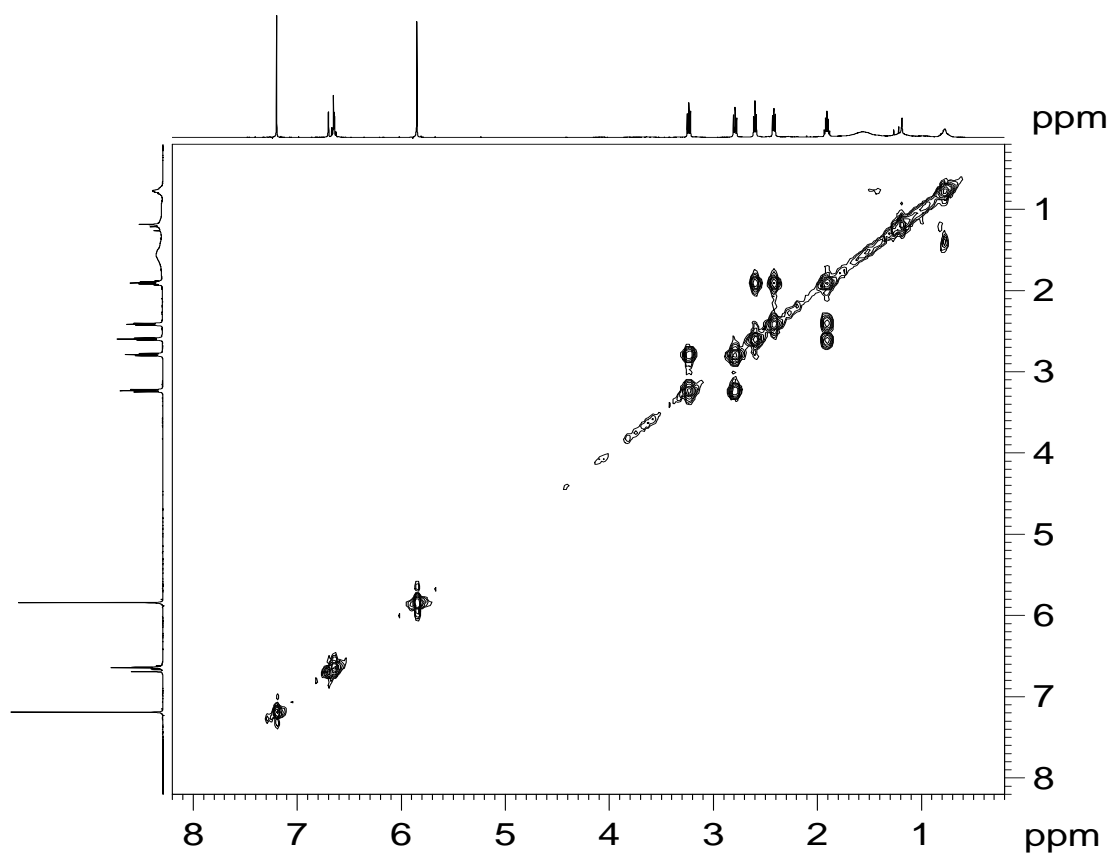


Figura 53. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 10 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 54.** Espectro DQF-COSY de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

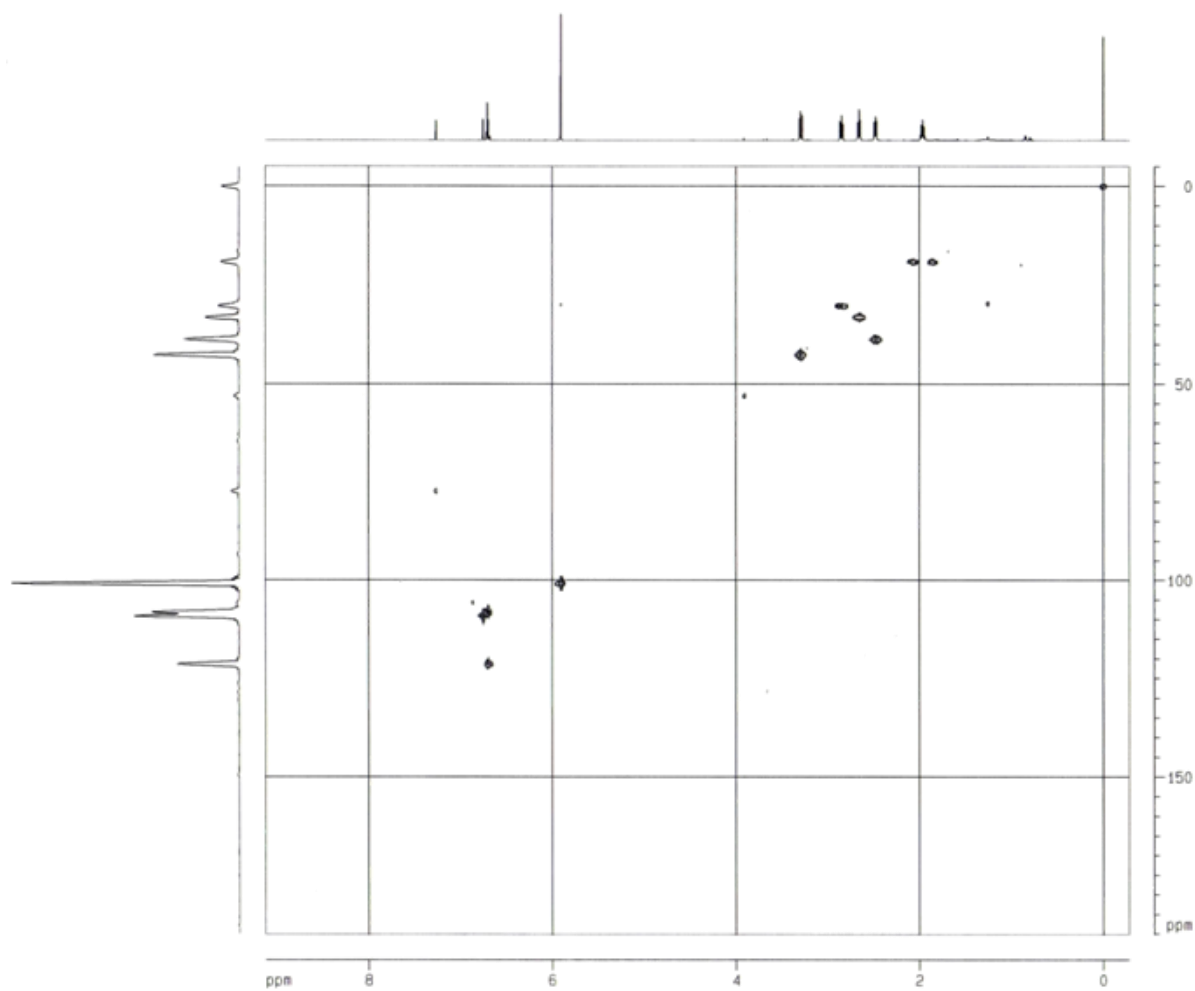


Figura 55. Espectro HMQC de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

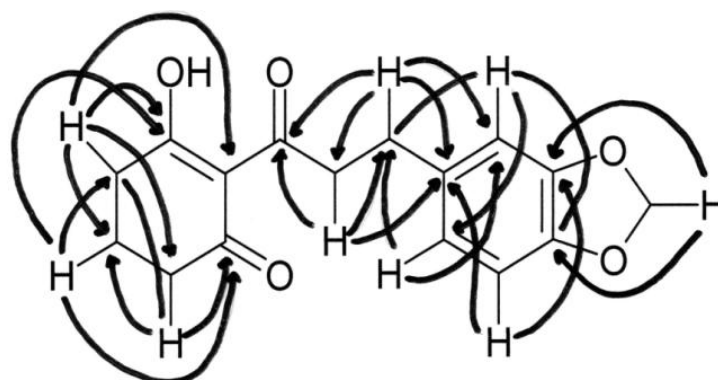
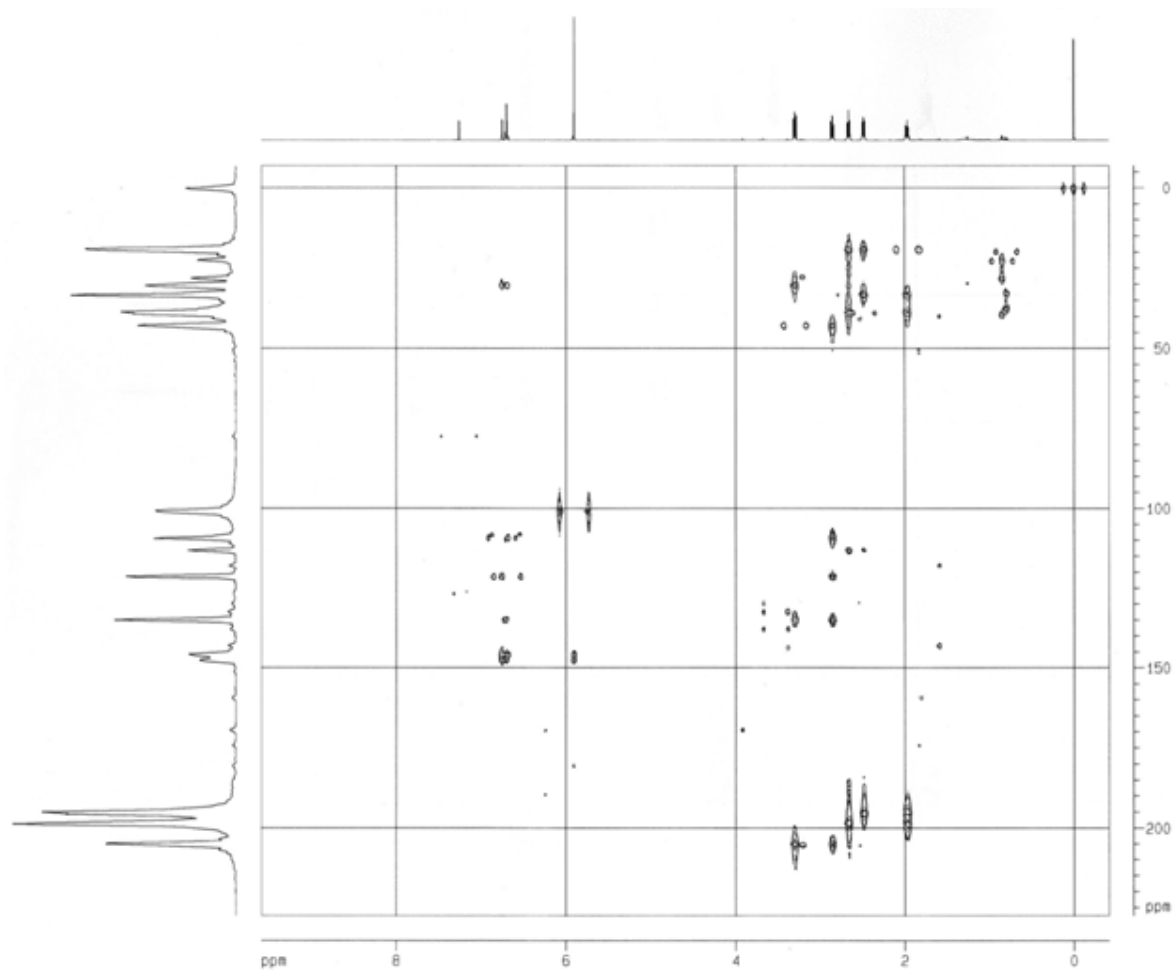


Figura 56. Correlações HMBC observadas para **10**.



