

JOÃO MARCOS BATISTA JUNIOR

Dicroísmo circular vibracional e eletrônico na determinação da configuração absoluta de benzopiranos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae): implicações biológicas e biossintéticas

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan
Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Noelí
López

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

B333d Batista Junior, João Marcos
Dicroísmo circular vibracional e eletrônico na determinação da configuração absoluta de benzopiranos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae) : implicações biológicas e biossintéticas / João Marcos Batista Junior. – Araraquara : [s.n], 2012
215 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Silvia Noelí López


1. Produtos naturais. 2. Dicroísmo circular.
3. Métodos quirópticos. 4. Teoria do funcional de densidade.
I. Título.

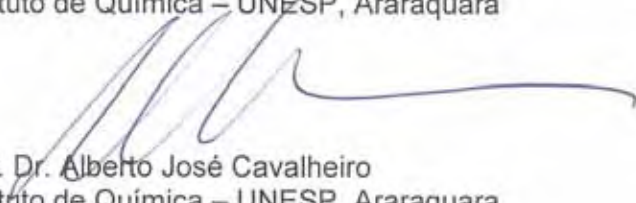
JOÃO MARCOS BATISTA JUNIOR

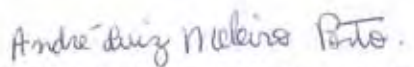
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

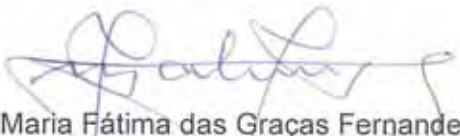
Araraquara, 15 de fevereiro de 2012.


BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Maysa Furlan (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
Instituto de Química – USP, São Carlos


Profª Drª Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos


Prof. Dr. Angelo da Cunha Pinto
Instituto de Química – UFRJ, Rio de Janeiro

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome	João Marcos Batista Junior
Filiação	João Marcos Batista e Telma Blanco Matias
Nascimento	04/03/1983
Naturalidade	Araraquara, SP
Nacionalidade	Brasileira
Estado Civil	Casado
Profissão	Farmacêutico-Bioquímico
E-mail	joaombj@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

Curso: Farmácia-Bioquímica, modalidade Fármacos e Medicamentos
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil
Período: Março de 2002 a Dezembro de 2006

Pós-Graduação

Curso: Doutorado em Química
Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil
Projeto: Dicroísmo circular vibracional e eletrônico na determinação da configuração absoluta de benzopiranos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae): implicações biológicas e biossintéticas
Financiamento: FAPESP
Orientadora: Maysa Furlan
Período: Março de 2007 – atual

Curso: Estágio de Doutorando – PDEE (Sanduíche)
Instituição: Syracuse University, Syracuse, NY, Estados Unidos
Área de Concentração: Química Orgânica
Projeto: Determinação da configuração absoluta de novos ésteres de cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* através de dicroísmo circular vibracional (VCD)
Financiamento: CAPES
Orientador: Laurence A. Nafie
Período: Novembro de 2009 a Outubro de 2010

Estágios

Estágio de Treinamento em Parasitologia
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil
Orientador: João Aristeu da Rosa

Período: Abril de 2002 a Setembro de 2003

Estágio de Iniciação Científica

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Projeto: Estudo químico e biológico em *Piper gaudichaudianum* e *Piper aduncum*

Financiamento: FAPESP

Orientadora: Maysa Furlan

Período: Setembro de 2004 a Novembro de 2006

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

LOURENÇO, T. C.; BATISTA, J. M.; FURLAN, M.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; SANTANA, C. C.; CASS, Q. B. Albendazole sulfoxide enantiomers: preparative chiral separation and absolute stereochemistry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.070, Jan. 2012.

FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 245-249, Sept. 2011.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1154-1160, May 2011.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 76, n. 8, p. 2603-2612, Apr. 2011.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron: Asymmetry**, New York, v. 21, n. 19, p. 2402-2407, Oct. 2010.

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

RINALDO, D.; BATISTA, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin

diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, New York, v. 22, n. 8, p. 726-733, Aug. 2010.

BATISTA, A. N. L.; BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; NUNOMURA, S. M.; YOSHIDA, M. Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 321-323, jan. 2010.

MOTA, J. S.; LEITE, A.; BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 6, p. 620-623, May 2009.

BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; MOTA, J. S.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and absolute configuration assignment of a natural racemic chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality**, New York, v. 21, n. 9, p. 799-801, Oct. 2009.

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

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, n. 3, p. 538-540, Mar. 2008.

Trabalhos submetidos para publicação

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of structure and absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Chirality**, New York, 2011, submetido, registrado sob código: CHIR-11-0150.

FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, 2012, submetido, registrado sob código: OB-ART-01-2012-025109.

Trabalhos publicados em anais de congressos

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration determination of complex chiral natural product molecules using vibrational circular dichroism (VCD): a case study.

In: 50th ANNIVERSARY MEETING OF THE PHYTOCHEMICAL SOCIETY OF NORTH AMERICA (PSNA), 2011, Kohala Coast.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M. Stereochemistry of gaudichaudianic acid enantiomers: biological and biosynthetic implications. In: 3rd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2011, Ouro Preto. Painel Premiado.

BATISTA, J. M.; MANISCALCO, D. A.; BATISTA, A. N. L.; FURLAN, M.; LÓPEZ, S. N. Absolute configuration of a homoisoflavanone and a dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* using quantum chemical calculations of ECD and OR. In: 3rd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2011, Ouro Preto.

FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. In: 3rd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2011, Ouro Preto.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. In: SÃO PAULO ADVANCED SCHOOL ON CHEMISTRY (ESPCA) NATURAL PRODUCTS, MEDICINAL CHEMISTRY, AND ORGANIC SYNTHESIS INTEGRATED SOLUTIONS FOR TOMORROW'S WORLD, 2011, Campinas.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of structure and absolute configuration of a new diastereomeric mixture. In: 13th INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHIROPTICAL SPECTROSCOPY (CD2011), 2011, Oxford. Trabalho selecionado para apresentação oral.

BOONE, C. V.; NASARIO, D. D.; TROMBINE, D. C.; JELLER, A. H.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTA, J. M.; POTT, A.; MOTA, J. S. Estudo químico do extrato hexânico das folhas de *Bauhinia unguolata*. In: 33^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2010, Águas de Lindóia.

TROMBINE, D. C.; BOONE, C. V.; NASARIO, D. D.; MACIEL, A.; BATISTA, J. M.; JELLER, A. H.; CARDOSO, C. A. L.; POTT, A.; MOTA, J. S. Avaliação da atividade antioxidante das folhas e dos caules de *Bauhinia unguolata* e *Bauhinia holophylla*. In: 33^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2010, Águas de Lindóia.

VIEIRA, G. A. L.; BATISTA, J. M.; SIQUEIRA, M. C.; LAURE, H. J.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; FURLAN, M.; CICARELLI, R. M. B. Influência proteômica de substâncias de *Peperomia obtusifolia* em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. In: V SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2010, Itajaí.

LOPEZ, S. N.; BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Metabolic and proteic profile of *Piper*

gaudichaudinaum Kunth (Piperaceae). In: 42nd IUPAC CONGRESS - CHEMICAL SOLUTIONS, 2009, Glasgow.

FLAUSINO JR., O.; BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; ALTEI, W. F.; FURLAN, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Search for protease-inhibiting compounds from Cerrado and Atlantic plant species. In: 42nd IUPAC CONGRESS - CHEMICAL SOLUTIONS, 2009, Glasgow. Trabalho selecionado para apresentação oral (Flash Poster Presentation).

BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; SANTOS, A. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; AMBROSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution, absolute configuration assignment and trypanocidal activity of two natural racemic chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). In: 2nd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2009, São Pedro.

BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; VANZOLINI, K. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Racemic resolution and absolute configuration assignment of a natural chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). In: 20th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHIRALITY - ISCD, 2008, Genebra.

BOLZANI, V. S.; FLAUSINO JR., O.; BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; FURLAN, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S. Search for protease-inhibiting compounds from Cerrado and Atlantic plant species. In: 7th JOINT MEETING OF AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008, Atenas. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74. n. 9, p. 1122, July 2008.

LOPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Bioactive C-geranylated metabolites from *Piper crassinervium*: biological and biosynthetic studies. In: 7th JOINT MEETING OF AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008, Atenas. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 9, p. 1163-1164, July 2008.

BATISTA, J. M.; FLAUSINO JR., O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Cromenos isolados de *Piper aduncum* e *P. gaudichaudianum* com potencial atividade inibidora de protease serínica frente ao substrato de HIV protease. In: 31^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2008, Águas de Lindóia.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; FLAUSINO JR., O.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Potencial biológico de benzopiranos isolados de espécies de Piperaceae e análogos. In: VI SIMPÓSIO E VI REUNIÃO DE AVALIAÇÃO DO PROGRAMA BIOTA/FAPESP, 2008, Araraquara.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antimalarial chromenes from *Piper* species and pyrones derivatives. In: 1st BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2007, São Pedro.

MOTA, J. S.; BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de cromenos de espécies de Piperaceae. In: 30^a REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2007, Águas de Lindóia.

LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA, J. M.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of extracts from five *Piper* species (Piperaceae). In: 6th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2007, Ribeirão Preto.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; REGASINI, L. O.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Potencial anti-chagásico de cromenos naturais e análogos semi-sintéticos de *Piper aduncum* e *P. gaudichaudianum* (Piperaceae). In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia. Trabalho selecionado para apresentação oral na sessão coordenada de Produtos Naturais/Química Orgânica/Química Medicinal.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal chromenes from *Piper gaudichaudianum* and *Piper aduncum* (Piperaceae). In: 5th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES - CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, Supl. 1, p. 316. Trabalho contemplado com Menção Honrosa.

LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; REGASINI, L. O.; AMBROSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. *In vitro* activity of secondary metabolites from *Piper crassinervium* (Piperaceae) against *Trypanosoma cruzi*. In: 5th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES - CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, Supl. 1, p. 317.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; FRACASSO, J. F.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Anti-inflammatory activities of three flavanones from *Piper gaudichaudianum* e *Piper crassinervium* (Piperaceae). In: 52^a JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 2005, Araraquara.

AMBROSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; CICARELLI, R. M. B. Trypanocidal activity of *Piper* species (Piperaceae). In: XXI MEETING OF BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY/XXXII ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE/INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VESICLE TRAFFICKING IN PARASITIC PROTOZOA, 2005, Caxambú. **Proceedings**, p. 164-165.

Participações em eventos

50th Anniversary Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA), Kohala Coast, HI, USA, Dec. 2011.

3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), Ouro Preto, MG, Brazil, Oct. 2011.

São Paulo Advanced School on Chemistry (ESPCA) Natural Products, Medicinal Chemistry, and Organic Synthesis Integrated Solutions for Tomorrow's World, Campinas, Brazil, Aug. 2011.

13th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2011), Oxford, UK, July 2011.

Second International Conference on Vibrational Optical Activity (VOA-2) and Bio-Medical Applications of Raman Spectroscopy (BMARS), Albany, NY, USA, Aug. 2010.

Vanderbilt Summer Workshop on Chiral Molecular Structural Determination & Analysis, Nashville, TN, USA, June 2010.

42nd IUPAC Congress - Chemical Solutions, Glasgow, UK, Aug. 2009.

20th International Symposium on Chirality – ISCD, Geneva, Switzerland, July 2008.

31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, Brasil, maio 2008.

1st Brazilian Conference on Natural Products – BCNP, São Pedro, SP, Brazil, Nov. 2007.

29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, Brasil, maio 2006.

V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, Águas de Lindóia, SP, Brasil, nov. 2005.

52^a Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, SP, Brasil, ago. 2005.

50^a Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, SP, Brasil, ago. 2003.

49^a Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, SP, Brasil, ago. 2002.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha esposa Andrea pelo amor e apoio incondicional a todos meus projetos de vida. Dedico ainda ao meu filho João, que tanta alegria trouxe nas etapas finais de redação desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Maysa Furlan um agradecimento especial pela confiança, orientação, carinho e paciência durante todos esses anos.

À minha coorientadora Profa. Sílvia N. López pela amizade, orientação, carinho e também por estar sempre presente independentemente da distância geográfica.

À minha esposa Dra. Andrea N. L. Batista por ser minha companheira, conselheira e meu porto seguro.

Ao meu filho João por me ensinar o verdadeiro valor e sentido da vida.

Aos meus pais João Marcos Batista e Dra. Telma Blanco Matias pelo exemplo, apoio e por acreditarem tanto em mim.

Ao Instituto de Química de Araraquara - UNESP.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Química Orgânica, pelo convívio sempre saudável e pela amizade.

Aos professores e amigos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) pela colaboração e amizade.

Aos funcionários das diversas seções do IQ, pela colaboração e, em especial, às funcionárias da seção de pós-graduação e da biblioteca.

Ao grupo de pesquisa de Biossíntese de Produtos Naturais.

Ao Prof. Daniel Rinaldo pela amizade e pelo auxílio nos experimentos de dicroísmo circular eletrônico.

Aos Drs. Alberto C. Alécio e Nivaldo Borale pelo suporte e amizade durante todos esses anos.

Aos Drs. Adriana A. Lopes e Luis Octávio Regasini e ao Prof. Jonas S. Mota pela amizade e pela ajuda nas etapas iniciais da minha formação científica.

Ao Prof. Massuo J. Kato do IQ/USP pela amizade e ajuda ao longo dos anos de trabalho com espécies de Piperaceae.

À Profa. Quezia B. Cass da UFSCar pela ajuda e conselhos durante o desenvolvimento desse trabalho.

To Prof. Laurence A. Nafie and Prof. Teresa B. Freedman for hosting me at Syracuse University and for teaching me different aspects of VOA. I also owe endless gratitude to Prof. Nafie for believing in me as a researcher and for all the support and advice he has offered me over the last two years.

To Dr. Rina K. Dukor and all BioTools team for helping me out during my time in Jupiter, Florida and for making it a memorable experience.

Ao Dr. Otávio Flausino Jr. pela amizade e realização dos ensaios de inibição de protease.

Ao grupo da Profa. Regina M. B. Cicarelli, em especial à Dra. Daniela L. Ambrósio e à MSc Gabriela D. Passerini, pela realização dos ensaios tripanocidas.

Ao Prof. Norberto Peporine Lopes e ao servidor José Carlos Tomaz pela realização dos experimentos de espectrometria de massas.

À FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

À CAPES pela bolsa de estágio de doutorando no exterior (PDEE).

RESUMO

Estudos fitoquímicos visando o isolamento de benzopiranos quirais foram realizados em *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). Da espécie *P. obtusifolia* foram isolados dois cromanos racêmicos, a peperobtusina A e o ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico, bem como oito ésteres isoméricos deste último com os monoterpenos borneol e fenchol, inéditos na literatura. *P. gaudichaudianum* forneceu o cromeno ácido gaudichaudiânico, também como racemato. As misturas estereoisoméricas foram resolvidas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência quiral e os estereoisômeros purificados tiveram sua configuração absoluta determinada por comparação dos espectros experimentais de dicroísmo circular vibracional e eletrônico com aqueles preditos por cálculos mecânico-quânticos *ab initio*. Peperobtusina A e o ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico foram assinalados como (+)-*R*, enquanto o ácido gaudichaudiânico foi assinalado como (+)-*S*. Os ésteres de cromano com borneol foram assinalados como (-)-2*S*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S* e (+)-2*R*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S*, enquanto os ésteres com fenchol foram assinalados como (-)-2*S*,1'''*R*,2'''*R*,4'''*S* e (+)-2*R*,1'''*R*,2'''*R*,4'''*S*. Com a configuração absoluta assegurada, foi possível a verificação do potencial tripanocida seletivo e sinérgico para os enantiômeros do ácido gaudichaudiânico e inibidor de HIV-1 protease seletivo para o (-)-(*S*)-ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico. Além disso, investigações de extratos apróticos de *P. obtusifolia* e *P. gaudichaudianum* sugeriram que os benzopiranos estudados são biossintetizados na forma de misturas racêmicas em diferentes órgãos vegetais e desde o estágio de plântula, no caso de *P. gaudichaudianum*. Portanto, esses resultados permitiram sedimentar o conhecimento e aplicação de métodos quirópticos, envolvendo dicroísmo circular e cálculos mecânico-quânticos, nos estudos de configuração absoluta de produtos naturais, além da investigação das suas implicações biológicas e biossintéticas.

Palavras-chave: Produtos naturais, métodos quirópticos, dicroísmo circular, teoria do funcional de densidade.

ABSTRACT

Phytochemical investigations focused on chiral benzopyrans were carried out on *Peperomia obtusifolia* and *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). Two racemic chromanes, peperobtusin A and 3,4-dihydro-5-hydroxy-2,7-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2-(4-methyl-1,3-pentadienyl)-2*H*-1-benzopyran carboxylic acid, as well as eight novel isomeric esters of the latter with the monoterpenes borneol and fenchol, were isolated from *P. obtusifolia*. *P. gaudichaudianum* afforded the racemic chromene gaudichaudianic acid. All stereoisomeric mixtures were resolved using chiral high performance liquid chromatography and the purified compounds had their absolute configuration determined by comparison of experimental vibrational and electronic circular dichroism spectra with those calculated using *ab initio* quantum-mechanical methods. Peperobtusin A and 3,4-dihydro-5-hydroxy-2,7-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2-(4-methyl-1,3-pentadienyl)-2*H*-1-benzopyran carboxylic acid were assigned as (+)-*R*, whereas gaudichaudianic acid was assigned as (+)-*S*. The borneol chromane esters were assigned as (–)-2*S*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S* and (+)-2*R*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S*, while the fenchol esters were assigned as (–)-2*S*,1'''*R*,2'''*R*,4'''*S* e (+)-2*R*,1'''*R*,2'''*R*,4'''*S*. Once the absolute configuration had been established it was possible to identify a selective and synergistic trypanocidal activity for the enantiomers of gaudichaudianic acid as well as a selective HIV-1 protease inhibitory potential for (–)-(*S*)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2,7-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2-(4-methyl-1,3-pentadienyl)-2*H*-1-benzopyran carboxylic acid. Moreover, further investigation on aprotic extracts from *P. obtusifolia* and *P. gaudichaudianum* suggested that the natural benzopyrans were biosynthesized as racemic mixtures in different plant organs, and from the seedling stage onward in *P. gaudichaudianum*. Therefore, these results led to a better understanding of the application of chiroptical methods, including circular dichroism and quantum-mechanical calculations, to determine the absolute stereochemistry of natural products as well as its biological and biosynthetic implications.

Keywords: Natural products, chiroptical methods, circular dichroism, density functional theory.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt acetato de etila
CC cromatografia em coluna
CCDC cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP cromatografia em camada delgada preparativa
CG cromatografia gasosa
Cl₅₀ concentração inibitória 50%
CLAE cromatografia líquida de alta eficiência
 δ deslocamento químico
d dubleto
DC dicroísmo circular
DAD detector de arranjo de diodos
DABCYL ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoil; γ -abu, γ -aminobutirico
DCE dicroísmo circular eletrônico
DCM diclorometano
DCV dicroísmo circular vibracional
dd duplo dubleto
ddd duplo duplo dubleto
DMSO dimetilsulfóxido
DO densidade óptica
DP desvio padrão
DRO dispersão rotatória óptica
EC efeito Cotton
EDANS ácido 5[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico)
EFS extração em fase sólida
EM espectrometria de massas
E rel. energia relativa
ESI *electrospray ionisation*
EtOH etanol
gCOSY *gradient correlation spectroscopy*
gHMBC *gradient heteronuclear multiple bond correlation*
gHMQC *gradient heteronuclear multiple quantum correlation*
grad. gradiente

Hex hexanos
AcOH ácido acético
HRESIMS *high resolution electrospray ionization mass spectrometry*
i-PrOH isopropanol
isoc. isocrático
IR índice de retenção
ISE índice de similaridade enantiomérica
IV espectroscopia no infravermelho
J constante de acoplamento
LIT *liver infusion tryptose*
m múltiplo
MeOH metanol
MFE modulador fotoelástico
MM *molecular mechanics*
MMFF *molecular mechanics force field*
MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
multipl. multiplicidade
NOE *nuclear Overhauser effect*
NOESY *nuclear Overhauser effect spectroscopy*
PCM *polirazable continuum model*
PMS *phenazinemethosulphate*
PR protease
PrOH 1-propanol
 R_f fator de retenção
RMN ressonância magnética nuclear
RMN de ^1H ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN de ^{13}C ressonância magnética nuclear de carbono treze
RO rotação óptica
s singleto
SCRF *self-consistent reaction field*
SDS *sodium dodecyl sulphate*
sl singleto largo
t tripleto
TF transformada de Fourier

TFD teoria do funcional de densidade

TFDTD teoria do funcional de densidade tempo-dependente

tl tripleto largo

TMS tetrametilsilano

TOF *Time of flight*

t_R tempo de retenção

UV ultravioleta

v.i. volume de injeção

Vis espectroscopia no visível

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH das folhas e caules de *Peperomia obtusifolia* 31
- Esquema 2** - Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH dos caules de *Piper gaudichaudianum* 33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos importantes isolados de plantas	3
Figura 2 - Exemplos de fármacos obtidos de fonte natural	6
Figura 3 - (1) Exemplar adulto de <i>Piper gaudichaudianum</i> (Fotografado por Adriana A. Lopes, 2004); (2) Plântulas de <i>P. gaudichaudianum</i> em meio nutritivo Murashige-Skoog com 9 semanas de vida (Fotografado por João M. Batista Jr., 2008)	16
Figura 4 - Substâncias reportadas em <i>Piper gaudichaudianum</i>	17
Figura 5 - Exemplar adulto de <i>Peperomia obtusifolia</i> (Fotografado por João M. Batista Jr., 2011)	19
Figura 6 - Substâncias reportadas em <i>Peperomia obtusifolia</i>	20
Figura 7 - Estruturas químicas e nomenclatura de piranos (a), 1-benzopiranos (b) e exemplos de alguns cromenos encontrados em Piperaceae (c)	22
Figura 8 - Biogênese para formação de benzopiranos quirais em <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i>	24
Figura 9 - Cromatograma obtido para 1 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, isocrático, <i>n</i> -hexano 100%, 0,7 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 10 µL, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os quatro picos presentes	35
Figura 10 - Cromatograma obtido para 2 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, isocrático, <i>n</i> -hexano 100%, 0,7 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 10 µL, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes	35
Figura 11 - Cromatograma obtido para 3 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 0,5 mg/mL, v.i. 50 µL, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes	36
Figura 12 - Cromatograma obtido para 4 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 µL, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois	

picos presentes	36
Figura 13 - Cromatograma obtido para 5 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes	37
Figura 14 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os compostos isolados de 1 , coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; isocrático, <i>n</i> -hexano 100%, 0,8 mL/min, detecção em 254 nm	38
Figura 15 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os compostos isolados de 2 , coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; isocrático, <i>n</i> -hexano 100%, 0,8 mL/min, detecção em 254 nm	39
Figura 16 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de 3 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm	39
Figura 17 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de 4 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm	40
Figura 18 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de 5 , coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, <i>n</i> -hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm	40
Figura 19 - Propostas de fragmentação para 1.1-1.4 utilizando EM-ESI	44
Figura 20 - Algumas correlações observadas nos experimentos <i>g</i> HMBC (H→C), ^1H - ^1H COSY e NOE comuns aos compostos 1.1-1.4	46
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 1.1	48
Figura 22 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 1.1	49
Figura 23 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 1.1	50
Figura 24 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 1.1	51

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.1	52
Figura 26 - Espectro gHMQC (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1	53
Figura 27 - Espectro gHMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1	54
Figura 28 - Experimento gCOSY (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1	55
Figura 29 - Experimento NOESY 1D de 1.1	56
Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, e íons filhos de 1.1 no modo positivo	57
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.2	58
Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.2	59
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.3	60
Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.3	61
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.4	62
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.4	63
Figura 37 - Algumas correlações observadas nos experimentos gHMBC (H \rightarrow C), ^1H - ^1H COSY e NOE comuns aos compostos 2.1 e 2.2	66
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	68
Figura 39 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	69
Figura 40 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	70
Figura 41 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	71
Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2.1	72
Figura 43 - Espectro gHMQC (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	73
Figura 44 - Espectro gHMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	74
Figura 45 - Experimento gCOSY (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1	75
Figura 46 - Experimento NOESY 1D de 2.1	76
Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, e íons filhos de 2.1 no modo positivo	77
Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.2	78
Figura 49 - Mapa de contorno gHMQC (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.2	79
Figura 50 - Mapa de contorno gHMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.2	80
Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3	83
Figura 52 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 3	84

Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3.1	85
Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3.2	86
Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4	87
Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 4	88
Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4.1	89
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4.2	90
Figura 59 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de 3 no modo positivo	91
Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de 4 no modo positivo	91
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5	95
Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 5	96
Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5.1	97
Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5.2	98
Figura 65 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de 5 no modo positivo	99
Figura - 66 Oscilação do campo elétrico E em função do tempo para ondas linear e circularmente polarizadas. (a) Luz linearmente polarizada, (b) Decomposição da luz linearmente polarizada em componentes circularmente polarizadas para esquerda e direita, (c) Luz circularmente polarizada para direita Fonte: CRABBÉ, 1974	108
Figura 67 - (a) Luz plano polarizada decomposta em duas componentes circularmente polarizadas, (b) Luz circularmente polarizada para a direita absorvida de maneira diferencial por um meio que apresenta dicroísmo circular, o que gera luz elipticamente polarizada (vetor campo elétrico E descreve uma elipse), (c) Luz elipticamente polarizada desviada pelo ângulo α ao atravessar meio que apresenta birrefringência circular. Os dois semi-eixos da elipse formam um triângulo cujo ângulo oposto ao semi-eixo menor é chamado ψ (elipsidade) Fonte: WOODY, 2000	110
Figura 68 - Esquema básico de um espectrômetro de DC. S fonte de luz, M monocromador (seletor de λ), L polarizador linear, P modulador fotoelástico, D	