**Figura 57.** Espectro HMBC de **10** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

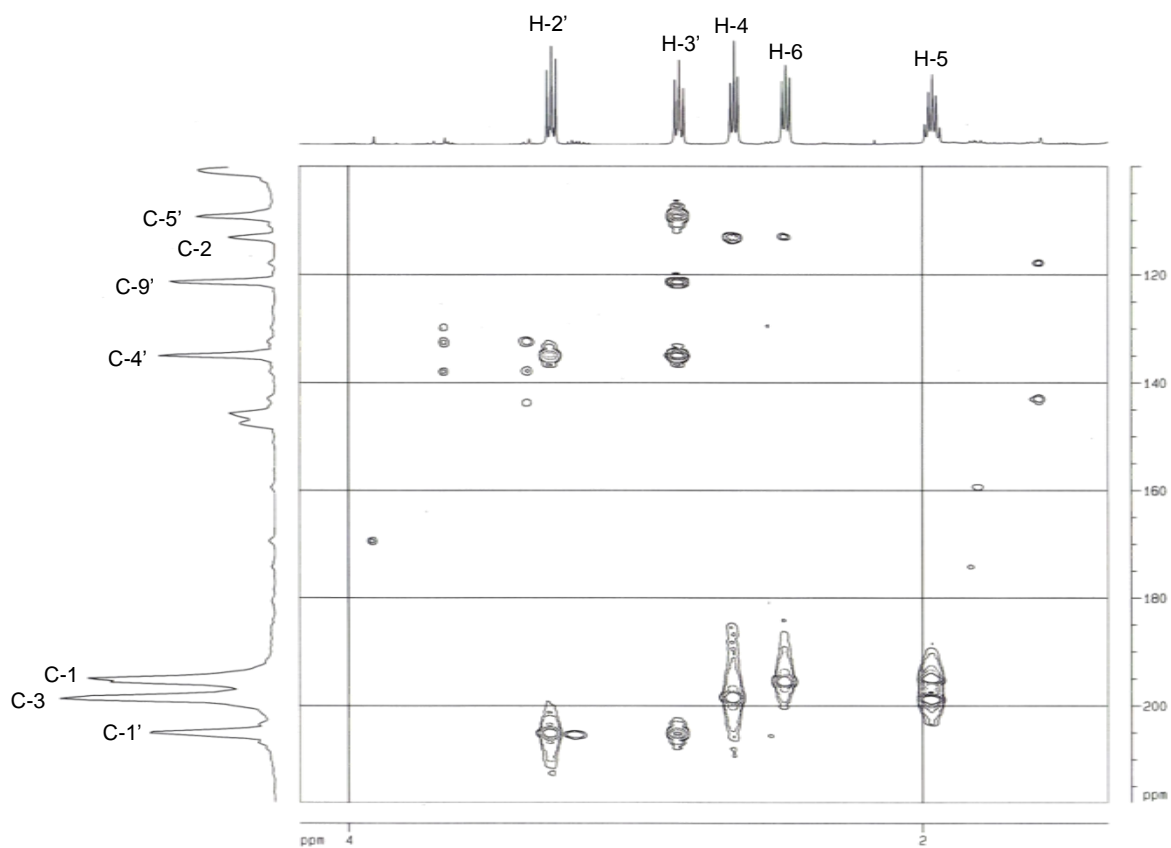


Figura 58. Ampliação (a) do espectro HMBC de 10 (500 MHz,  $CDCl_3$ ).

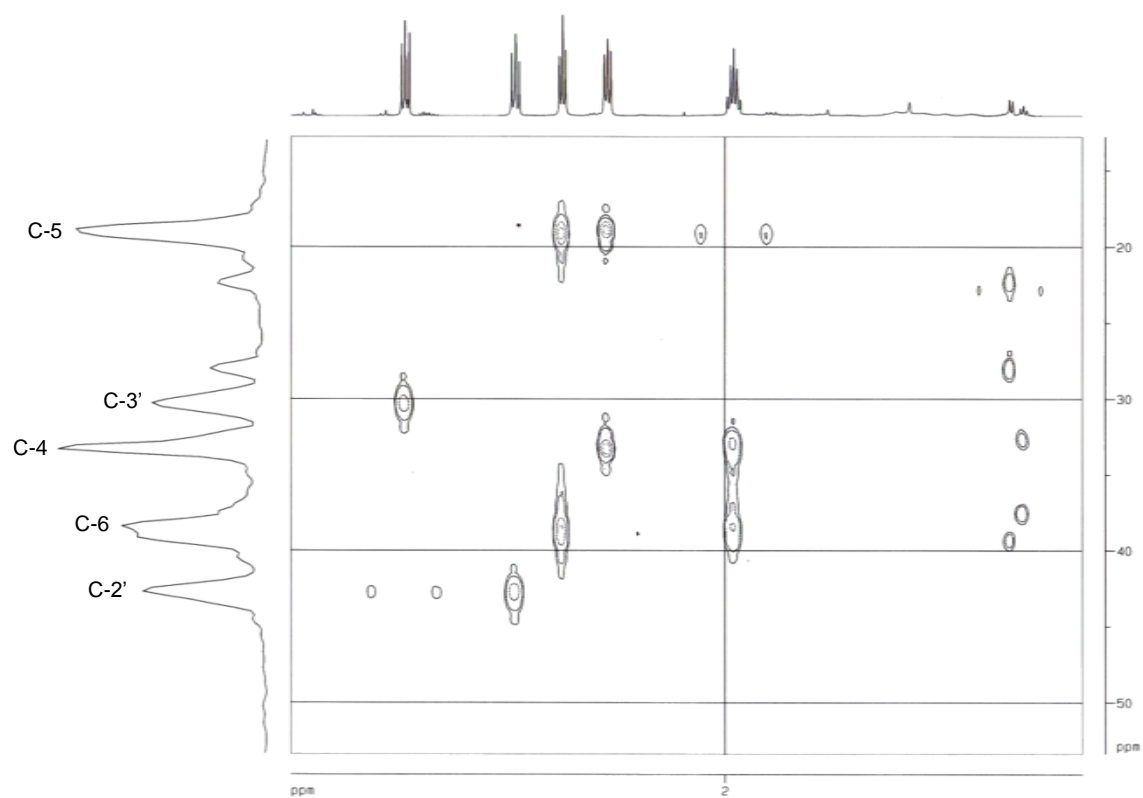


Figura 59. Ampliação (b) do espectro HMBC de 10 (500 MHz,  $CDCl_3$ ).

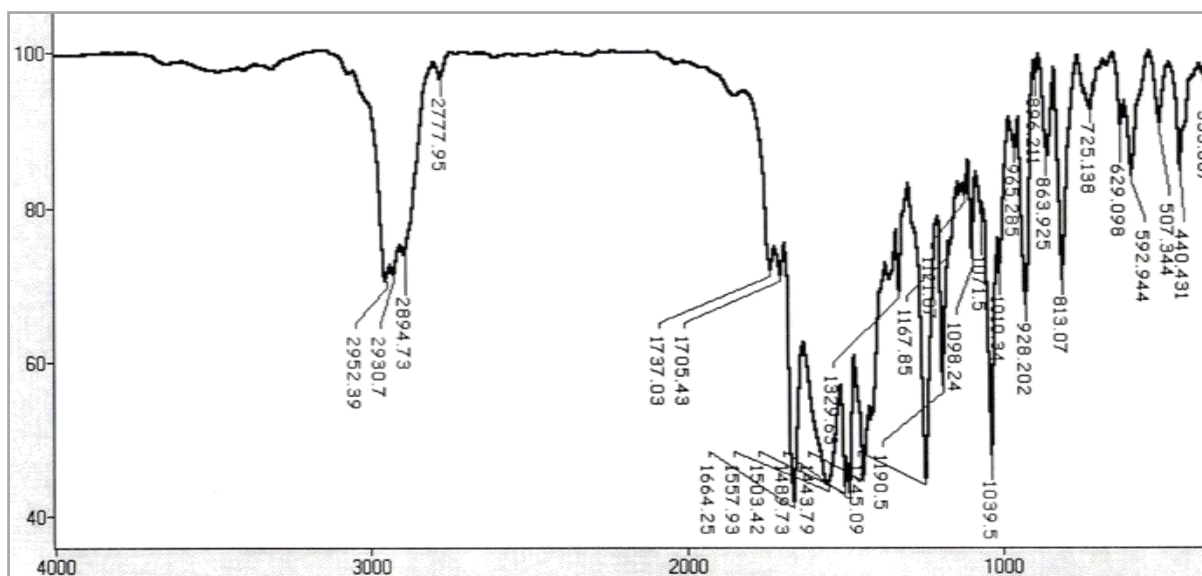
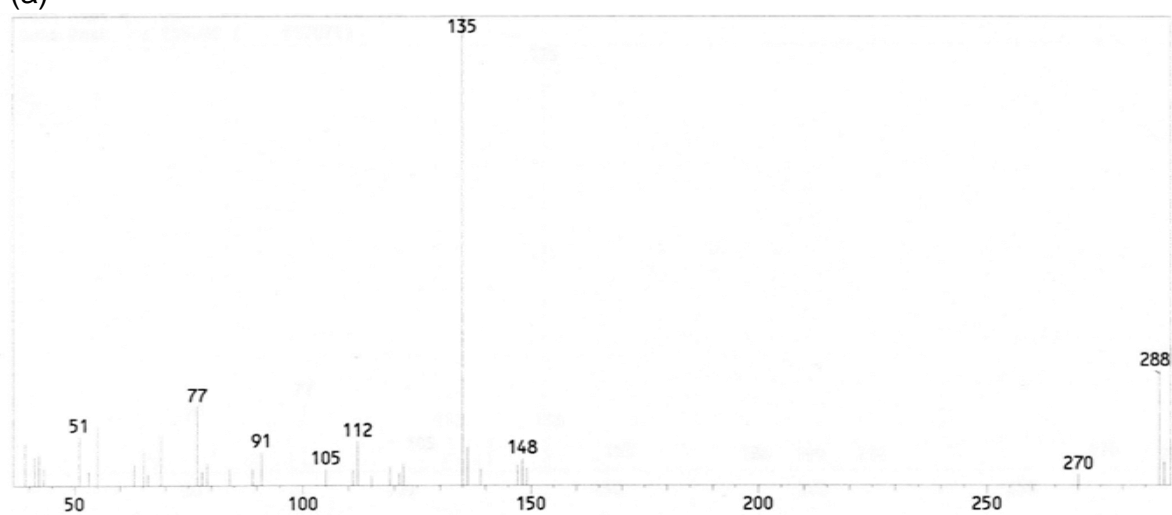


Figura 60. Espectro no IV (KBr) de **10** ( $\text{cm}^{-1}$ ).