- detector, **LI** amplificador do sinal, **PC** computador para processamento dos dados
 Fonte: BOBBITT, 1994 111
- Figura 69** - Ilustração da ação de um MFE com eixo lento (L) a $+45^\circ$ em relação a luz incidente verticalmente polarizada (VP) e ao observador posicionado na saída do feixe de luz. A radiação VP é resolvida em duas componentes linearmente polarizadas em fase. Após a passagem pelo elemento óptico, a componente a $+45^\circ$ é retardada em um quarto de onda em relação a -45° , resultando em luz circularmente polarizada para a direita (CPD) Fonte: NAFIE, 2011 112
- Figura 70** - Diagrama de blocos de um espectrômetro de DCV-TF. Fonte representada pelo espectrômetro **TF-IV**, **P** polarizador, **MFE** modulador fotoelástico, **A** amostra, **D** detector, **ALI** amplificador "lock-in", **REF** referência, **TF** transformada de Fourier. I_D representa o interferograma total no detector, I_{AC} o interferograma de DCV e I_{DC} o de IV 116
- Figura 71** - Fragmentos utilizados nas etapas iniciais de busca conformacional e otimização geométrica de **3** e **4** 127
- Figura 72** - Fragmento utilizado nas etapas iniciais de busca conformacional e otimização geométrica de **5** 130
- Figura 73** - Regra de helicidade ou sinal da contribuição da segunda esfera quiral para a banda 1L_b em cromanos. A seta representa o vetor momento de transição elétrico 132
- Figura 74** - Espectro experimental de DCE para os enantiômeros de **4**, assinalados como (-)-*R* (linha contínua) e (+)-*S* (linha tracejada) 133
- Figura 75** - Espectro experimental de DCE para os enantiômeros de **3**, assinalados como (-)-*R* (linha tracejada) e (+)-*S* (linha contínua) 134
- Figura 76** - Esquerda: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV para (-)-**3.1** (Preto) e (+)-**3.2** (Vermelho) com o calculado [B3LYP/6-31G(d)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confôrmeros de menor energia obtidos para (*R*)-**3**. Direita: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV para (-)-**4.1** (Preto) e (+)-**4.2** (Vermelho) com o calculado [B3LYP/6-31G(d)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confôrmeros

de menor energia obtidos para (R)-4. Os números representam fundamentais selecionados	135
Figura 77 - Espectro de DCV calculado [B3LYP/6-31G(d)], estruturas otimizadas e energia relativa dos confômeros de menor energia de (R)-3	136
Figura 78 - Espectro de DCV calculado [B3LYP/6-31G(d)], estruturas otimizadas e energia relativa dos confômeros de menor energia de (R)-4	136
Figura 79 - Espectros de DCV calculados [B3LYP/6-31G(d)] para (R)-3 e (R)-4, com e sem a inclusão de modo solvente CHCl ₃	137
Figura 80 - Comparação entre os espectros de DCV calculados [B3LYP/6-31G(d)] para (R)-4, com e sem a inclusão de aduto com ácido fórmico, e experimental para (+)-4	139
Figura 81 - Esquerda: espectros experimentais de DCE para (-)-(S)-3.1 (linha tracejada) e (+)-(R)-3.2 (linha contínua). Direita: espectros de DCE calculados [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confômeros de menor energia obtidos para (R)-3 (vermelho), bem como dos confômeros individuais: conf1 (azul), conf2 (amarelo), conf3 (verde) e conf4 (marrom). As barras representam forças rotacionais para o espectro de DCE médio	140
Figura 82 - Esquerda: espectros experimentais de DCE para (-)-(S)-4.1 (linha tracejada) e (+)-(R)-4.2 (linha contínua). Direita: espectros de DCE calculados [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confômeros de menor energia obtidos para (R)-4 (vermelho), bem como dos confômeros individuais: conf1 (verde), conf2 (azul), conf3 (amarelo) e conf4 (marrom). As barras representam forças rotacionais para os espectro de DCE médio	140
Figura 83 - Espectros experimentais de DCE para os ésteres de cromanos com monoterpenos 1.1-1.4 e 2.1-2.2, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	143
Figura 84 - Superior: espectros experimentais, no IV e de DCV, para (-)-1.1 (preto) e (+)-1.4 (vermelho) e calculados para derivado de borneol com configuração 2S,1'''S,2'''R,4'''S. Inferior: espectros experimentais para (+)-1.2	

(vermelho) e (-)-1.3 (preto) e calculados para 2R,1'''S,2'''R,4'''S. Os números representam fundamentais 145

Figura 85 - Superior: espectros experimentais, no IV e de DCV, para (-)-2.1 e calculados para derivado de fenchol com configuração 2S,1'''R,2'''R,4'''S. Inferior: espectros experimentais para (+)-2.2 e calculados para 2R,1'''R,2'''R,4'''S. Os números representam fundamentais 147

Figura 86 - Superposição de estruturas otimizadas e energias relativas dos quatro confôrmeros de menor energia identificados para derivados de borneol com configurações 2S,1'''S,2'''R,4'''S (acima) e 2R,1'''S,2'''R,4'''S (abaixo), utilizando tanto B3LYP/6-31G(d) quanto B3PW91/TZVP 148

Figura 87 - Superposição de estruturas otimizadas e energias relativas dos quatro confôrmeros de menor energia identificados para derivados de fenchol com configurações 2S,1'''R,2'''R,4'''S (acima) e 2R,1'''R,2'''R,4'''S (abaixo), utilizando tanto B3LYP/6-31G(d) quanto B3PW91/TZVP 149

Figura 88 - Estrutura dos seis novos ésteres isoméricos de cromanos com monoterpenos isolados de *Peperomia obtusifolia* 151

Figura 89 - Esquerda inferior: diferença dos espectros de DCV observado $[(1.2-1.1)/2]$ e calculado $[(2R,1'''S,2'''R,4'''S - 2S,1'''S,2'''R,4'''S)/2]$ para derivados de borneol. Esquerda superior: média simples dos espectros de DCV observado $[(1.1+1.2)/2]$ e calculado $[(2S,1'''S,2'''R,4'''S + 2R,1'''S,2'''R,4'''S)/2]$ para derivados de borneol. Direita inferior: diferença dos espectros de DCV observado $[(2.2-2.1)/2]$ e calculado $[(2R,1'''R,2'''R,4'''S - 2S,1'''R,2'''R,4'''S)/2]$ para derivados de fenchol. Direita superior: média simples dos espectros de DCV observado $[(2.1+2.2)/2]$ e calculado $[(2S,1'''R,2'''R,4'''S + 2R,1'''R,2'''R,4'''S)/2]$ para derivados de fenchol 152

Figura 90 - Estrutura e energia relativa dos oito confôrmeros de menor energia de (S)-5 utilizados na simulação [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] do espectro de DCE 154

Figura 91 - Esquerda: espectros experimentais obtidos para (+)-5.1 (linha sólida) e (-)-5.2 (linha tracejada). Direita: espectro teórico de DCE para (S)-5, calculado para a média dos oito confôrmeros de menor energia, segundo distribuição de

Boltzmann, no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d). As barras representam as forças rotacionais calculadas para o espectro de DCE médio	155
Figura 92 - Esquerda: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV de (+)- 5 com aqueles calculados [(B3LYP/6-31G(d))] para a média, segundo distribuição de Boltzmann, dos oito confôrmeros de menor energia obtidos para (S)- 5 . Os números representam fundamentais selecionados. Direita: comparação dos espectros teóricos no IV e de DCV obtidos para (S)- 5 fragmento com aqueles da molécula completa (S)- 5 . Os números representam frequências vibracionais selecionadas	156
Figura 93 - Estrutura e energia relativa dos quatro confôrmeros de menor energia de (S)- 5 fragmento aduto	157
Figura 94 - Estrutura e energia relativa dos oito confôrmeros de menor energia de (S)- 5 aduto utilizados na simulação [B3LYP/6-31G(d)] do espectro de DCV	158
F Figura 95 - Atividade tripanocida dos enantiômeros de 5 em diferentes proporções. O benznidazol foi utilizado como controle positivo	176
Figura 96 - Condições reacionais e rendimentos das reações de esterificação de 5	178
Figura 97 - Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 5.4 e ampliações	180
Figura 98 - Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 5.4	180
Figura 99 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de 5.4 no modo positivo	181
Figura 100 - Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 5.5 e ampliações	183
Figura 101 - Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 5.5	183
Figura 102 - Espectro de massas de baixa resolução, eletrospray, de 5.5 no modo positivo	184
Figura 103 - Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 5.6 e ampliações	185
Figura 104 - Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 5.6	186
Figura 105 - Espectro de massas de baixa resolução, eletrospray, de 5.6 no modo positivo	186
Figura 106 - Gráficos de atividade inibidora de HIV-1 protease para 4 , 4.1 , 4.2 e	

5. Linhas azuis representam a reação enzimática na ausência de inibidor; Linhas verdes representam reação enzimática na presença de inibidor na concentração de 2,5 μM para **4**, 1,7 para **4.1**, 2,8 para **4.2** e 17 para **5**; Linhas vermelhas representam reação enzimática na presença de inibidor na concentração de 4,9 μM para **4**, 2,8 para **4.1**, 5,1 para **4.2** e 22,6 para **5**. Linhas paralelas indicam inibição de dimerização 188
- Figura 107** - Possível mecanismo de racemização de **4** em condições próticas 190
- Figura 108** - Cromatogramas do extrato hexânico das folhas de *Peperomia obtusifolia* (tracejado) e de **4** (sólida). Coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, 5 μM , eluição isocrática, *n*-Hex/EtOH (99,5:0,5, v/v), vazão 0,7 mL/min e detecção em 254 nm 190
- Figura 109** - Cromatogramas da Fração Bruta contendo os monoterpenos **1.1-1.4** e **2.1-2.2** isolados de *Peperomia obtusifolia* (acima) e o novo composto **2.0** (abaixo). Coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μM , eluição isocrática, *n*-hexano 100%, vazão 0,8 mL/min e detecção em 254 nm 192
- Figura 110** - Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e NOESY 1D de **2.0** 192
- Figura 111** - Espectros experimentais de DCV de **2.0**, bem como da média simples dos espectros experimentais de **2.1** e **2.2** 193
- Figura 112** - Cromatogramas obtidos para o composto racêmico **5** (marron) e extratos AcOEt de folhas (azul), caules (rosa) e raízes (preto). Porção superior: plântulas (**A**) C-18 e (**B**) quiral. Porção inferior: planta adulta (**C**) C-18 e (**D**) quiral. Condições: (**A**) e (**C**) Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), modo gradiente, 5-100% de MeOH em AcOH aquoso (0,05%) em 30 min, seguido de 10 min em 100% de MeOH, 1,0 mL/min; (**B**) e (**D**) Phenomenex LUX Cellulose-1 (250 x 4,6 mm, 5 μm), modo isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,05% AcOH, 0,8 mL/min 196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metabólitos secundários isolados de espécies de Piperaceae	9
Tabela 2 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para 1.1-1.4 em CDCl_3	46
Tabela 3 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para 2.1 e 2.2 em CDCl_3	67
Tabela 4 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para 3 e 4 em CDCl_3	82
Tabela 5 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para 5 em CDCl_3	94
Tabela 6 - Constituintes do óleo essencial de <i>Peperomia obtusifolia</i>	101
Tabela 7 - Condições reacionais empregadas nas reações de esterificação	172
Tabela 8 - Atividade tripanocida das misturas racêmicas e enantiômeros isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	175
Tabela 9 - Atividade tripanocida do cromeno 5 e seus análogos gerados por modificação estrutural	177
Tabela 10 - Atividade inibidora de HIV-1 protease dos benzopiranos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> e <i>Piper gaudichaudianum</i>	188

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Estudos químicos em <i>Peperomia obtusifolia</i> e <i>Piper gaudichaudianum</i>	
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas	1
1.1.2 Piperaceae	6
1.1.3 A espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth	15
1.1.4 A espécie <i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.	17
1.1.5 Benzopiranos	21
1.2 OBJETIVOS	25
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
1.3.1 Material vegetal	26
1.3.2 Obtenção dos extratos vegetais	26
1.3.3 Cromatografia em camada delgada	26
1.3.4 Cromatografia em coluna (CC)	27
1.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
1.3.5.1 Solventes	27
1.3.5.2 Cromatógrafos	27
1.3.5.3 Colunas cromatográficas	28
1.3.6 Cromatografia gasosa (CG)	28
1.3.6.1 Cromatógrafo	28
1.3.6.2 Coluna cromatográfica	29
1.3.7 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas	29
1.4. PARTE EXPERIMENTAL	30
1.4.1 Isolamento dos benzopiranos de <i>Peperomia obtusifolia</i>	30
1.4.2 Isolamento do benzopirano majoritário de <i>Piper gaudichaudianum</i>	32
1.4.3 Análises espectrométricas e cromatográficas dos compostos isolados	34
1.4.4 Resolução das misturas enantioméricas e/ou diastereoisoméricas de 1-5	37

1.5.4 Extração do óleo essencial de <i>Peperomia obtusifolia</i>	40
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1.5.1 Elucidação/identificação estrutural das substâncias isoladas de <i>Peperomia obtusifolia</i> e <i>Piper gaudichaudianum</i>	42
1.5.1.1 Elucidação estrutural de 1.1-1.4	43
1.5.1.2 Elucidação estrutural de 2.1 e 2.2	64
1.5.1.3 Identificação estrutural de 3 e 4	81
1.5.1.4 Identificação estrutural de 5	92
1.5.2 Determinação da configuração absoluta dos compostos isolados	100
1.5.3 Análise do óleo essencial de <i>Peperomia obtusifolia</i>	100
CAPÍTULO 2 Determinação da configuração absoluta dos benzopiranos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> e <i>Piper gaudichaudianum</i>	
2.1 INTRODUÇÃO	102
2.1.1 Quiralidade e configuração absoluta	102
2.1.2 Dicroísmo circular eletrônico	106
2.1.3 Dicroísmo circular vibracional	114
2.2 OBJETIVOS	119
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	120
2.3.1 Técnicas espectroscópicas	120
2.3.2 Métodos computacionais	120
2.4 PARTE EXPERIMENTAL	123
2.4.1 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de 4, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	123
2.4.1.1 Medidas experimentais	123
2.4.1.2 Métodos computacionais	123
2.4.2 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de 3, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	125
2.4.2.1 Medidas experimentais	125
2.4.2.2 Métodos computacionais	126
2.4.3 Determinação da configuração absoluta 1.1-1.4 e 2.1-2.2, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	127

2.4.3.1 Medidas experimentais	127
2.4.3.2 Métodos computacionais	128
2.4.4 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de 5, isolados de <i>Piper gaudichaudianum</i>	128
2.4.4.1 Medidas experimentais	129
2.4.4.2 Métodos computacionais	129
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
2.5.1 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de 3 e 4, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	131
2.5.2 Determinação da configuração absoluta 1.1-1.4 e 2.1-2.2, isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	142
2.5.3 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros 5, isolados de <i>Piper gaudichaudianum</i>	152
CAPÍTULO 3 Implicações biológicas e biossintéticas	
3.1 INTRODUÇÃO	159
3.1.1 Doença de Chagas	159
3.1.2 Inibidores de protease	162
3.1.3 Implicações biossintéticas	163
3.2 OBJETIVOS	165
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	166
3.3.1 Material vegetal	166
3.3.2 Obtenção dos extratos vegetais	166
3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	167
3.3.3.1 Solventes	167
3.3.3.2 Cromatógrafos	167
3.3.3.3 Colunas cromatográficas	167
3.3.4 Ensaio tripanocida	167
3.3.5 Ensaio anti-HIV-1 protease	169
3.4 PARTE EXPERIMENTAL	171
3.4.1 Avaliação da atividade tripanocida	171
3.4.1.1 Esterificações de 5 e avaliação da atividade tripanocida	171

3.4.2 Avaliação da atividade inibidora de HIV-1 protease	172
3.4.3 Avaliação da presença do composto racêmico 4 no extrato aprótico das folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	172
3.4.4 Avaliação da presença do composto racêmico 5, em diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento de <i>Piper gaudichaudianum</i>	173
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
3.5.1 Avaliação da atividade tripanocida	174
3.5.2 Reações de esterificação	177
3.5.2.1 Elucidação estrutural de 5.4	179
3.5.2.2 Elucidação estrutural de 5.5	181
3.5.2.3 Elucidação estrutural de 5.6	184
3.5.3 Atividade inibidora de HIV-1 protease	186
3.5.4 Avaliação da presença do composto racêmico 4 no extrato aprótico das folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	189
3.5.5 Avaliação da presença do composto racêmico 5, em diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento de <i>Piper gaudichaudianum</i>	194
6 CONCLUSÕES	197
REFERÊNCIAS	199

CAPÍTULO 1

Estudo químico em *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas

As espécies vegetais compartilham, em maior ou menor grau, uma composição química básica no que concerne ao metabolismo primário, no entanto, diversas delas desenvolveram um metabolismo espécie-específico a fim de garantir sua sobrevivência em um dado ecossistema. Esse processo envolveu aspectos químicos complexos o que se reflete na grande diversidade química presente na natureza. Nesse contexto, parte das moléculas visa garantir o funcionamento da célula, ou seja, seu metabolismo primário, enquanto outros compostos são classificados como metabólitos secundários ou especiais, já que garantem sobrevivência e reprodução ao organismo produtor, atuando como defesa, feromônios, atrativos para polinizadores, sinalizadores químicos, dentre outros (MONTANARI; BOLZANI, 2001, VERPOORTE, 2001).

Desde o início da organização da vida social, a humanidade tem se utilizado de produtos naturais, principalmente de plantas, para os mais diversos fins. Dentre eles estão alimentação, vestimenta, moradia, produção de fibras e borracha, combustíveis, pesticidas, etc. No entanto, o maior desafio no desenvolvimento da humanidade pode ser considerado o combate às doenças e a melhoria da qualidade de vida. Para tanto, o conhecimento a respeito da utilização de plantas medicinais tem sido organizado em compêndios desde a antiguidade. Apesar de grande parte do conhecimento a respeito de plantas medicinais e práticas curativas ter sido transferido entre gerações de forma oral, civilizações como a Chinesa, Árabe, Indígena Americana (Asteca, Inca, Maia, etc.) e Européia apresentaram registros escritos do seu conhecimento tradicional, principalmente a *Materia Medica* e o *Papiro de Ebers* (VOGEL, 1991; HEINRICH, 2010).

Historicamente, as plantas são as mais importantes fontes de produtos naturais bioativos por diversas razões, dentre as quais, destaca-se a facilidade de coletar e identificar a biomassa vegetal, quando comparado a microorganismos e organismos marinhos, e o relato de vasta tradição de uso etnofarmacológico, o que auxilia na seleção das espécies a serem investigadas (CRAGG; NEWMAN; KINGSTON, 2010).

Embora ervas medicinais ainda sejam utilizadas, a maioria dos agentes terapêuticos contemporâneos são entidades químicas puras e bem definidas. A evolução a partir da exploração direta da natureza até os fármacos utilizados na clínica atual foi um processo lento e gradual, que se originou pelo empenho de pesquisadores no início do século XIX (WETZEL; LACHANCE; WALDMANN, 2010).

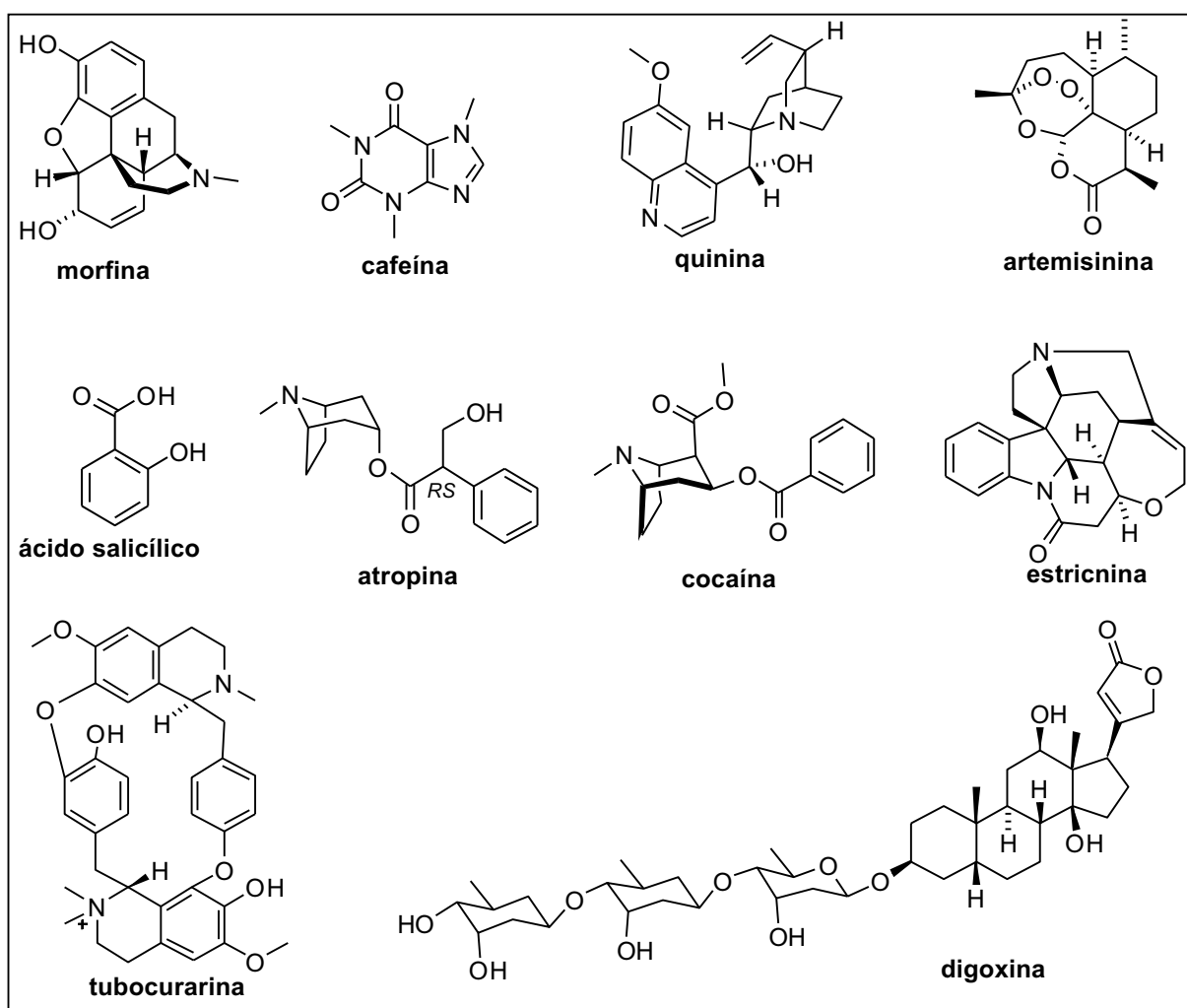
Em 1806, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam Sertürner reportou o que seria o isolamento do primeiro produto natural, o alcalóide morfina, a partir de *Papaver somniferum* (Papaveraceae), o qual viria a ser comercializado em 1927. Esse marco possibilitou a descoberta de diversas moléculas com potencial farmacológico a partir de fontes vegetais, como por exemplo a estriçnina isolada de *Strychnos* spp. (Loganiaceae), a quinina de *Chinchona* spp. (Rubiaceae), a artemisinina de *Artemisia annua* (Asteraceae), a cafeína de *Coffea arabica* (Rubiaceae), a atropina de *Atropa belladonna* (Solanaceae), a cocaína de *Erythroxylon coca* (Erythroxylaceae), o ácido salicílico de *Salix alba* (Salicaceae), a digoxina de *Digitalis lanata* (Plantaginaceae) e a tubocurarina de *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae) (HEINRICH, 2010) (Figura 1, pág. 3).

Mais recentemente, compostos isolados de fontes vegetais têm desempenhado um papel importantíssimo no tratamento do câncer e de doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer. Entre os compostos anticâncer destaca-se a podofilotoxina (Wartec[®]) primeiramente isolada de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), os alcalóides da vinca, vinblastina (Faublastina[®]) e vincristina (Oncovin[®]), isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), o paclitaxel (Taxol[®]) de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) e a camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), a qual é comercializada no Brasil na forma dos análogos topotecano (Hycamtin[®]) e irinotecano (Camptosar[®]). Em se tratando de compostos com ação no sistema nervoso central, vale destacar a galantamina (Reminyl[®]), isolada originalmente de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae), utilizada no tratamento do mal de Alzheimer (HEINRICH, 2010) (Figura 2, pág. 6).

Além de fornecer compostos farmacologicamente ativos, as plantas podem produzir substâncias que servem como inspiração para o desenvolvimento de fármacos. Dentre os diversos exemplos que se encontram no mercado, destaca-se o

hipoglicemiante oral metformina (Glifage[®]), uma biguanida semi-sintética derivada da galegina, uma guanidina isolada de *Galega officinalis* (Fabaceae), espécie usada no tratamento de diabetes desde a era medieval (BOUCHOUCHA; UZZAN; COHEN, 2011).

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos importantes isolados de plantas



Em contraste às substâncias puras, medicamentos a base de drogas vegetais ou derivados dessas, classificados como fitoterápicos na legislação brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010), também se encontram disponíveis comercialmente para o tratamento de diversas doenças. Apenas como

exemplos relacionados ao sistema nervoso central, pode-se citar *Ginkgo biloba* (Tebonin[®]) (Ginkgoaceae), *Hypericum perforatum* (Remotiv[®]) conhecida popularmente como Erva-de-São-João (Hypericaceae) e *Piper methysticum* (Ansiopax[®]) (Piperaceae) conhecida popularmente como Kava-Kava. Vale ressaltar que os dois últimos tiveram sua legislação alterada no Brasil devido à elevada hepatotoxicidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002a, 2002b).