(a)



(b)

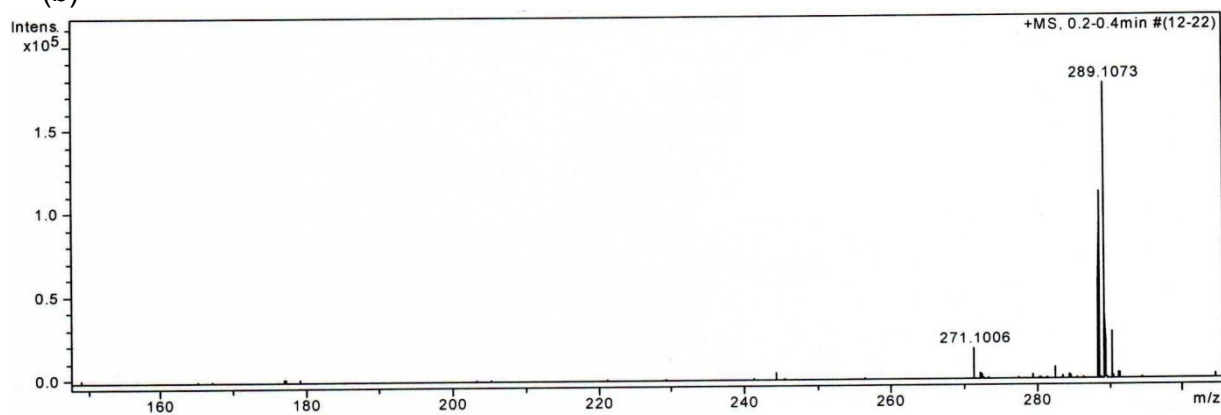
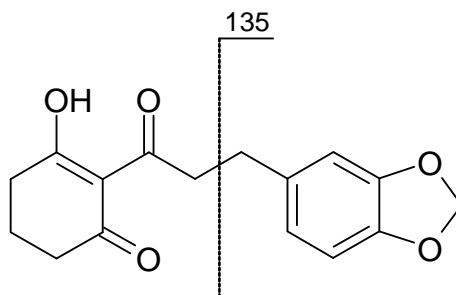


Figura 61. Espectros de massas de **10**: (a) IE, baixa resolução; (b) ES, alta resolução.



**Figura 62.** Principal fragmentação observada no espectro de massas (IE) de **10**.

A ocorrência de derivados policetídeos similares às estruturas de **9** e **10** é incomum em espécies de Piperaceae, estando descrita apenas em espécies do gênero *Peperomia*, como *Peperomia sui* (Cheng *et al.*, 2003), *Peperomia proctorii* (Seeram *et al.*, 2000) e *Peperomia duclouxii* (Li *et al.*, 2007).

#### 4.2.6. Acilresorcinóis

Quatro acilresorcinóis de cadeia longa **11** - **14** (Figura 63) foram isolados das folhas de *Peperomia glabella*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da sub-fração 2, proveniente do fracionamento da fração 2 (item 3.8.4., Figura 20), apresenta um tripleto em  $\delta$  7,21 ( $J = 8,4$  Hz) além de um dubleto em  $\delta$  6,38 ( $J = 8,4$  Hz, 2H), indicativos de um sistema aromático 1,2,6-trissubstituído. Um singlete largo em  $\delta$  9,78 (1H) foi observado, o que sugere um sistema fenólico quelatado a uma carbolina. Além desses, foram observados sinais em  $\delta$  3,10 (tripleto,  $J = 6,9$  Hz), 1,23 (singlete largo) e 0,86 (tripleto,  $J = 6,9$  Hz), sugerindo um substituinte acílico ligado ao anel aromático.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram observados sinais referentes a carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  108,4, 110,1, 135,6 e 161,2, este último característico de carbono

carbinólico aromático. Um sinal em  $\delta$  207,9 confirma a presença de um carbono carbonílico conjugado ao anel aromático. Desta forma, a estrutura do produto natural isolado corresponde a um derivado de resorcinol acilado.

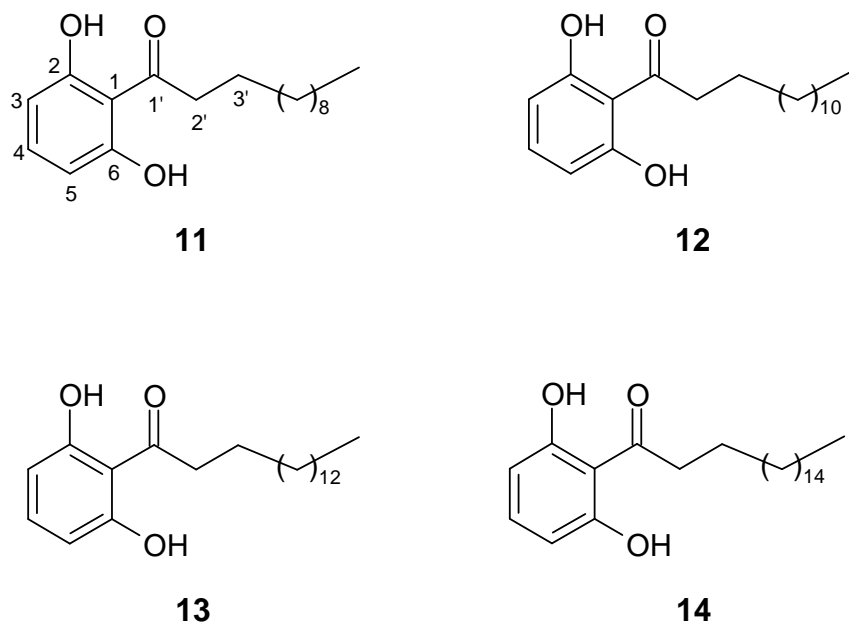
Para definição da extensão da cadeia carbônica, foi utilizada a espectrometria de massas. A amostra foi analisada por CG-EM, na qual foram observados quatro picos majoritários, correspondentes aos derivados de cadeia contendo diferentes números de átomos de carbono. O espectro de massas de **11** a **14** (Figura 64) apresenta picos-base em  $m/z$  137 Da, correspondentes ao fragmento acílico  $C_6H_5O_2CO^+$ , formados a partir da clivagem da ligação C1' - C2'.

Após análise dos picos referentes aos íons moleculares de **11** ( $m/z$  292 Da) e **12** ( $m/z$  320 Da) (Gonzalez *et al.*, 1996), **13** ( $m/z$  348 Da) (Kato *et al.*, 1985) e **14** ( $m/z$  376 Da) (Ohzeki e Yoshioka, 2007), a extensão da cadeia carbônica dos metabólitos foi definida.

A literatura descreve a ocorrência das estruturas **11**, **12** (Gonzalez *et al.*, 1996) e **13** (Kato *et al.*, 1985) isoladas de espécies vegetais. A estrutura de **14** já foi associada à produção de materiais foto e termo sensíveis para a indústria fotográfica (Ohzeki e Yoshioka, 2007), mas não há dados sobre seu isolamento a partir de uma espécie vegetal.

Assim como os derivados policetídicos, os compostos da classe dos acilresorcinóis também são raramente encontrados em espécies de Piperaceae. A ocorrência de outros derivados de acilresorcinol é restrita a *Peperomia galioides* (Mahiou *et al.*, 1995) e *Peperomia sui* (Cheng *et al.*, 2003).





**Figura 63.** Estruturas dos acilresorcinóis **11** – **14** isolados de *Peperomia glabella*.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) dos acilresorcinóis **11** - **14** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>11 - 14</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	110,1
2	-	161,2
3	6,38 (d, 8,4)	108,4
4	7,21 (t, 8,4)	135,6
5	6,38 (d, 8,4)	108,4
6	-	161,2
1'	-	207,9
2'	3,10 (t, 6,9)	44,7
Cadeia lateral	1,23 (s)	22,3 - 39,4
-OH	9,78 (s)	-
-CH <sub>3</sub> terminal	0,86 (t, 6,9)	13,9

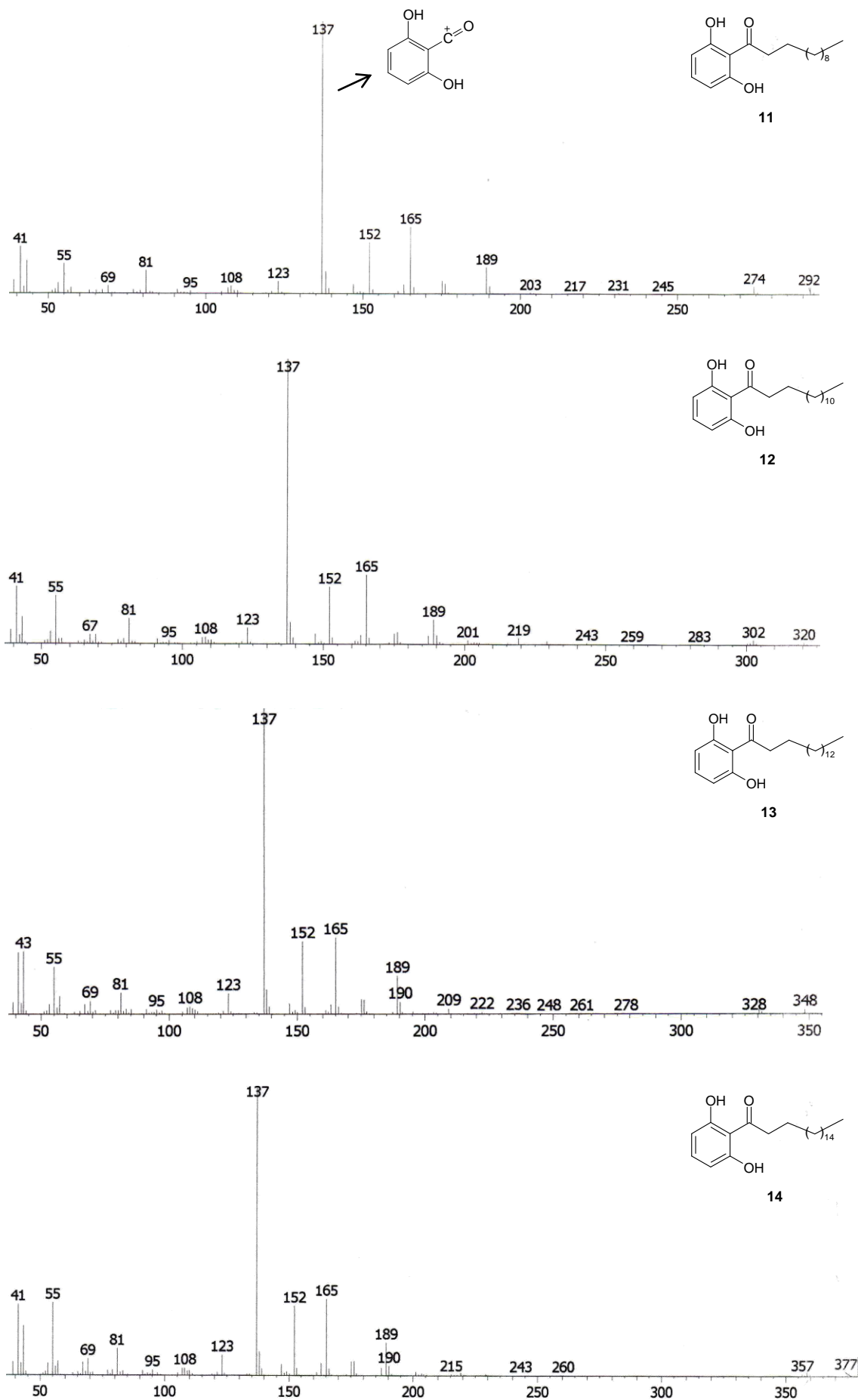


Figura 64. Espectros de massas (IE) dos acilresorcinóis 11 - 14.