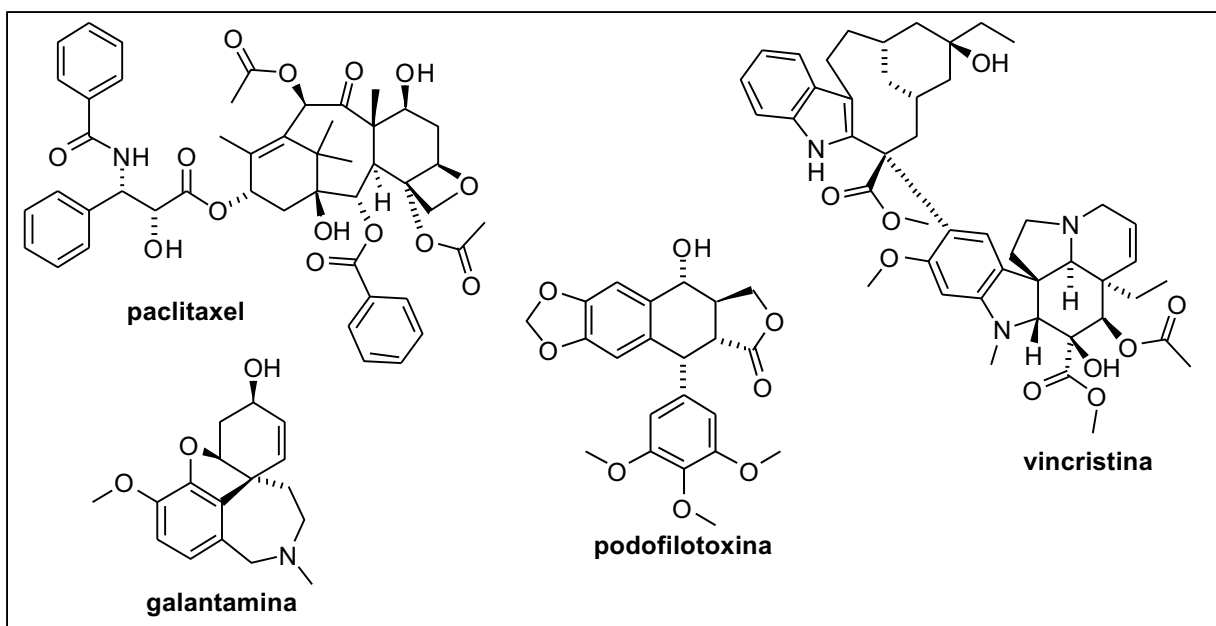
Apesar de todo potencial demonstrado pelos produtos naturais no combate às doenças humanas, principalmente aqueles derivados do Reino Vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001), a partir da década de 70, com a introdução da triagem de alta velocidade (*High Throughput Screening*), seguida pelo desenvolvimento da química combinatória no início dos anos 90, houve um acentuado declínio no emprego de produtos naturais na pesquisa por parte da indústria farmacêutica mundial (GRABOWSKI; SCHNEIDER, 2007; ORTHOLAND; GANESAN, 2004). No entanto, essa iniciativa surpreendeu a comunidade científica devido ao baixo impacto na descoberta de novos fármacos, uma vez que, em 2002, o número de novas entidades químicas que chegaram ao mercado atingiu o menor nível dos últimos 20 anos. Esse relativo insucesso pode estar relacionado, entre outros aspectos, à limitada diversidade estrutural, resultado dos trabalhos com enfoque em química combinatória, além da falta de relevância biológica dos compostos presentes nas bibliotecas a serem investigadas (GRABOWSKI; SCHNEIDER, 2007; ORTHOLAND; GANESAN, 2004).

Com isso, a pesquisa em produtos naturais vem recuperando seu importante papel na descoberta de novos fármacos. Produtos naturais de diversas fontes podem ser considerados como pertencentes a um grupo de alta complexidade molecular e estereoquímica, os quais, apesar de possuírem menos nitrogênio, halogênios e enxofre incorporados em suas moléculas, quando comparados aos fármacos disponíveis no mercado, assemelham-se ou ainda os superam quando o foco é alterado para o número de centros estereogênicos, de átomos de oxigênio, além da massa molecular (ORTHOLAND; GANESAN, 2004). Adicionalmente, 60% dos mais de 120.000 compostos presentes no Dicionário de Produtos Naturais, no ano de 2008, não apresentaram violações à regra de Lipinski, a qual, através de parâmetros como números de doadores e aceptores de interações de hidrogênio, massa molecular e

coeficiente de partição $\log P$, avalia a similaridade desses compostos aos candidatos a fármacos que alcançaram a fase II em ensaios clínicos (QUINN et al., 2008).

Esses estudos são corroborados pelo fato de que aproximadamente 60% de todas as novas entidades químicas micromoleculares e 55% dos agentes anticâncer introduzidos no mercado entre 1940 e 2006 são de origem natural, derivados ou inspirados nesses (NEWMAN; CRAGG, 2007). O sucesso atribuído aos produtos naturais no que tange a atividade farmacológica em seres humanos pode estar relacionado ao fato desses serem considerados compostos privilegiados, já que são sintetizados pelos sistemas biológicos a fim de interagir com alvos protéicos. Embora essas substâncias não sejam produzidas para interação específica com o organismo humano, acredita-se que isso é possível pois os alvos biológicos em diferentes formas de vida devem possuir similaridade, uma vez que são constituídos pelos mesmos blocos de construção (*Building blocks*) e/ou apresentam domínios estruturais semelhantes (GRABOWSKI; SCHNEIDER, 2007).

A despeito dos extensos estudos desenvolvidos com a flora terrestre, estima-se que apenas 6% das aproximadamente 300000 espécies (algumas estimativas atingem até 500000) de plantas superiores foram sistematicamente investigadas quanto ao seu potencial farmacológico e apenas 15% do ponto de vista fitoquímico (CRAGG; NEWMAN, 2010). Esses dados justificam estudos químicos e de bioprospecção da flora brasileira visando ampliar o conhecimento dos metabólitos secundários em plantas, além do seu potencial biológico, o que contribui com os esforços de conservação da biodiversidade (SILVA; CASTRO-GAMBOA; BOLZANI, 2010), além de permitir a formação de recursos humanos qualificados.

Figura 2 - Exemplos de fármacos obtidos de fonte natural

1.1.2 Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales, a qual é considerada a maior dentre as Angiospermas basais, e caracteriza-se por apresentar espécies arbustivas, eretas ou escandentes, arvoretas ou plantas herbáceas epifíticas, terrestres ou suculentas, com caule nodoso e folhas pecioladas (ALBIERO et al., 2005). Piperaceae possui distribuição pantropical e compreende cinco gêneros, sendo *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz e Pavon os mais populosos, com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente, seguidos por *Manekia* Trel. (classificada anteriormente como *Sarcorrhachis*), *Zippelia* Blume (WANKE et al., 2007) e *Verhuellia*, um pequeno gênero descrito recentemente (SAMAIN et al., 2010).

A taxonomia da família Piperaceae é relativamente complexa e pode sofrer modificações a medida que características genéticas, químicas ou morfológicas são consideradas. Assim, um detalhado estudo da constituição química dos metabólitos secundários, biossíntese e biologia de seus membros, pode contribuir para estabelecer padrões evolutivos nessa importante família (KATO; FURLAN, 2007). No decorrer

desse trabalho, serão enfocados apenas os dois gêneros principais dessa família, *Piper* e *Peperomia*.

Diversas sinonímias são comumente utilizadas para designar o gênero *Piper*, dentre elas, *Arctotonia* Trel., *Macropiper* Miq., *Pothomorphe* Miq., *Ottonia* Spreng e *Trianaoepiper* Trel. Quanto ao gênero *Peperomia*, diversas tentativas de classificação e subdivisão foram empregadas, sendo que, no passado, houve até a proposta de criação de uma nova subfamília chamada Peperomioideae. No entanto, a análise dos genes *trnK/matK* foi determinante para a organização das espécies em apenas dois subgêneros: *Micropiper* e *Sphaerocarpidium* (WANKE et al., 2007). Espécies do gênero *Piper* estão localizadas em quase todos os tipos de vegetação, no entanto, predominantemente como componentes de vegetação pioneira. No caso de *Peperomia*, as espécies são, em sua maioria, encontradas como epífitas ou plantas suculentas em florestas úmidas ou de altitude elevada (KATO; FURLAN, 2007).

Piperaceae inclui algumas espécies economicamente importantes como *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), empregada como especiaria, *Piper methysticum*, conhecida como kava-kava, além de espécies de *Peperomia* que são utilizadas como plantas ornamentais (WANKE et al., 2007). Além do potencial econômico, espécies pertencentes a essa família são amplamente utilizadas na medicina tradicional para os mais diversos fins, dentre eles: cicatrizante (VILLEGAS et al., 2001), anti-inflamatório e analgésico (ARRIGONI-BLANK et al., 2004; SILVA et al., 2008), diurético, antiespasmódico (PERAZZO et al., 2005), antiasmático, antimalárico (CÉLINE et al., 2009; PERAZZO et al., 2005), antileishmania (CÉLINE et al., 2009; ODONNE et al., 2009), sialogogo (SILVA et al., 2008), anticâncer (LI et al., 2003), expectorante, hipoglicemiante (RUKACHAISIRIKUL et al., 2004), anticolérico, antiulceroso, antidispéptico (RHO et al., 2007) antiepilético (AWAD et al., 2009), antidepressivo, ansiolítico (MICHEL et al., 2010), diaforético, tratamento de dores de dente (McFERREN; RODRIGUEZ, 1998), além do tratamento de problemas ginecológicos como amenorréia, dismenorréia, infecções fúngicas e bacterianas do trato genito-urinário (MICHEL et al., 2007). Vale ressaltar que a espécie *Piper umbellata* (então *Pothomorphe umbellata*) constava da primeira edição da Farmacopéia brasileira de 1929 (BRANDÃO et al., 2008).

O amplo uso das espécies de Piperaceae deve-se ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos secundários tais como amidas, alcalóides, terpenóides, lignóides, flavonóides e chalconas, fenilpropanóides e pironas, derivados do ácido benzóico e quinonas, benzopiranos, policetídeos, dentre outros (Tabela 1, pág. 9). Um trabalho recente publicado (LÓPEZ et al., 2010) apresenta diversas atividades biológicas atribuídas aos metabólitos secundários acima descritos, isolados de espécies de Piperaceae. Dentre os gêneros avaliados, *Piper*, o qual apresenta prevalência de compostos nitrogenados (amidas e alcalóides), lignóides e flavonóides, relaciona-se principalmente às atividades antimicrobiana e antiprotozoária, seguidas pelas atividades anti-inflamatória e inibidora enzimática. Já o gênero *Peperomia*, o qual apresenta prevalência de lignóides e benzopiranos, está relacionado principalmente às atividades citotóxicas e antiprotozoária (LÓPEZ et al., 2010).

López et al. (2010) ainda descreve os benzopiranos prenilados como responsáveis por um número significativo de relatos de atividade tripanocida, antimicrobiana, anticâncer, inibidora enzimática e citotóxica. Assim, diante da relativa abundância de benzopiranos bioativos em Piperaceae, principalmente os prenilados, nesse trabalho propõe-se o isolamento, caracterização e avaliação das atividades tripanocida e inibidora da enzima HIV-1 protease de cromanos e cromenos presentes em *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*. Esses estudos visam ampliar o conhecimento a respeito de compostos bioativos em Piperaceae, bem como avaliar os requisitos estruturais que fundamentam tais atividades, com destaque à determinação da estereoquímica absoluta.

Tabela 1 - Metabólitos secundários isolados de espécies de Piperaceae

Metabólito	Espécie	Referência
Alcalóides e amidas ^a	<i>Ottonia anisum</i>	Planta Med. 43 (1981) 375-377
	<i>Ottonia corcovadensis</i>	Phytochemistry 20 (1981) 1305-1307; Quim. Nova 27 (2004) 79-83
	<i>Ottonia frutescens</i>	J. Ethnopharmacol. 7 (1983) 235-238
	<i>Ottonia propinqua</i>	Vib. Spectrosc. 27 (2001) 175-181
	<i>Peperomia heyneana</i>	J. Nat. Prod. 70 (2007) 662-664
	<i>Piper aborescens</i>	Phytochemistry 29 (1990) 2689-2691; Planta Med. 71 (2005) 535-542
	<i>Piper acutisleginum</i>	Phytochemistry 33 (1993) 518-520
	<i>Piper aduncum</i>	Nat. Prod. Lett. 2 (1993) 231-236
	<i>Piper arboreum</i>	Phytochemistry 59 (2002) 521-527
	<i>Piper argyrophyllum</i>	Phytochemistry 43 (1996) 1355-1360
	<i>Piper boehmeriaefolium</i>	J. Nat. Prod. 74 (2011) 45-49
	<i>Piper brachystachyum</i>	Phytochemistry 59 (2002) 897-901
	<i>Piper caninum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1162-1164
	<i>Piper capense</i>	Fitoterapia 81 (2010) 632-635
	<i>Piper cenocladum</i>	Phytochemistry 53 (2000) 51-54
	<i>Piper chaba</i>	J. Pharm. Sci. 53 (1964) 1423-1424; Phytochemistry 13 (1974) 2889-2890; Planta Med. 68 (2002) 853-855; Planta Med. 70 (2004) 152-159; Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2038-2042; Tetrahedron Lett. 50 (2009) 2774-2777; Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7313-7323; Chem. Pharm. Bull. 57 (2009) 1292-1295; Tetrahedron 67 (2011) 1885-1892
	<i>Piper guineense</i>	Phytochemistry 15 (1976) 822-823; Phytochemistry 16 (1977) 483-485; Phytochemistry 16 (1977) 757-759; Phytochemistry 16 (1977) 1295
	<i>Piper hispidum</i>	J. Nat. Prod. 61 (1998) 637-639; Phytochemistry 55 (2000) 621-626
	<i>Piper hoffmanseggianum</i>	J. Nat. Prod. 70 (2007) 2036-2039
	<i>Piper lolot</i>	J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 9436-9442
	<i>Piper longum</i>	Phytochemistry 27 (1988) 1511-1515; Biochem. Syst. Ecol. 29 (2001) 537-538; Biochemistry 44 (2005) 15944-15952; J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9759-9763;
	<i>Piper marginatum</i>	Biochem. Syst. Ecol. 31 (2003) 1213-1214
	<i>Piper methysticum</i>	Tetrahedron 35 (1979) 437-439; Phytochemistry 63 (2003) 193-198
	<i>Piper nigrum</i>	J. Chem. Soc. (1950) 1177-1180; Phytochemistry 27 (1988) 1566-1567; Phytochemistry 45 (1997) 1617-1619; J. Nat. Prod. 67 (2004) 1005-1009; Nat. Prod. Res. 18 (2004) 473-477; Nat. Prod. Res. 19 (2005) 143-150; J. Org. Chem. 70 (2005) 1164-1176; J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9759-9763; Nat. Prod. Res. 23 (2009) 1416-1423
	<i>Piper officinarum</i>	Phytochemistry 16 (1977) 1436-1437
	<i>Piper ovatum</i>	Molecules 14 (2009) 1171-1182
	<i>Piper peepuloides</i>	Tetrahedron Lett. 11 (1968) 1397-1400; Phytochemistry 17 (1978) 601-602; Phytochemistry 25 (1986) 1997-1998; Fitoterapia 70 (1999) 144-147
<i>Piper philippinum</i>	Phytochemistry 68 (2007) 2101-2111	

	<i>Piper puberullum</i>	Phytochemistry 44 (1997) 727-730
	<i>Piper verrucosum</i>	J. Nat. Prod. 59 (1996) 436-437
	<i>Piper sanctum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1961-1968
	<i>Piper sarmentosum</i>	J. Ethnopharmacol. 93 (2004) 173-176
	<i>Piper scutifolium</i>	J. Nat. Prod. 70 (2007) 2036-2039; Nat. Prod. Res. 23 (2009) 1416-1423
	<i>Piper sintenense</i>	Planta Med. 68 (2002) 980-985
	<i>Piper sylvaticum</i>	Tetrahedron 29 (1973) 977-979; Phytochemistry 13 (1974) 2327-2328; Phytochemistry 21 (1982) 1321-1323
	<i>Piper retrofractum</i>	Phytochemistry 24 (1985) 279-284; Phytochemistry 31 (1992) 3609-3612; Phytochemistry 59 (2002) 897-901
	<i>Piper taiwanense</i>	Planta Med. 70 (2004) 174-177
	<i>Piper tuberculatum</i>	Phytochemistry 20 (1981) 345-346; J. Nat. Prod. 59 (1996) 794-795; Phytochemistry 44 (1997) 559-561; Phytochemistry 55 (2000) 621-626; Phytochemistry 59 (2002) 521-527; Fitoterapia 74 (2003) 181-183
	<i>Piper trichostachyon</i>	Tetrahedron Lett. 56 (1969) 4975-4978; Phytochemistry 13 (1974) 677-678
Lignóides^b	<i>Peperomia blanda</i>	Phytochemistry 69 (2008) 445-450; Phytochemistry Lett. 4 (2011) 245-249
	<i>Peperomia dindygulensis</i>	Phytochemistry 49 (1998) 2129-2131; J. Nat. Prod. 68 (2005) 1656-1660; J. Nat. Prod. 69 (2006) 790-794
	<i>Peperomia duclouxii</i>	J. Nat. Prod. 66 (2003) 1421-1426; J. Nat. Prod. 69 (2006) 234-239; J. Nat. Prod. 70 (2007) 544-548; Nat. Prod. Res. 17 (2008) 1483-1486
	<i>Peperomia glabella</i>	Phytochemistry 43 (1996) 1097-1098
	<i>Peperomia heyneana</i>	J. Nat. Prod. 70 (2007) 662-664
	<i>Peperomia japonica</i>	Heterocycles 29 (1989) 411-413
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Planta Med. 75 (2009) 620-623; Nat. Prod. Res. 25 (2011) 1-7
	<i>Peperomia pellucida</i>	J. Nat. Prod. 69 (2006) 247-250
	<i>Peperomia sui</i>	Phytochemistry 63 (2003) 603-608
	<i>Piper aborescens</i>	Planta Med. 71 (2005) 535-542
	<i>Piper argyrophylum</i>	Phytochemistry 43 (1996) 1355-1360
	<i>Piper betle</i>	Planta Med. 63 (1997) 296-298
	<i>Piper capense</i>	Phytochemistry 30 (1991) 1649-1652
	<i>Piper clarkii</i>	Phytochemistry 36 (1994) 789-792; Phytochemistry 39 (1995) 655-658
	<i>Piper clusii</i>	Phytochemistry 22 (1983) 999-1000; Phytochemistry 23 (1984) 2099-2101; Phytochemistry 32 (1993) 478-480
	<i>Piper chaba</i>	Phytochemistry 47 (1998) 1435-1436
	<i>Piper cubeba</i>	Phytochemistry 25 (1986) 487-489; Phytochemistry 26 (1987) 2033-2036; J. Nat. Prod. 68 (2005) 64-68; Biochem. Syst. Ecol. 35 (2007) 397-402
	<i>Piper decurrens</i>	J. Nat. Prod. 59 (1996) 152-155
	<i>Piper fulvescens</i>	Planta Med. 67 (2001) 873-875
	<i>Piper futokadsura</i>	Chem. Pharm. Bull. 53 (2005) 121-124
	<i>Piper kadsura</i>	J. Nat. Prod. 69 (2006) 842-844; Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 409-412
	<i>Piper longum</i>	Phytochemistry 14 (1975) 2090-2091
	<i>Piper mullesua</i>	Phytother. Res. 15 (2001) 70-72
	<i>Piper philippinum</i>	Phytochemistry 68 (2007) 2101-2111
	<i>Piper puberulum</i>	J. Nat. Prod. 58 (1995) 540-537
	<i>Piper regenellii</i>	Phytochemistry 52 (1999) 339-343; Biol. Pharm. Bull.

		29 (2006) 2126-2130
	<i>Piper ribesoides</i>	Planta Med. 55 (1989) 193-194
	<i>Piper sanguineispicum</i>	J. Nat. Prod. 73 (2010) 1884-1890
	<i>Piper sarmentosum</i>	J. Ethnopharmacol. 93 (2004) 173-176
	<i>Piper schmidtii</i>	Phytochemistry 32 (1993) 445-448
	<i>Piper solmsianum</i>	Phytochemistry 55 (2000) 843-846; Phytochemistry 64 (2003) 667-670; J. Nat. Med. 64 (2010) 402-408
	<i>Piper sumatranum</i>	Phytochemistry 32 (1993) 1073-1075
	<i>Piper sylvaticum</i>	Phytochemistry 13 (1974) 2327-2328; Tetrahedron 40 (1984) 5047-5052
	<i>Piper trichostachyon</i>	Phytochemistry 2 (1988) 1479-1482
	<i>Piper truncatum</i>	Eur. J. Pharmacol. 606 (2009) 150-154
	<i>Piper umbellatum</i>	Quim. Nova 32 (2009) 1107-1109
	<i>Piper wightii</i>	Tetrahedron 50 (1994) 2231-2240; Tetrahedron 50 (1994) 10579-10586
Benzopiranos^c	<i>Peperomia amplexicaulis</i>	Magn. Reson. Chem. 41 (2003) 145-146
	<i>Peperomia blanda</i>	Phytochemistry 67 (2006) 492-496
	<i>Peperomia clusifolia</i>	Phytochemistry 49 (1998) 1389-1391
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Phytochemistry 49 (1998) 229-232; Planta Med 75 (2009) 620-623
	<i>Peperomia serpens</i>	Phytochemistry 67 (2006) 2398-2402
	<i>Peperomia villipetiola</i>	Phytochemistry 66 (2005) 573-579
	<i>Peperomia vulcanica</i>	Phytochemistry 60 (2002) 799-801
	<i>Piper aduncum</i>	Phytochemistry 51 (1999) 899-902; Phytochemistry 34 (1993) 813-818; Phytochemistry 51 (1999) 899-902
	<i>Piper auritum</i>	Phytochemistry 26 (1987) 2367-2370
	<i>Piper dilatatum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 461-464
	<i>Piper gaudichaudianum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788
	<i>Piper hostmannianum</i>	Phytochemistry 26 (1987) 809-811; J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788
	<i>Piper lanceaefolium</i>	J. Nat. Prod. 65 (2002) 62-64
	<i>Piper lhotzkyanum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 1339-1342
	<i>Piper peltatum</i>	Phytochemistry 66 (2005) 1017-1025
	<i>Piper umbellatum</i>	Phytochemistry 66 (2005) 1017-1025
Flavonóides^c	<i>Ottonia corcovadensis</i>	Quim. Nova 27 (2004) 79-83
	<i>Peperomia blanda</i>	Fitoterapia 80 (2009) 119-122
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Planta Med 75 (2009) 620-623; Nat. Prod. Res. 25 (2011) 1-7
	<i>Piper aduncum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430; J. Nat. Prod. 57 (1994) 18-26; Phytochemistry 51 (1999) 899-902
	<i>Piper auritum</i>	Phytochemistry 26 (1987) 2367-2370
	<i>Piper carniconnectivum</i>	Rev. Bras. Farmacogn. 20 (2010) 160-164
	<i>Piper crassinervium</i>	Phytochemistry 64 (2003) 555-559; Nat. Prod. Res. 22 (2008) 1040-1046
	<i>Piper dilatatum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 461-464
	<i>Piper elongatum</i>	Bioorg. Med. Chem. 11 (2003) 3975-3980
	<i>Piper hispidum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430
	<i>Piper hostmannianum</i>	Phytochemistry 26 (1987) 809-811; Phytochemistry 68 (2007) 1312-1320; J. Chromatogr., A 1210 (2008) 45-54
	<i>Piper longicaudatum</i>	Planta Med. 67 (2001) 186-188
	<i>Piper longun</i>	Biosci. Biotechnol. Biochem. 74 (2010) 1504-1506
	<i>Piper lhotzkyanum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 1339-1342
	<i>Piper methysticum</i>	J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 701-705; Phytochemistry 59 (2002) 429-433; J. Food Sci. 72 (2007) 120-125

	<i>Piper ossanum</i>	J. Nat. Prod. 73 (2010) 1623-1627
	<i>Piper porphyrophyllum</i>	Nat. Prod. Res. 24 (2010) 387-390
	<i>Piper solmsianum</i>	J. Nat. Med. 64 (2010) 402-408
	<i>Piper umbellatum</i>	Quim. Nova 32 (2009) 1107-1109
Derivados de ácido benzóico e quinonas^c	<i>Peperomia galioides</i>	J. Nat. Prod. 59 (1996) 694-697III
	<i>Peperomia proctorii</i>	J. Nat. Prod. 63 (2000) 399-402
	<i>Piper acutifolium</i>	J. Nat. Prod. 71 (2008) 1538-1543
	<i>Piper aduncum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430; Planta Med. 59 (1993) 546-551; Phytochemistry 34 (1993) 813-818; Phytochemistry 51 (1999) 899-902; J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788; Phytochemistry Lett. 2 (2009) 96-98; Phytochemistry 70 (2009) 621-627
	<i>Piper arieianum</i>	J. Nat. Prod. 62 (1999) 367-368; Phytochemistry 72 (2011) 238-241
	<i>Piper auritum</i>	Phytochemistry 26 (1987) 2367-2370
	<i>Piper caldense</i>	Phytochemistry Lett. 2 (2009) 119-122
	<i>Piper crassinervium</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788; Phytochemistry 67 (2006) 1838-1843; Nat. Prod. Res. 22 (2008) 1040-1046; Bioresour. Technol. 101 (2010) 4251-4260
	<i>Piper dilatatum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 461-464
	<i>Piper gaudichaudianum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788
	<i>Piper glabratum</i>	J. Nat. Prod. 71 (2008) 1538-1543
	<i>Piper guanacastensis</i>	J. Nat. Prod. 60 (1997) 282-284
	<i>Piper heterophyllum</i>	Phytochemistry 70 (2009) 621-627
	<i>Piper hostmannianum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1783-1788; Phytochemistry Lett. 2 (2009) 96-98
	<i>Piper hispidum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430
	<i>Piper lanceaefolium</i>	J. Nat. Prod. 65 (2002) 62-64
	<i>Piper lhotzkyanum</i>	Phytochemistry 55 (2000) 783-786
	<i>Piper marginatum</i>	J. Nat. Prod. 51 (1988) 370-373
	<i>Piper multiplinervium</i>	J. Ethnopharmacol. 103 (2006) 461-467
<i>Piper taboganum</i>	Phytochemistry 29 (1990) 1787-1788	
Terpenos^c	<i>Manekia naranjoana</i>	Nat. Prod. Commun. 6 (2011) 145-148
	<i>Ottonia anisum</i>	Phytochemistry 58 (2001) 547-551
	<i>Ottonia corcovadensis</i>	Quim. Nova 27 (2004) 79-83
	<i>Ottonia martiana</i>	Quim. Nova 26 (2003) 803-806; J. Braz. Chem. Soc. 18 (2007) 184-188
	<i>Peperomia blanda</i>	Phytochemistry 58 (2001) 547-551
	<i>Peperomia chaluapuquiana</i>	Rev. Latinoamer. Quím. 35 (2007) 7-12
	<i>Peperomia galioides</i>	J. Nat. Prod. 64 (2001) 1357-1359; Rev. Latinoamer. Quím. 35 (2007) 7-12
	<i>Peperomia macrostachya</i>	Nat. Prod. Commun. 4 (2009) 427-430
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814; Nat. Prod. Res. 25 (2011) 1-7
	<i>Peperomia pellucida</i>	Nat. Prod. Commun. 4 (2009) 427-430
	<i>Peperomia rotundifolia</i>	Nat. Prod. Commun. 4 (2009) 427-430
	<i>Peperomia rupestris</i>	Phytochemistry 58 (2001) 547-551
	<i>Peperomia sui</i>	Phytochemistry 63 (2003) 603-608
	<i>Piper aduncum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 2019-2023; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; Quim. Nova. 29 (2006) 467-470; Molecules 12 (2007) 389-394; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
	<i>Piper amalago</i>	Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; J. Med. Plant.