#### 4.2.7. Secolignanas

Quatro secolignanas, uma delas de estrutura inédita, foram isoladas de *Peperomia glabella*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da sub-fração 2, proveniente do fracionamento da fração 4 (item 3.8.4., Figura 20) apresenta sinais sobrepostos em  $\delta$  6,60 - 6,74 característicos de anel aromático substituído, e sinais sobrepostos em  $\delta$  5,87 - 5,90 característicos de grupos metilenodioxifenílicos. Esses sinais, associados à presença de multipletos em  $\delta$  4,28, 3,70, 3,90, 2,87 e 2,33 sugerem a ocorrência de uma mistura de secolignanas.

A literatura descreve a presença de derivados desta classe em *Peperomia glabella* (Monache e Compagnone, 1996), *Peperomia japonica* (Chen *et al.*, 1989), *Peperomia dindigulensis* (Govindachari *et al.*, 1998 e Wu *et al.*, 2006), *Peperomia heyneana* (Zhang *et al.*, 2007) e *Peperomia pellucida* (Xu *et al.*, 2006), o que permitiu a identificação do esqueleto.

O esqueleto das estruturas foi definido pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , que indica a presença de 40 átomos de carbono, confirmando a hipótese de se tratar de uma mistura de duas secolignanas com 20 átomos de carbono cada, tal como a peperomina D ( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ ) descrita na literatura (Monache e Compagnone, 1996). A análise por CG-EM da mistura confirma a presença de dois metabólitos majoritários na fração, com íons moleculares em  $m/z$  354 Da e  $m/z$  352 Da, respectivamente.

A mistura de secolignanas dessa fração foi então purificada por CCDP de sílica impregnada com nitrato de prata (sistema eluente Hex:AcOEt (4:1) (v:v)), e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  das substâncias isoladas **15** e **16** apresentaram-se muito semelhantes, como previsto, exceto pelo perfil do grupo  $\gamma$ -butirolactona

(Tabela 15). A principal diferença observada foi a substituição do grupo metílico secundário, presente na peperomina D, por um grupo metileno em **16**, como mostram os sinais em  $\delta_H$  0,90 e  $\delta_C$  15,7 para **15**, e  $\delta_H$  6,10/4,9 e  $\delta_C$  124,8 para **16** (Figura 66 e 67), cujos dados espectrométricos não se encontram na literatura.

A presença do grupo  $\gamma$ -butirolactona também foi confirmada pela análise de espectrometria no IV (Figura 68), através da banda em  $1763\text{ cm}^{-1}$  (Monache e Compagnone, 1996)

O espectro de massas (IE) de **15** e **16** obtido por CG-EM apresenta o pico-base em  $m/z$  255 Da, correspondente ao fragmento  $C_{15}H_{11}O_4^+$ , formado a partir da clivagem benzílica da ligação C3 - C5 (Figura 69), reafirmando a ocorrência de uma secolignana.

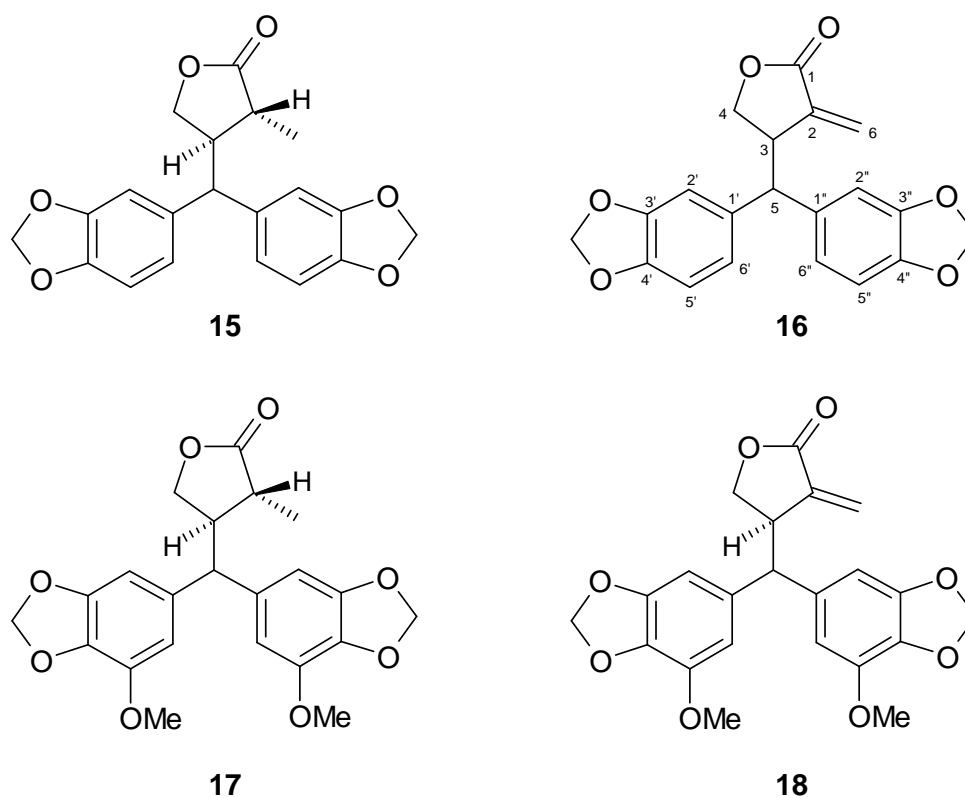
Dessa forma, a estrutura de **15** foi definida como peperomina D, já descrita para *Peperomia glabella* (Monache e Compagnone, 1996), e a estrutura inédita de **16** foi denominada peperomina G.

Em continuação ao estudo fitoquímico de *Peperomia glabella*, a análise do espectro de RMN de  $^1H$  da fração 5 também indicou a ocorrência de uma mistura de metabólitos com esqueleto de secolignana, similar àquelas isoladas da fração 4 (Tabela 16).

No entanto, a presença de um singlete intenso em  $\delta$  3,81, associado aos valores de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, sugere a presença de grupos metoxílicos aromáticos na mistura. O espectro de RMN de  $^{13}C$  comprova a ocorrência dos grupos metoxílicos pela presença do sinal intenso em  $\delta$  55,8.

Finalmente, por comparação com dados da literatura, as estruturas das secolignanas presentes na mistura foram identificadas como peperomina A (**17**) e

peperomina E (**18**), ambas anteriormente descritas em espécies de *Peperomia* (Chen *et al.*, 1989; Govindachari *et al.*, 1998).



**Figura 65.** Estruturas das secolignanas **15** - **18** isoladas das folhas de *Peperomia glabella*.

**Tabela 15.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **15** e **16** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>15</b>		<b>16</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	179,6	-	170,7
2	2,33 (m)	40,3	-	136,0
3	2,87 (m)	47,3	3,9 (m)	42,4
4	4,30 (m) /3,75 (m)	70,4	4,27 (m) /3,71 (m)	69,7
5	3,71 (d, 11,4)	55,7	3,66 (d, 11,5)	54,8
6	0,90 (d, 6,9)	15,7	6,10 (d, 2,2) /4,9 (d, 1,9)	124,8
1', 1''	-	135,6/136,2	-	135,5/135,6
2', 2''	*	107,7/107,8	*	107,9/108,1
3', 3''	-	146,6/146,7	-	146,6/146,7
4', 4''	-	148,1/148,2	-	148,0/148,3
5', 5''	*	108,5/108,6	*	108,3/108,6
6', 6''	*	120,4/120,7	*	120,6/121,4
OCH <sub>2</sub> O	5,90(s) (x 2)	101,1 (x 2)	5,87(s) (x 2)	101,2 (x 2)

\*: sinais sobrepostos dos hidrogênios de anel aromático em  $\delta$  6,60 - 6,74.

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **17** e **18** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>17</b>		<b>18</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	179,7	-	170,8
2	2,32 (m)	40,2	-	135,9
3	2,89 (m)	47,0	3,88 (m)	42,3
4	4,28 (m)/3,97 (m)	70,3	4,28 (m)/3,97 (m)	69,7
5	3,72 (d, 11,0)	55,3	3,64 (d, 11,0)	54,5
6	0,85 (d, 6,9)	15,5	6,07 (d, 2,1)/4,88 (d, 2,1)	124,5
1', 1''	-	134,7 (x 2)	-	134,0 (x 2)
2', 2''	*	107,6/108,4	*	107,7/108,4
3', 3''	-	148,0/149,0	-	148,0/148,9
4', 4''	-	135,7 (x 2)	-	135,6 (x 2)
5', 5''	-	146,4/147,9	-	146,4/147,9
6', 6''	*	110,8/111,3	*	111,1/111,4
OCH <sub>2</sub> O	5,88 (s) (x 2)	101,0 (x 2)	5,89 (s) (x 2)	101,0 (x 2)
OCH <sub>3</sub>	3,81 (s) (x 2)	55,7 (x 2)	3,81 (s) (x 2)	55,8 (x 2)

\*: sinais sobrepostos dos hidrogênios de anel aromático em  $\delta$  6,67 - 6,77.

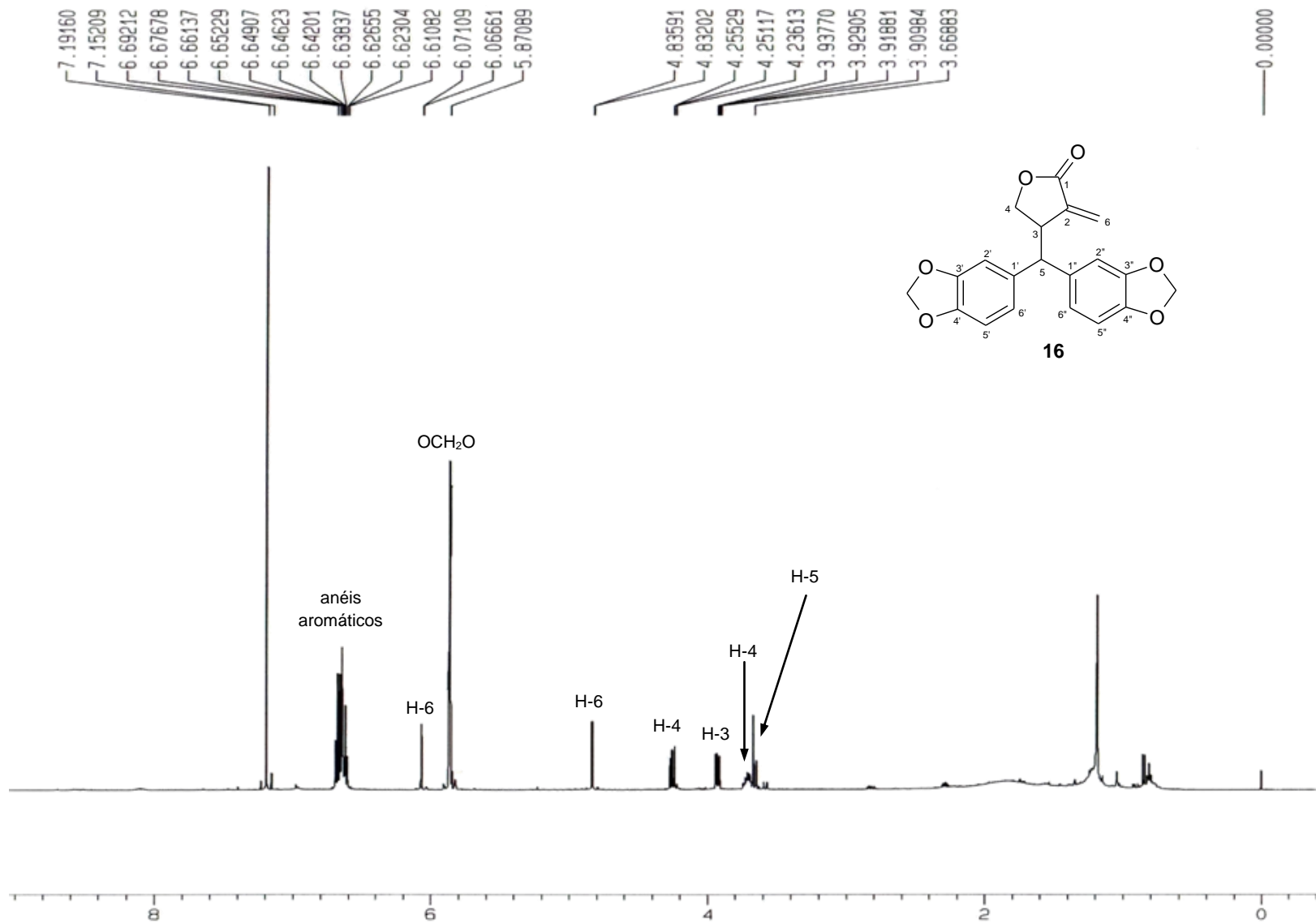


Figura 66. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **16** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

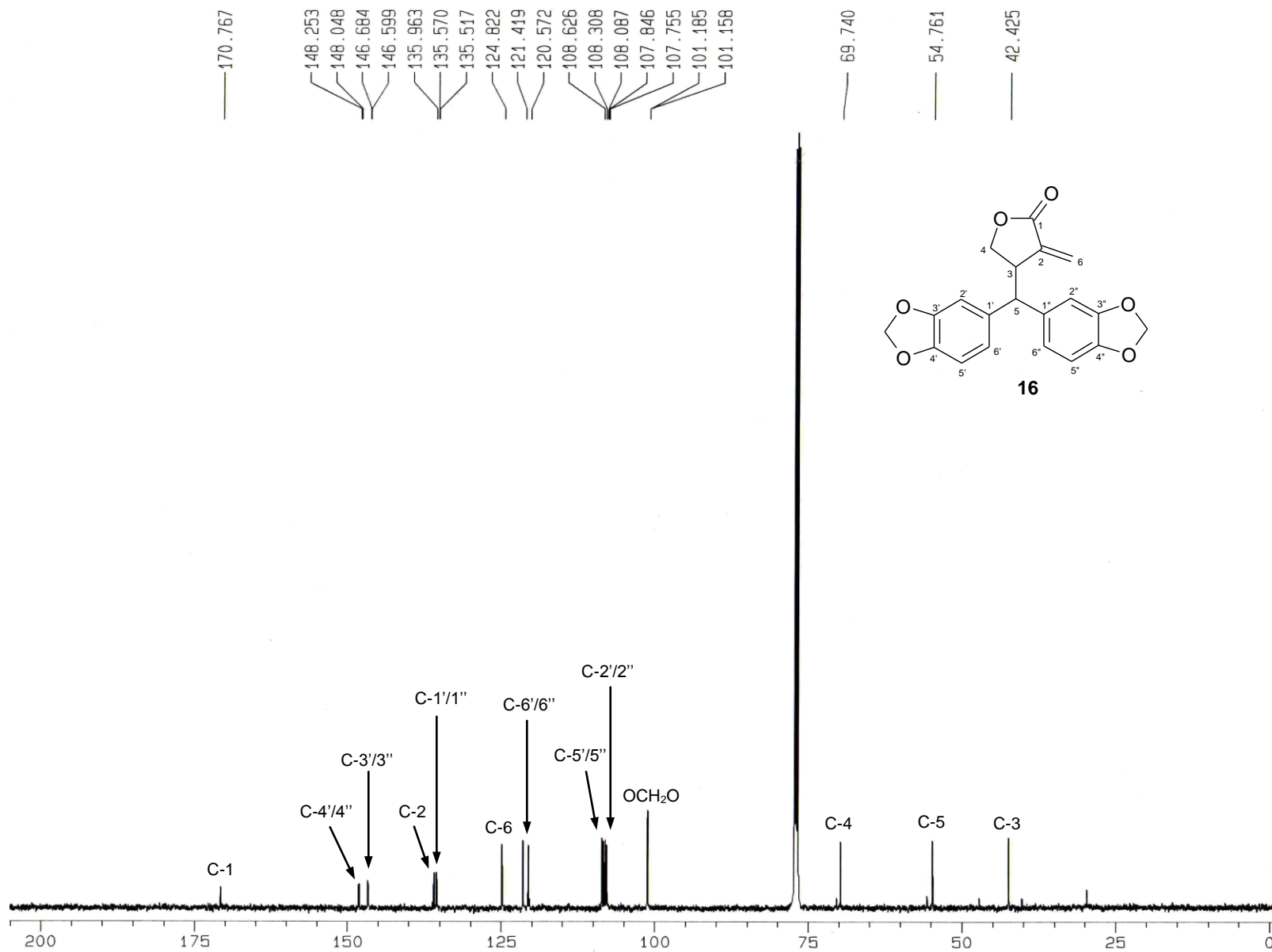


Figura 67. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **16** (125 MHz, CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>).



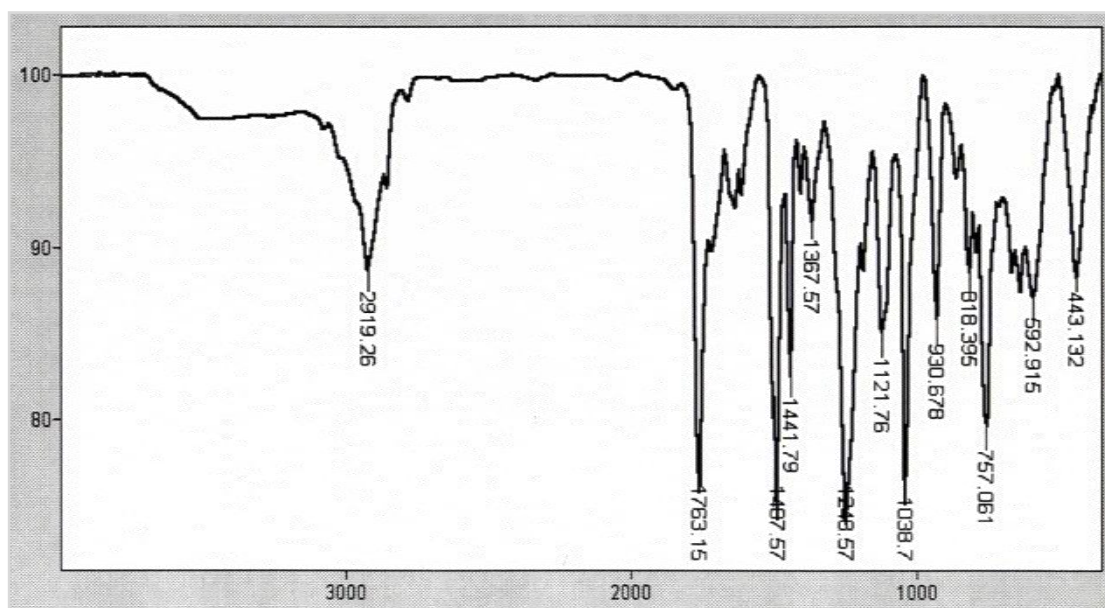


Figura 68. Espectro no IV (KBr) de 16 (cm<sup>-1</sup>).

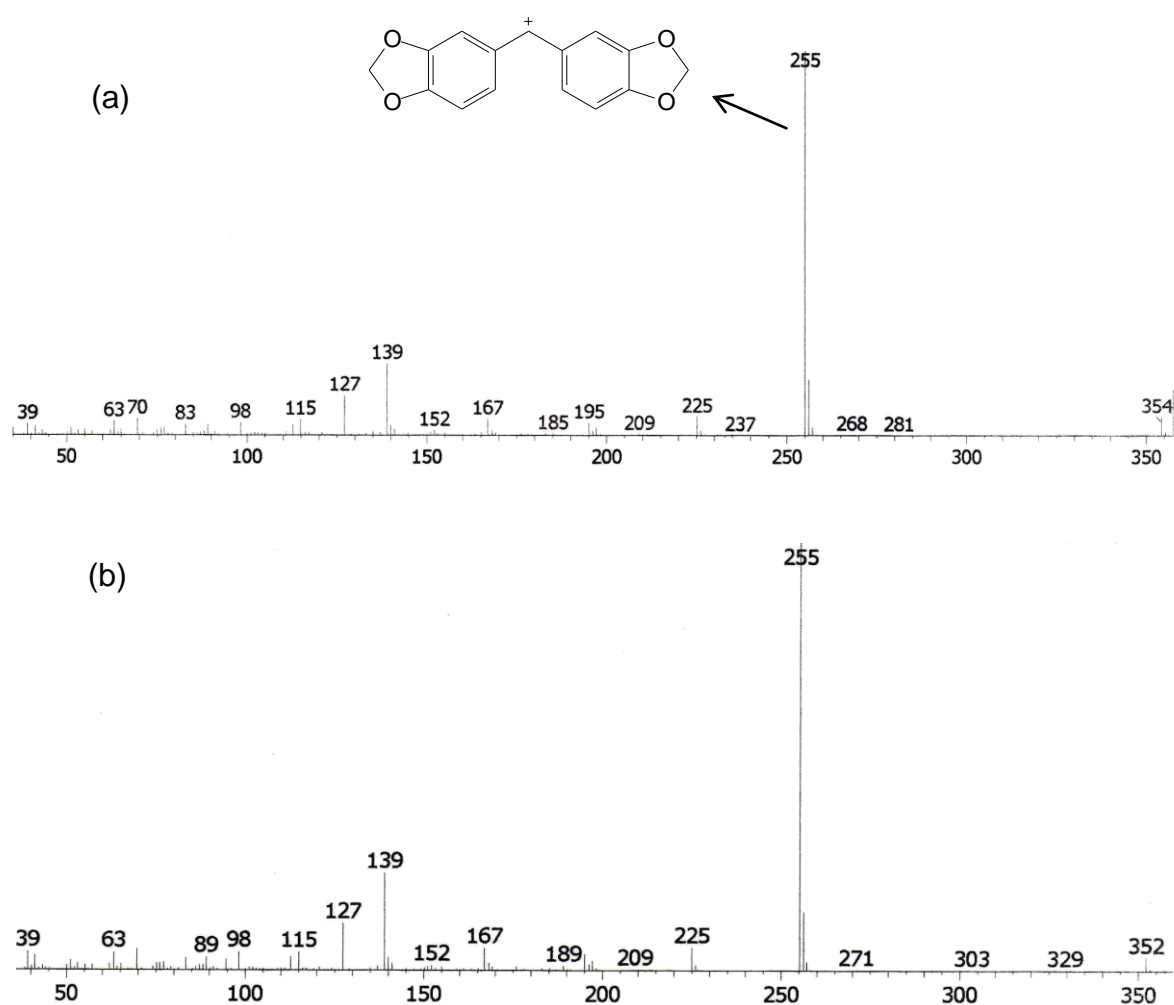


Figura 69. Espectros de massas (IE) de 15 (a) e 16 (b).