- Piper amplum* Res. 4 (2010) 1810-1814
Piper attenuatum Phytochemistry 58 (2001) 547-551
Piper arboreum Phytochemistry 30 (1991) 2075-2076
Phytochemistry 47 (1998) 1277-1282; Phytochemistry 58 (2001) 547-551; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 246-251; Quim. Nova. 29 (2006) 467-470
- Piper auritum* Phytochemistry 26 (1987) 2367-2370; Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105 (2010) 168-173
- Piper callosum* Quim. Nova 10 (1987) 200-204
Piper capense Phytochemistry 49 (1998) 2019-2023
Piper cernuum Planta Med. 67 (2001) 771-773; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; Afr. J. Biotechnol. 9 (2010) 6135-6139; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
- Piper cubeba* J. Nat. Prod. 68 (2005) 64-68
Piper clausenianum Nat. Prod. Commun. 5 (2010) 1837-1840
Piper crassinervium Afr. J. Biotechnol. 9 (2010) 6135-6139; Food Chem. 91 (2005) 621-632; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
- Piper dilatatum* Phytochemistry 58 (2001) 547-551; Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 246-251
- Piper diospyrifolium* Afr. J. Biotechnol. 9 (2010) 6135-6139; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
- Piper divaricatum* Nat. Prod. Commun. 5 (2010) 477-480
Piper elongatum Chem. Pharm. Bull. 50 (2002) 1413-1415
Piper fimbriulatum Phytochemistry 47 (1998) 1277-1282
Piper fulvescens J. Ethnopharmacol. 76 (2001) 105-107
Piper lanceaefolium Biochem. Syst. Ecol. 29 (2001) 739-748
Piper lhotzkyanum Phytochemistry 49 (1998) 1339-1342
Piper gaudichaudianum Biochem. Syst. Ecol. 35 (2007) 670-675; Food Chem. Toxicol. 47 (2009) 2389-2395; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
- Piper gibbilimbum* Molecules 12 (2007) 389-394
Piper goesii Phytochemistry 58 (2001) 547-551
Piper guineense J. Agric. Food Chem. 36 (1988) 880-882; Phytochemistry 49 (1998) 2019-2023; J. Chromatogr., A 976 (2002) 265-275; Phytother. Res. 19 (2005) 362-364
- Piper hispidinervium* Quim. Nova 10 (1987) 200-204
Piper hispidum Phytochemistry 58 (2001) 547-551; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 246-251
- Piper hoffmanseggianum* Phytochemistry 58 (2001) 547-551
Piper hookeri Phytochemistry 8 (1966) 2253-2254
Piper hostmanianum Biochem. Syst. Ecol. 35 (2007) 670-675
Piper humaytanum Biochem. Syst. Ecol. 35 (2007) 670-675
Piper marginatum Chem. Biodiversity 5 (2008) 197-208; Bioresour. Technol. 100 (2009) 2284-2288
- Piper mollicomum* Phytochemistry 58 (2001) 547-551
Piper nigrum Phytochemistry 49 (1998) 2019-2023; J. Chromatogr., A 976 (2002) 265-275; Nat. Prod. Res. 19 (2005) 143-150; J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 5358-5364
- Piper obliquum* Phytochemistry 47 (1998) 1277-1282
Piper ovatum Molecules 14 (2009) 1171-1182
Piper permucronatum Biochem. Syst. Ecol. 35 (2007) 670-675

	<i>Piper regnelli</i>	Planta Med. 67 (2001) 771-773; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
	<i>Piper rusbyi</i>	Planta Med. 73 (2007) 206-211
	<i>Piper sanctum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1961-1968
	<i>Piper sarmentosum</i>	J. Ethnopharmacol. 93 (2004) 173-176
	<i>Piper solmsianum</i>	Afr. J. Biotechnol. 9 (2010) 6135-6139; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
	<i>Piper submarginalum</i>	Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12
	<i>Piper tuberculatum</i>	Quim. Nova. 29 (2006) 467-470; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
	<i>Piper umbellatum</i>	Phytochemistry 49 (1998) 2019-2023; Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12; Afr. J. Biotechnol. 9 (2010) 6135-6139; J. Med. Plant. Res. 4 (2010) 1810-1814
	<i>Piper vicosanum</i>	Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2004) 6-12
Fenilpropanóides e pironas^c	<i>Ottonia corcovadensis</i>	Quim. Nova 27 (2004) 79-83
	<i>Piper aduncum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430
	<i>Piper auritum</i>	Phytochemistry 28 (1989) 654-655
	<i>Piper betel</i>	J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9046-9054
	<i>Piper chaba</i>	Chem. Pharm. Bull. 57 (2009) 1292-1295
	<i>Piper clusii</i>	Phytochemistry 32 (1993) 478-480
	<i>Piper hispidum</i>	Phytochemistry 25 (1986) 1427-1430
	<i>Piper longun</i>	Biochemistry 44 (2005) 15944-15952
	<i>Piper methysticum</i>	J. Ethnopharmacol. 37 (1992) 13-45; Phytochemistry 59 (2002) 429-433
	<i>Piper reticulatum</i>	J. Nat. Prod. 61 (1998) 815-816
	<i>Piper rusbyi</i>	Planta Med. 73 (2007) 206-211
	<i>Piper sanctum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1961-1968
	<i>Piper sanguineispicum</i>	J. Nat. Prod. 73 (2010) 1884-1890
<i>Piper sarmentosum</i>	Phytochemistry 30 (1991) 3227-3228	
<i>Piper solmsianum</i>	Phytochemistry 55 (2000) 843-846	
<i>Piper sumatranum</i>	Phytochemistry 32 (1993) 478-480	
Policetídeos e outros	<i>Peperomia doclouxii</i>	J. Nat. Prod. 70 (2007) 998-1001
	<i>Peperomia galioides</i>	J. Nat. Prod. 58 (1995) 324-328
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Phytochemistry 49 (1998) 229-232
	<i>Peperomia pellucida</i>	Phytochemistry 55 (2000) 779-782
	<i>Peperomia proctorii</i>	J. Nat. Prod. 63 (2000) 399-402
	<i>Peperomia sui</i>	Phytochemistry 63 (2003) 603-608
	<i>Piper aurantiacum</i>	Phytochemistry 20 (1981) 2217-2220
	<i>Piper clarkii</i>	Phytochemistry 30 (1991) 871-874
	<i>Piper coruscans</i>	J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6872-6873
	<i>Piper cubeba</i>	Phytochemistry 30 (1991) 871-874
	<i>Piper gibbilimum</i>	J. Nat. Prod. 61 (1998) 939-941
	<i>Piper hispidum</i>	J. Ethnopharmacol. 129 (2010) 220-226
	<i>Piper sanctum</i>	J. Nat. Prod. 67 (2004) 1961-1968

^a Ver Parmar et al., 1998; Strunz, 2000.^b Ver Jensen et al., 1993^c Ver Parmar et al., 1997

1.1.3 A espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth

Piper gaudichaudianum, conhecida popularmente como pariparoba, paripaioba, muta, jaborandi e iaborandi, é uma das espécies mais amplamente distribuídas na Mata Atlântica brasileira, se estendendo do nordeste ao sul do país, atingindo inclusive Argentina e Paraguai (RAMOS; VANIN; KATO, 2009). Essa ocorrência pode estar relacionada com a produção de um grande número de diminutas sementes acopladas com um eficiente processo de disseminação por morcegos (MIKICH et al., 2003). Seu uso na medicina tradicional é relativamente restrito, sendo empregada como anti-inflamatório, bem como para o tratamento de dores de dente (PÉRES et al., 2006a) e distúrbios hepáticos, principalmente por populações que mascam suas folhas ou raízes frescas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002)

Do ponto de vista morfológico, *P. gaudichaudianum* é um arbusto de pequeno porte com folhas simples, alternadas, pecioladas, um pouco ásperas, com limbo ovado-elíptico, cuminadas no ápice e de base oblíqua (ALBIEIRO et al., 2005) (Figura 3, pág. 16). As inflorescências são do tipo espiga, levemente curvadas, podendo atingir até 8 cm de comprimento. Trata-se de uma espécie coletada amplamente para comercialização como adulterante do jaborandi verdadeiro (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Para detalhes microestruturais recomenda-se a leitura de Iwazaki et al. (2006).

Estudo químicos dessa espécie revelaram que o óleo essencial das folhas é composto predominantemente por sesquiterpenos, sendo que monoterpenos são pouco prevalentes. Quanto aos principais componentes, existem informações contraditórias na literatura. Segundo Péres et al. (2009), os sesquiterpenos (*E*)-nerolidol, (*E*)-cariofileno, α -humuleno e biciclogermacreno são os mais abundantes, enquanto que Morais et al. (2007) destaca o viridiflorol, aromadendreno, β -selineno e o selin-11-en-4-alfa-ol. Essa diferença pode ser creditada à diferentes técnicas de extração, além de condições geográficas, climáticas e sazonais (PÉRES et al., 2009). Foram ainda identificados os compostos estigmasterol, β -sitosterol e α -tocoferol, dentre outros compostos lipídicos (PÉRES et al., 2006b).

Das folhas e raízes de *P. gaudichaudianum* foram isolados dois cromenos, sendo um deles o ácido gaudichaudiânico, metabólito majoritário na espécie, cinco

derivados de ácido benzóico, sendo três prenilados, além da flavanona pinocembrina (LAGO et al., 2004). Dos frutos, foram isolados o mesmo cromeno não prenilado (2,2-dimetil-2*H*-cromeno carboxilato de metila) e a flavanona presente nas folhas e raízes, no entanto, foi isolada também uma amida e um derivado fenólico (TEIXEIRA, 2003). Um estudo recente revelou ainda a presença de uma cromanona, de um cromeno prenilado e do éster metílico do ácido gaudichaudiânico (RAMOS; VANIN; KATO, 2009), até então conhecido apenas como produto semissintético (BATISTA et al., 2008) (Figura 4, pág. 17). Em relação as atividades biológicas dos extratos ou constituintes químicos isolados da referida espécie, existem relatos de atividade antifúngica frente a fitopatógenos (LAGO et al., 2004), larvicida (MORAIS et al., 2007), tripanocida (BATISTA et al., 2008), citotóxica, mutagênica e genotóxica (PÉRES et al., 2009).

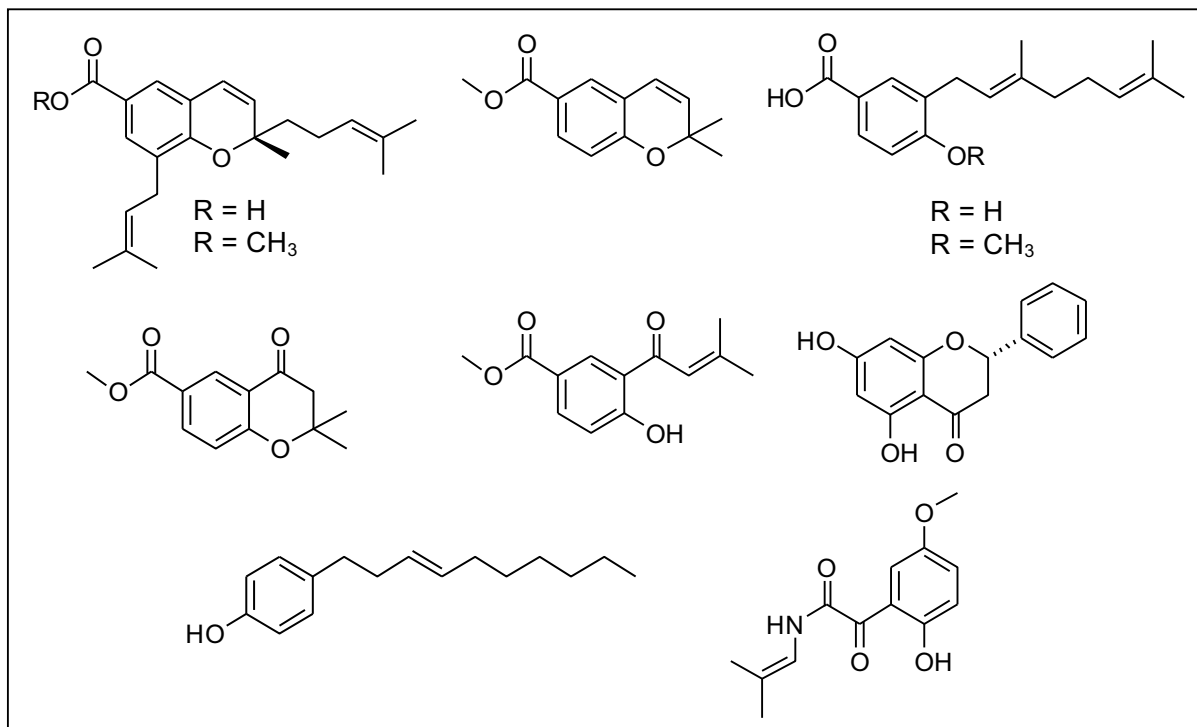
Figura 3 - (1) Exemplar adulto de *Piper gaudichaudianum* (Fotografado por Adriana A. Lopes, 2004); (2) Plântulas de *P. gaudichaudianum* em meio nutritivo Murashige-Skoog com 9 semanas de vida (Fotografado por João M. Batista Jr., 2008)

(1)



(2)



Figura 4 - Substâncias reportadas em *Piper gaudichaudianum*

1.1.4 A espécie *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.

Peperomia obtusifolia, assim como a maioria das espécies do mesmo gênero, é utilizada predominantemente como planta ornamental. Assim sendo, existem poucos dados químicos e etnofarmacológicos relativos a espécies de *Peperomia* quando comparado àquelas pertencentes ao gênero *Piper* (MOTA et al., 2009; LÓPEZ et al., 2010). No entanto, as espécies *Peperomia dindygulensis* (WU et al., 2005), *P. ducloxii* (LI et al., 2003) e *P. japonica* (CHEN et al., 1989) são amplamente utilizadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento de diversos tipos de câncer. *P. obtusifolia*, conhecida popularmente como peperomia, “baby rubber plant” ou paragua (LENTZ et al., 1998), possui distribuição que se estende do México até a América do Sul (TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998), sendo encontrada também no sul da Flórida, e apresenta-se geralmente como litófita em grandes rochas, podendo ser também

encontrada no solo ou ainda como epífita em árvores com troncos largos (FONDOM et al., 2009).