### 4.3. Atividade antifúngica

Todos os metabólitos secundários descritos neste trabalho mostraram-se ativos quando submetidos aos ensaios de bioautografia frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, ilustrando o elevado potencial fungitóxico apresentado por moléculas acumuladas em espécies de Piperaceae, principalmente nos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

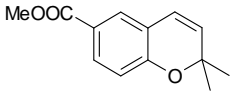
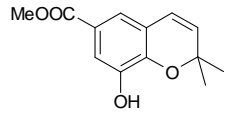
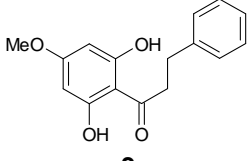
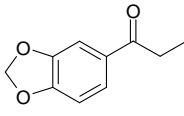
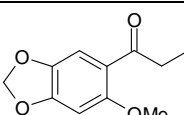
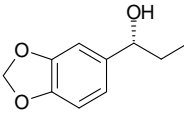
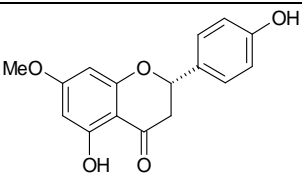
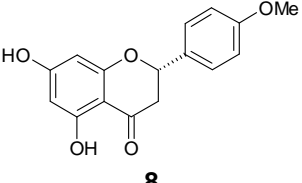
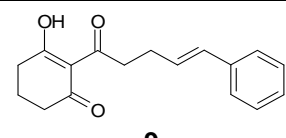
A Tabela 17 apresenta os resultados dos ensaios de limite de detecção dos produtos naturais isolados **1 - 18** e das substâncias antifúngicas padrão nistatina e miconazol, utilizadas para efeito de comparação (substâncias controle). O ensaio de limite de detecção indica a quantidade mínima necessária de amostra que inibe o crescimento dos fungos em placas cromatográficas de gel de sílica.

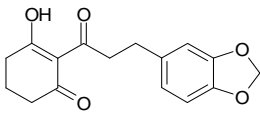
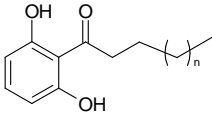
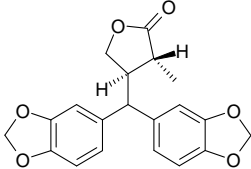
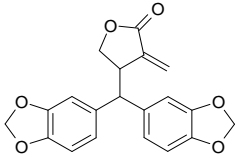
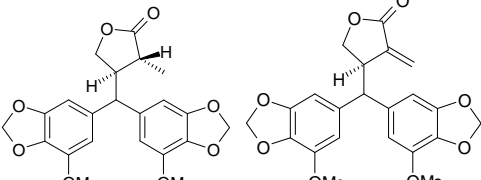
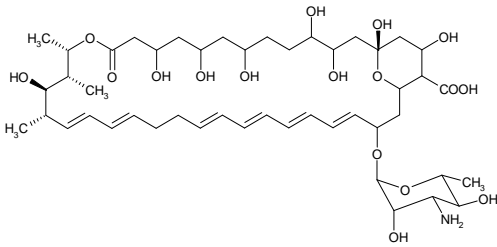
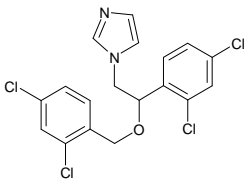
Os valores obtidos nesse ensaio de bioautografia indicam que os metabólitos **7 – 10, 15 e 16** apresentam maior potencial fungitóxico.

Dos metabólitos isolados de *Piper mollicomum*, a di-hidrochalcona **3** apresentou maior potencial antifúngico frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, quando comparada aos cromenos **1 e 2**, que apresentaram atividade moderada. De acordo com os valores observados para **1 e 2**, a presença do grupo hidroxila na posição C-8 em **2** causa elevação do potencial apresentado por **2** quando comparado a **1**.

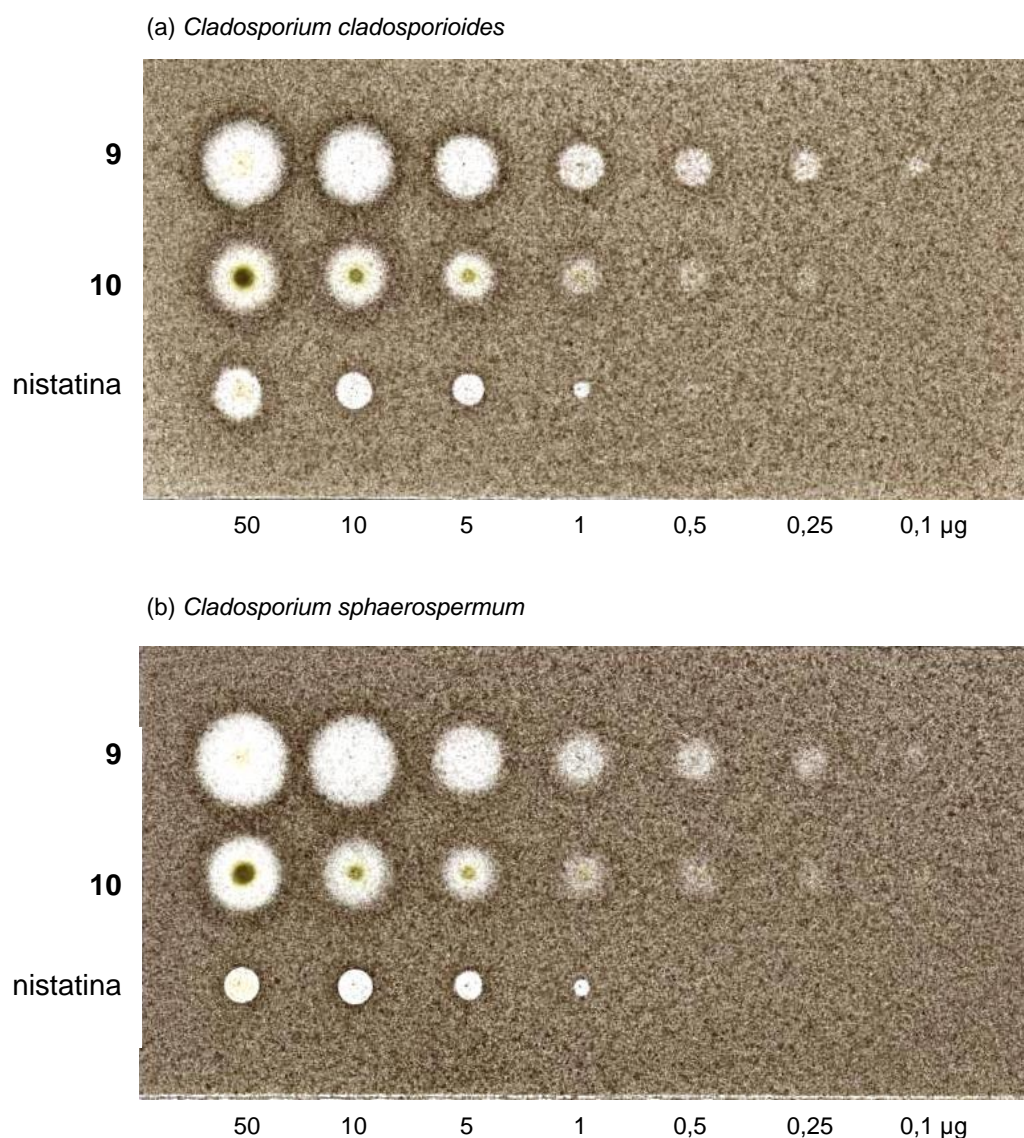
As flavanonas **7 e 8** isoladas de *Piper marginatum* apresentaram maior atividade antifúngica entre os metabólitos isolados da espécie, com atividade comparável aos padrões utilizados como controle. Os fenilpropanóides **4 e 5** mostraram potencial antifúngico elevado em relação a **6**. Neste caso, a presença do grupo carbonila em **4 e 5** demonstra ser um fator importante na determinação da atividade antifúngica.

**Tabela 17.** Atividade antifúngica dos produtos naturais isolados **1** a **18**, e dos compostos padrão nistatina e miconazol, frente a *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Metabólitos secundários	Atividade antifúngica (µg)*	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
 <b>1</b>	50,0	50,0
 <b>2</b>	10,0	10,0
 <b>3</b>	5,0	10,0
 <b>4</b>	5,0	5,0
 <b>5</b>	5,0	5,0
 <b>6</b>	10,0	10,0
 <b>7</b>	1,0	1,0
 <b>8</b>	1,0	1,0
 <b>9</b>	0,1	0,25

Metabólitos secundários	Atividade antifúngica ( $\mu\text{g}$ )*	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
 <p><b>10</b></p>	0,5	0,5
 <p><b>11</b> n = 8 <b>12</b> n = 10 <b>13</b> n = 12 <b>14</b> n = 14</p>	25,0	50,0
 <p><b>15</b></p>	1,0	1,0
 <p><b>16</b></p>	1,0	1,0
 <p><b>17 e 18</b></p>	5,0	5,0
 <p><b>Nistatina (padrão)</b></p>	1,0	1,0
 <p><b>Miconazol (padrão)</b></p>	1,0	1,0

\*quantidade mínima necessária para inibir o crescimento dos fungos em placas cromatográficas de gel de sílica.



**Figura 70.** Placas dos ensaios de limite de detecção dos metabólitos isolados de *Peperomia alata* (**9** e **10**) e da substância controle nistatina.

Conforme observado na Tabela 17, os derivados policetídeos **9** e **10** isolados de *Peperomia alata* apresentaram forte potencial antifúngico, superior às substâncias controle nistatina e miconazol.

Entre eles, o policetídeo **9** foi o mais eficaz quando submetido aos ensaios de bioautografia, sendo necessário apenas 0,1 µg do ativo para principiar a inibição do crescimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium*

*sphaerospermum* (Figura 70). A diferença entre os potenciais de **9** e **10** pode ser vinculada a diversos fatores: à presença de um átomo de carbono a mais na cadeia lateral, e à dupla ligação entre C-4' e C-5' elevam a atividade de **9**; à presença do grupo metilenodióxi ligado ao anel aromático em **10** diminui o potencial quando comparado a **9**.

Entre as secolignananas **15** - **18** isoladas de *Peperomia glabella*, observou-se que a presença dos grupos metoxila em **17** e **18** é responsável pela diminuição da atividade fungitóxica de **17** e **18** em relação a **15** e **16**. Já entre as estruturas de **15** e **16**, nota-se que a presença da dupla ligação em **16** não causa modificação nos valores de atividade.

Sendo assim, essas observações sugerem importantes relações entre estrutura e atividade antifúngica, tendo em vista os resultados dos ensaios de limite de detecção apresentados pelos metabólitos isolados.

Alguns dos metabólitos caracterizados neste trabalho com atividade antifúngica também exprimem outras atividades biológicas. Um exemplo são os cromenos **1** e **2**, e a di-hidrochalcona **3** que se encontram descritos em *Piper aduncum* (Orjala *et al.*, 1993a e Orjala *et al.*, 1994), apresentando mínima (**2** e **3**) ou nenhuma (**1**) inibição frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, e frente ao fungo *Penicillium oxalicum*, em ensaios de atividade biológica.

Para os fenilpropanóides **4** – **6**, não há relatos sobre atividade biológica na literatura. Entretanto, as flavanonas **7** e **8** foram descritas de *Piper crassinervium* (Danelutte *et al.*, 2003), também mostrando alto potencial antifúngico frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, comparável com as substâncias controle.

As peperominas A (**17**) e E (**18**) encontram-se descritas na literatura, com registros de atividade antifúngica frente a *Spodoptera litura*, *Rhaphidopalpa foveicollis* e *Atractomorpha crenulata* (Govindachari *et al.*, 1998) e anti-tumoral (células VA-13 e HepG2) (Wu *et al.*, 2006). Entretanto, não há nenhum relato sobre o potencial antifúngico destas substâncias.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de bioprospecção foi direcionado à detecção e caracterização de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antifúngica observada em extratos brutos de espécies de *Piper* e *Peperomia*.

Os cromenos **1** e **2**, e a di-hidrochalcona **3** são reportados pela primeira vez em *Piper mollicomum*, sendo que este é o primeiro trabalho de estudo fitoquímico apresentado para a espécie (Lago *et al.*, 2007).

Em estudos anteriores de *Piper marginatum* (De Diaz e Gottlieb, 1979; Santos e Chaves, 2000) descreve-se a presença de derivados fenilpropanóicos, incluindo as propiofenonas **4** e **5** apresentadas neste trabalho. Entretanto, não há nenhum relato na literatura sobre o potencial biológico destes metabólitos. Além das propiofenonas **4** e **5**, foram detectadas duas flavanonas, ainda não descritas em *P. marginatum*, mas de ocorrência usual em outras espécies de *Piper* (Danelutte *et al.*, 2003), e um álcool secundário inédito **6**, todos apresentando atividade antifúngica quando submetidos aos ensaios de bioautografia.

A quantidade reduzida de **6**, obtida após fracionamento cromatográfico do extrato bioativo das folhas de *P. marginatum*, associada a rápida degradação desse metabólito, impossibilitou a determinação da configuração absoluta do produto natural. Assim, após preparação de **6** na sua forma racêmica, a mistura foi resolvida através de biocatálise (Novozym 435). Obtidos os dois estereoisômeros e fazendo-se uso da regra de Kazlauskas, foi possível definir que o produto natural **6** é majoritariamente composto pelo isômero denominado (+)-(*R*)-marginatumol (Reigada *et al.*, 2007).

O estudo fitoquímico biomonitorado da espécie *Peperomia alata* levou a identificação de dois derivados de acilresorcinóis inéditos **9** e **10**, com elevada



atividade antifúngica, superior à dos controles. A ocorrência desses derivados em Piperaceae é rara, porém frequente em espécies de Myristicaceae (Kato *et al.*, 1985; Azevedo *et al.*, 1997; Blumenthal *et al.*, 1997) o que permite associar filogeneticamente as duas famílias através de uma via metabólica.

Em estudo anterior realizado em *Peperomia glabella* (Monache e Compagnone, 1996), foi isolada apenas uma secolignana, a peperomina D. Neste trabalho, o estudo fitoquímico biomonitorado do extrato das folhas de *Peperomia glabella* revelou a presença de quatro acilresorcinóis de cadeia longa (11 - 14), sendo a estrutura de 14 isolada pela primeira vez como produto natural, e quatro secolignanas (15 - 18), das quais três ainda não descritas em *Peperomia glabella*, e uma delas (16) inédita na literatura. De acordo com o observado neste trabalho, verifica-se em *Peperomia glabella* a presença de metabólitos secundários provenientes de duas vias distintas, a via do acetato para formação dos acilresorcinóis, e do chiquimato para produção das secolignanas.

De acordo com o observado neste estudo, espécies de Piperaceae constituem-se numa importante fonte de novos produtos naturais bioativos. Os metabólitos secundários isolados das espécies estudadas foram organizados segundo as diferentes classes de produtos naturais, e todas apresentaram derivados com potencial atividade antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

Por fim, este estudo de bioprospecção em espécies de Piperaceae se mostrou bastante profícuo quanto à caracterização de metabólitos secundários biologicamente ativos. Para trabalhos futuros, uma análise mais profunda das estruturas dos metabólitos pode ser estudada, visando relacionar de forma concisa as estruturas e atividades biológicas. Além disso, os extratos que não foram

investigados, mas que apresentaram considerável atividade biológica constitui-se num excelente material para investigações bioprospectivas.

## 6. REFERÊNCIAS

- Alécio, A. C., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Kato, M. J., Furlan, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 637-639, **1998**.
- Andrade, E. H. A., Carreira, L. M. M., Da Silva, M. H. L., Da Silva, J. D., Bastos, C. N., Sousa, P. J. C., Guimarães, E. F., Maia, J. G. S. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, n. 1, p. 197-208, **2008**.
- Azevedo, N. R., Santos, S. C., Miranda, E. G., Ferri, P. H. A 2-acylcyclohexane-1,3-dione from *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 1375 - 1377, **1997**.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Bollinger, W. H. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science*, v. 228, p. 1154-1160, **1985**.
- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Furlan, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 899-902, **1999**.
- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P., Kato, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 339-343, **1999**.
- Blumenthal, E. E. A., Da Silva, M. S., Yoshida, M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 745-749, **1997**.
- Burke, B., Nair, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* species. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1427-1430, **1986**.
- Chaves, M. C. O., Santos, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia*, v. 73, p. 547-549, **2002**.
- Chaves, M. C. O., Oliveira, A. H., Santos, B. V. O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 75-77, **2006**.

- Chaves, M. C. O., Santos, B. V. O., Oliveira, A. H. 1-cinnamoyl pyrrolidide from *Piper marginatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 1213-1214, **2003**.
- Chen, C.-M., Jan, F.-Y., Chen, M.-T., Lee, T.-J. Peperomins A, B, and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. *Heterocycles*, v. 29, n. 3, p. 411-414, **1989**.
- Cheng, M.-J.; Lee, S.-J.; Chang, Y.-Y.; Wu, S.-H., Tsai, I.-L.; Jayaprakasam, B.; Chen, I.-S. Chemical constituents from *Peperomia sui*. *Phytochemistry*, v. 63, p. 603-608, **2003**.
- Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Kato, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hidroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, v. 64, p. 555-559, **2003**.
- De Diaz, A. M. P., Gottlieb, O. R., Chemistry of Brazilian Piperaceae. 1. Propiophenones from *Piper marginatum*. *Planta Medica*, v. 35, n. 2, p. 190-191, **1979**.
- Demain, A. L., Fang, A. Q. The natural functions of secondary metabolites. *History of Modern Biotechnology I*, v. 69, p. 1-39, **2000**.
- Díaz, P. P., Arias, T., Joseph-Nathan, P. A chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and a *c*-methyl flavanone from the bark of *Piper hostmannianum*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 809-811, **1987**.
- Dyer, L. A. e Palmer, A. N. *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. Kluwer Academic Publishers, New York. Cap. 7, **2004**.
- Facundo, V. A., Silva, S. A. F., Sa, A. L., Morais, S. M., Matos, C. R. R., Braz-Filho, R. Three new natural cyclopentenedione derivatives from *Piper carniconnectivum*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 1, p. 140-145, **2004**.
- Georgopapadakou, N. H. Antifungal: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 547-557, **1998**.

- Gonzalez, M. J. T. G., De Oliveira, C. J. C., Fernandes, J. O., Kijjoa, A., Herz, W. Further alkyl and alkenylphenols of *Knema laurina* and *Knema austrosiamensis*: location of the double bond in the alkenyl side chains. *Phytochemistry*, v. 43, p. 1333-1337, **1996**.
- Govindachari, T. R., Kumari, G. N. K., Partho, P. D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 2129-2131, **1998**.
- Guimarães, E. F. e Giordano, L.C.S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará, *Rodriguésia*, 55, p. 21-46, **2004**.
- Homans, A. L., Fuchs, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography*, v. 51, p. 327-329, **1970**.
- Joshi, A. S., Li, X.-C., Nimrod, A. C., ElSohly, H. N., Walker, L. A., Clark, A. M. Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. *Planta Medica*, v. 67, n. 2, p. 186-188, **2001**.
- Kato, M. J., Furlan, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n. 4, p. 529-538, **2007**.
- Kato, M. J., Lopes, L. M. X., Fo, H. F. P., Yoshida, M., Gottlieb, O. R. The chemistry of Brazilian Myristicaceae. Part XXIV. Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*. *Phytochemistry*, v. 24, p. 533-536, **1985**.
- Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., Cuccia, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 56, n. 8, p. 2656-2665, **1991**.
- Kitamura R. O. S, Romoff, P., Young, M. C. M., Kato, M. J. e Lago, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry*, v. 67, p. 2398-2402, **2006**.
- Lago, J. G. L., Ramos, C. S., Casanova, C. C. D., Morandim, A. A., Bergamo, C. D., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M., Guimarães, E. F., Young, M. C. M.,

- Kato, M. J. Benzoic Acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1783-1788, **2004**.
- Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., Kato, M. J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. Dc. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, p. 153-156, **2005**.
- Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Reigada, J. B., Soares, M. G., Roesler, B. P., Kato, M. J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. Ihotzkyanum* (Piperaceae). *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, **2007**.
- Li, N., Wu, J. L., Hasegawa, T., Sakai, J., Bai, L., Wang, L., Kakuta, S., Furuya, Y., Ogura, H., Kataoka, T., Tomida, A., Tsuruo, T., Ando, M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products*, v. 7, n. 6, p. 998-1001, **2007**.
- Liu, Y-L, Ho, D. K. e Cassady, J. M. Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 3, p. 357-363, **1992**.
- Luckner, M. Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals. Martin Luckner. Ed. 2, Berlin; New York : Springer-Verlag, 563 pp, **1990**.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, A., Cavé, A. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galiodes*. *Journal of Natural Products*, v. 58, p. 324-327, **1995**.
- Mann, J. Chemical aspects of biosynthesis. Oxford University Press, Oxford, 92 pp, **1994**.
- Marques, J. V., Kitamura, R. O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., Kato, M. J. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 12, p. 2036-2039, **2007**.
- Martins, A. P., Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Canigüeral, S., Casanova, J., Da Cunha, A. P., Adzet, T. Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*, v. 49, p. 2019-2023, **1998**.

- Monache, F. D., Compagnone, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. *Phytochemistry*, v. 43, p. 1097-1098, **1996**.
- Montanari, C. A., Bolzani, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, **2001**.
- Moreira, D. L.; De Souza, P. O.; Kaplan, M. A. C.; Guimarães, E. F. Essential oil analysis of four *Peperomia* species (Piperaceae). *Acta Horticulturae*, n. 500, p. 65-69, **1999**.
- Moreira, D. L., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C. Non-polar constituents from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 1339-1342, **1998**.
- Moreira, D. L., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C. A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 783-786, **2000**.
- Nair, M. G., Mansingh, A. P., Burke, B. A. Insecticidal properties of some metabolites of jamaican *Piper* spp, and the amides synthesized from 5,6-*Z* and *E*-butenolides of *Piper fadyenii*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 50, n. 12, p. 3053-3058, **1986**.
- Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Cavalheiro, A. J., Furlan, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, v. 55, p. 621-626, **2000**.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, **2007**.
- Ohzeki, K., Yoshioka, Y. Black and white photothermographic material and image forming method. *United States Patent Application Publication*, 72p. US 2007026348 A1 20070201, **2007**.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T., Sticher, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, v. 34, p. 813-818, **1993a**.
- Orjala, J., Wright, A. D., Erdelmeier, C. A. J., Sticher, O., Rali, T. New monoterpene-substituted dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 76, n. 4, p. 1481-1488, **1993**.

- Orjala, J., Wright, A. D., Behrends, H., Folkers, G., Sticher, O., Ruegger, H., Rali, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 1, p. 18-26, **1994**.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., Boll, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 597-673, **1997**.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N., Jain, R., Sharma, N. K., Tyagi, O. D., Lawrie, S. J., Errington, W., Howarth, O. W., Olsen, C. E., Singh, S. K., Wengel, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry*, v. 49, p. 1069-1078, **1998**.
- Pio-Corrêa, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, GB, Brasil, **1984**.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A. e Moulis, C. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1312-1320, **2007**.
- Poulter, C. D. Bioorganic Chemistry. A Natural Reunion of the Physical and Life Sciences. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 74, p. 2631-2645, **2009**.
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., Miranda-Esquivel, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, v. 33, n. 7, p. 1266-1278, **2006**.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E., Hostettmann, K. Antifungal tests in phytochemical investigations – comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica*, v. 60, p. 41-44, **1994**.
- Raminelli, C., Comasseto, J. V., Andrade, L. H., Porto, A. L. M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435). *Tetrahedron:Asymmetry*, v. 15, n. 19, p. 3117-3122, **2004**.



- Ramos, L. S., Da Silva, M. L., Luz, A. I. R., Zoghbi, M. G. B., Maia, J. G. S. Essential oil from *Piper marginatum*. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 4, p. 712-713, **1986**.
- Reigada, J. B., Tcacenco, C. M., Andrade, L. H., Kato, M. J., Porto, A. L. M., Lago, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (*RS*)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron:Asymmetry*, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, **2007**.
- Roussis, V., Ampofo, S. A., Wiemer, D. F. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 1787-1788, **1990**.
- Salazar, K. J. M., Paredes, G. E. D., Lluncor, L. R., Young, M. C. M. and Kato, M. J., Chromenes of polyketide origin in *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 573-579, **2005**.
- Santos, B. V. O., Chaves, M. C. O. 2,4,5-trimethoxypropiophenone from *Piper marginatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, p. 539-541, **1999**.
- Santos, B. V. O., Chaves, M. C. O. (*E,E*)-*N*-isobutyl-2,4-octadienamida from *Piper marginatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, p. 113-114, **1999a**.
- Santos, B. V. O., Chaves, M. C. O. Assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C resonance signals in 2-methoxy-4,5-methylenedioxypropiophenone with the assistance of 1D and 2D NMR experiments. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 19, n. 1, p. 45-47, **2000**.
- Santos, B. V. O., Da Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. O., Gray, A. I. Croweacin from *Piper marginatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 25, n. 5, p. 471-472, **1997**.
- Santos, B. V. O., Da Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. O., Gray, A. I. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 1381-1384, **1998**.
- Santos, P. R. D., Moreira, D. L., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytochemistry*, v. 58, p. 547-551, **2001**.

- Seeram, N. P., Lewis, A. W., Jacobs, H., Nair, M. G., McLean, S., Reynolds, W. Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 399-402, **2000**.
- Siddiqui, B. S., Begum, S., Gulzar, T., Farhat, N.F. An amide from fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, v. 45, p. 1617-1619, **1997**.
- Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. S., Meda, C. I., Young, M. C. M., Furlan, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*, *Phytochemistry*, v. 59, p. 521-527, **2001**.
- Smith, R. M. Kava lactones in *Piper methysticum* from Fuji. *Phytochemistry*, v. 22, p. 1055-1056, **1983**.
- Soares, M. G., De Felipe, A. P. V., Guimarães, E. F., Kato, M. J., Ellena, J., Doriguetto, A. C. 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone from leaves of *Peperomia glabella*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 7, p. 1205-1210, **2006**.
- Srinivasan, K. Black Pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, p. 735-748, **2007**.
- Terreaux, C., Gupta, M. P., Hostettmann, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 461-464, **1998**.
- Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., Paris, R. R. *Flavonoids from Piper marginatum* - Isolation of a new flavonoid, marginatoside. *Planta Medica*, v. 33, n. 1, p. 46-52, **1978**.
- Veloza, L. S. M., Ferreira, M. J. P., Santos, M. I. S., Moreira, D. L., Emerenciano, V. P., Kaplan, M. A. C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 492-496. **2006**.
- Vieira, P. C., De Alvarenga, M. A., Gottlieb, O. R., Gottlieb, H. E. 4-hexadecenylphenol and flavonoids from *Piper hispidum*. *Planta Medica*, v. 39, n. 2, p. 153-156, **1980**.

- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M.-S., Quandt, D., Neinhuis, C. Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42, p. 477-497, **2007**.
- Wanke, S., Samain, M. S., Vanderschaeve, L., Mathieu, G., Goetghebeur, P., Neinhuis, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the *trnK/matK* region (cpDNA). *Plant Biology*, v. 8, p. 93-102, **2006**.
- Wu, J., Li, N., Hasegawa, T., Sakai, J., Mitsui, T., Ogura, H., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Tomida, A., Turuo, T., Li, M., Tang, W., Ando, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 790-794, **2006**.
- Xu, S., Li, N., Ning, M-M., Zhou, C-H., Yang, Q-R., Wang, M-W. Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 247-250, **2006**.
- Yamaguchi, L. F., Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Di Mascio, P. and Kato, M. J. Antioxidant activities of prenylated hydroquinones and benzoic acid from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1838-1843, **2006**.
- Yuncker, T. G. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, v. 2, p. 19-366, **1972**.
- Yuncker, T. G. The Piperaceae of Brazil. II. *Piper* group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea*, v. 3, p. 29-284, **1973**.
- Yuncker, T. G. The Piperaceae of Brazil. III. *Peperomia*; taxa of uncertain status. *Hoehnea*, v. 4, p. 71-413, **1974**.
- Zhang, G-L., Li, N., Wang, Y-H., Zheng, Y-T., Zhang, Z., Wang, M-W. Bioactive Lignans from *Peperomia heyneana*. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 662-664, **2007**.

## SÚMULA CURRICULAR

### **DADOS PESSOAIS**

Juliana Beltrame Reigada

Data de nascimento: 28 de abril de 1984

Local: São Paulo, SP - Brasil

### **EDUCAÇÃO**

Ensino Médio regular: Colégio Agostiniano São José - São Paulo/SP  
1999-2001

Graduação: Universidade de São Paulo - São Paulo/SP  
Bacharelado em Química  
Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas  
2002-2005

Pós-Graduação: Universidade de São Paulo - São Paulo/SP  
Mestrado em Química - Área: Química Orgânica  
2006-2009  
Bolsa de Mestrado FAPESP - abril/2007 a outubro/2007  
Bolsa de Mestrado CNPq - março/2006 a março/2007

### **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

#### **Iniciação Científica**

Laboratório de Química de Produtos Naturais IQ-USP/SP, sob orientação do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, no período de agosto/2002 a dezembro/2005. Bolsa PIBIC/CNPq no período de agosto/2003 a dezembro/2005.

### **OCUPAÇÃO**

2007 – atual. Química de Projetos pela empresa NGS Inspeções Serviços Técnicos e Consultoria Ltda., a serviço da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., no cargo de Analista Químico.

## **PUBLICAÇÕES**

### **Artigos Completos**

Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Reigada, J. B., Soares, M. G., Roesler, B. P., Kato, M. J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. Ihotzkyanum* (Piperaceae). *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, **2007**.

Reigada, J. B., Tcacenco, C. M., Andrade, L. H., Kato, M. J., Porto, A. L. M., Lago, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron:Asymmetry*, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, **2007**.

### **Resumos em Congressos**

Reigada, J. B., Rodrigues, C. A., Yamaguchi, L. F., Lago, J. H. G., Kato, M. J. Unusual secolignans from *Peperomia glabella* species. 1st Brazilian Conference on Natural Products – BCNP e XXVII Reunião Anual sobre evolução, sistemática e ecologia micromoleculares – RESEM, **2007**.

Reigada, J. B., Aquino, P. M., Lago, J. H. G., Kato, M. J. Secolignanans das folhas de *Peperomia glabella*. 30ª Reunião Anual da SBQ, **2007**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Kato, M. J. Isolamento e caracterização de acilresorcinóis de *Peperomia glabella*. 29ª Reunião Anual da SBQ, **2006**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Tcacenco, C. M., Porto, A. L. M., Andrade, L. H., Kato, M. J. Preparação, resolução enzimática e determinação da configuração absoluta do marginatol - um produto natural isolado de *Piper marginatum*. III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, **2006**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Tcacenco, C. M., Porto, A. L. M., Andrade, L. H., Kato, M. J. Preparação e resolução através de biocatálise do 3,4-metilenodioxo-1-(1-hidroxipropil)benzeno. 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP, **2005**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Tcacenco, C. M., Porto, A. L. M., Andrade, L. H., Kato, M. J. Preparação e resolução através de biocatálise do 3,4-metilenodioxo-1-(1-hidroxipropil)benzeno. 28ª Reunião Anual da SBQ, **2005**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Acilresorcinóis com potencial fungitóxico de *Peperomia alata*. 28ª Reunião Anual da SBQ, **2005**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Kato, M. J. Reação de desidratação intermolecular de um fenilpropanóide isolado de *Piper marginatum* – verificação através de RMN e CG/EM. XXVI Reunião Anual sobre evolução, sistemática e ecologia micromoleculares – RESEM, **2004**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Bioprospecção em espécies de Piperaceae – Estudo químico biomonitorado de *Piper marginatum*. 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP, **2004**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Bioprospecção em espécies de Piperaceae – Estudo químico biomonitorado de *Piper marginatum*. 21ª Semana da Química do Instituto de Química da USP-SP, **2004**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Propiofenonas antifúngicas das folhas de *Piper marginatum*. 27ª Reunião Anual da SBQ e XXVI Congresso Latino-americano de Química, **2004**.

Reigada, J. B., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Agentes fungitóxicos de espécies de Piperaceae – Estudos de bioprospecção e fracionamento fitoquímico biomonitorado. XXV Reunião Anual sobre evolução, sistemática e ecologia micromoleculares – RESEM, **2003**.

Reigada, J. B., Gonçalves, L. C. P., Lago, J. H. G., Young, M. C., Kato, M. J. Bioprospecção em espécies de Piperaceae – busca de potenciais agentes antifúngicos. 26ª Reunião Anual da SBQ, **2003**.

# 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](#)