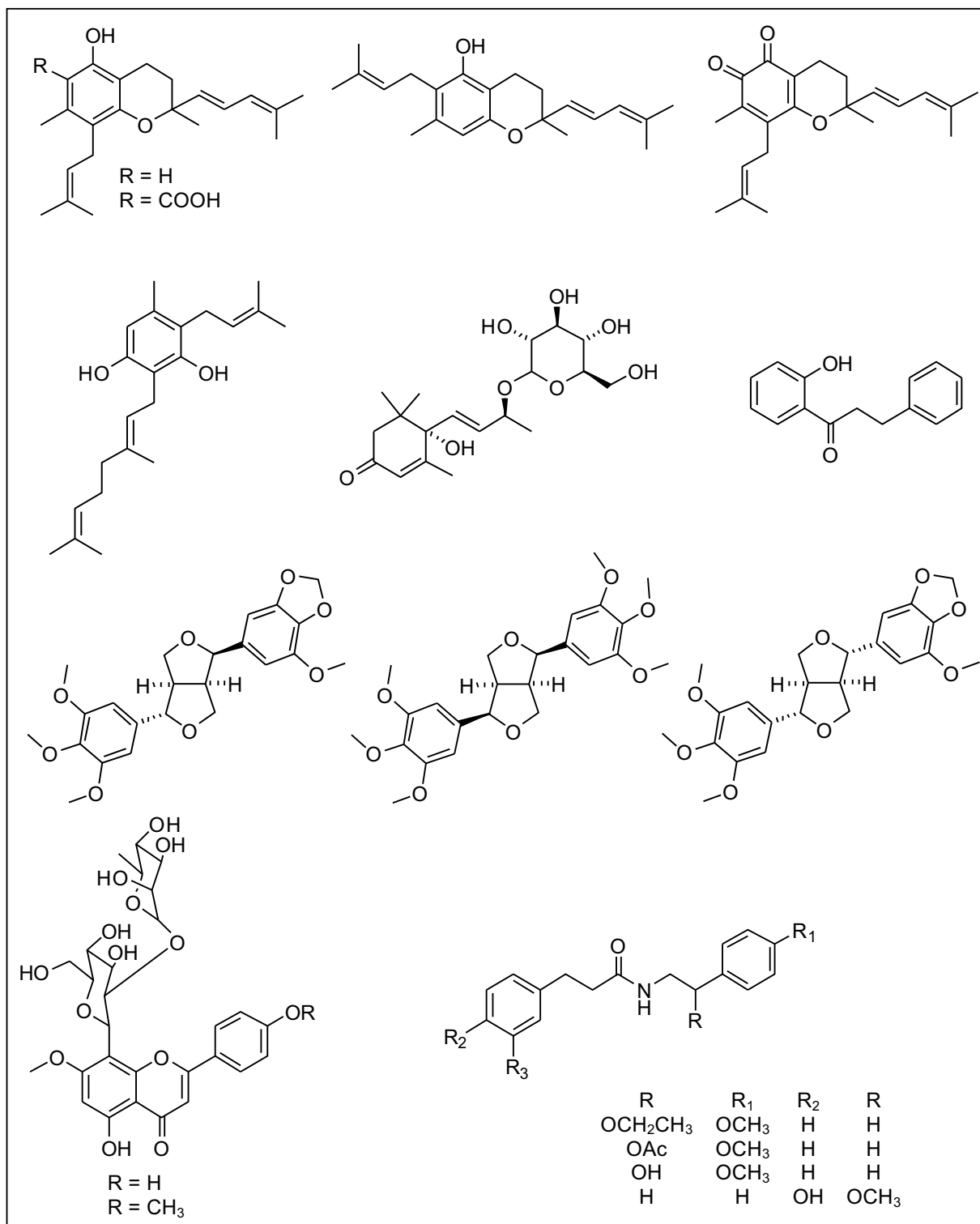
Essa espécie pertence ao grupo das plantas CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), ou seja, possui uma adaptação do mecanismo fotossintético que a permite sobreviver em condições de extrema seca. Isso é possível pois essa planta mantém seus estômatos fechados durante o dia e os abre a noite, possibilitando a captação de CO₂, que é armazenado na forma de ácido málico, o qual é posteriormente transformado em glicose com o mínimo de perda de água por transpiração (FONDOM et al., 2009). Suas raízes são pouco desenvolvidas e suas folhas são obovais, verde escuras, suculentas, com base decorrente, ápice obtuso e superfície coberta com fina camada cerosa (Figura 5, pág. 19). É bastante conhecida em paisagismo por sua folhagem densa que se localiza entre 15-20 cm do solo, no entanto, é empregada por algumas populações na América Central com fins medicinais, com indicações para o tratamento de picada de insetos ou cobras, além de limpeza da pele (LENTZ et al., 1998).

Estudos químicos em *Peperomia obtusifolia* evidenciaram a presença de uma série de metabólitos secundários (Figura 6, pág. 20) incluindo amidas, lignanas, flavonóides (MOTA et al., 2011), diidrochalconas, benzoquinonas, derivados de ácido orselínico prenilados (TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998), benzopiranos (TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998; MOTA et al., 2009; BURKE et al., 2003), além de sesquiterpenos, os quais são predominantes no óleo essencial de suas folhas (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010). Em relação às atividades biológicas dos extratos ou constituintes químicos isolados da referida espécie, existem relatos de atividade antifúngica frente a fitopatógenos (MOTA et al., 2011), patógenos humanos (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010), antibacteriana (LENTZ et al., 1998) e tripanocida (MOTA et al., 2009).

Figura 5 - Exemplar adulto de *Peperomia obtusifolia* (Fotografado por João M. Batista Jr., 2011)



Figura 6 - Substâncias reportadas em *Peperomia obtusifolia*

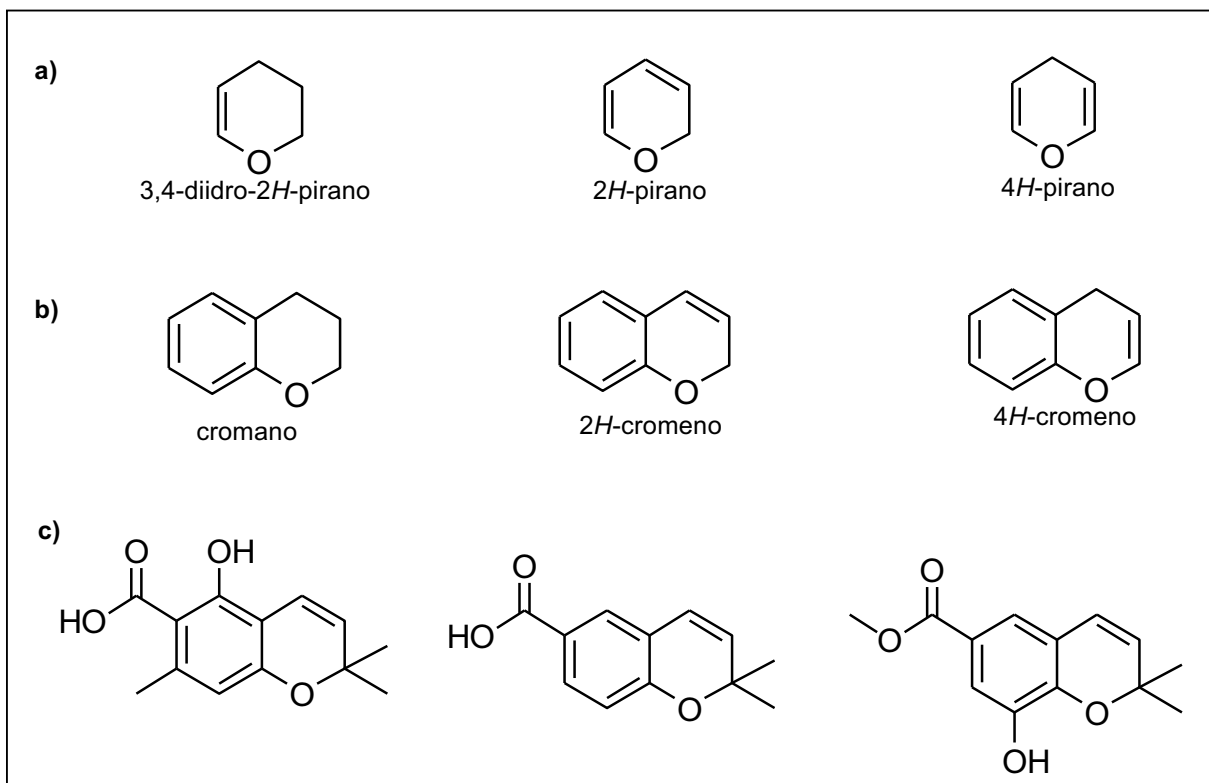


1.1.5 Benzopiranos

Cromanos e cromenos, metabólitos secundários comumente encontrados em espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*, são caracterizados pela presença do núcleo benzopirânico, ou seja, um anel benzeno fundido a um anel pirano, com diversos níveis de saturação. Esse núcleo é muito comum na natureza, como por exemplo em cumarinas, flavonas, vitamina E (tocoferóis), tetraidrocanabinoides, entre outros (TANG et al., 2010). Na nomenclatura do sistema pirano, a posição do carbono sp^3 é designada pela adição de H ou, em outras palavras, o uso do sufixo H indica a posição das ligações duplas. Assim, no caso do carbono 2 ou 4 ser sp^3 (Figura 7, pág. 22), o anel é chamado de 2H-pirano e 4H-pirano, respectivamente. Anéis parcialmente reduzidos são sempre nomeados utilizando o sufixo 2H. Quando a insaturação $\Delta^{3,4}$ se encontra reduzida, utiliza-se 3,4-diidro-2H-pirano (GOEL; RAM, 2009). Assim, o grupo 1-benzopirano compreende esqueletos carbônicos tais como, cromano, 2H-cromeno e 4H-cromeno (Figura 7, pág. 22), sendo o último menos frequente como produto natural (VAN OTTERLO et al., 2005).

Em plantas, sua formação segue duas rotas biossintéticas distintas, sendo uma derivada da via do ácido chiquímico e a outra da via dos policetídeos. Em espécies de *Piper*, os cromenos são oriundos da via do chiquimato a qual utiliza ácido *p*-hidroxibenzóico ou ácido protocatecúico como precursores na biossíntese. A formação dessa classe de metabólitos envolve a condensação de uma unidade C6–C1 (ácido *p*-hidroxibenzóico ou protocatecúico) e uma unidade isoprênica (pirofosfato de dimetilalila - DMAPP, difosfato de isopentenila - IPP ou pirofosfato de geranila - GPP). Esta última, quando ciclizada, dá origem ao anel benzopirano (LOPES et al., 2007). Os cromenos podem ainda sofrer processamentos adicionais, tais como esterificações e prenilações. Já em espécies do gênero *Peperomia*, encontram-se cromanos e cromenos formados através da via policetídic, envolvendo o ácido orselínico como precursor (SALAZAR et al., 2005; KITAMURA et al., 2006; KATO; FURLAN, 2007). Esses diferem dos cromenos encontrados em espécies do gênero *Piper* pela presença de uma hidroxila fenólica e uma metila aromática, em posição *meta* entre si (Figura 7, pág. 22).

Figura 7 - Estruturas químicas e nomenclatura de piranos (a), 1-benzopiranos (b) e exemplos de alguns cromenos encontrados em Piperaceae (c)



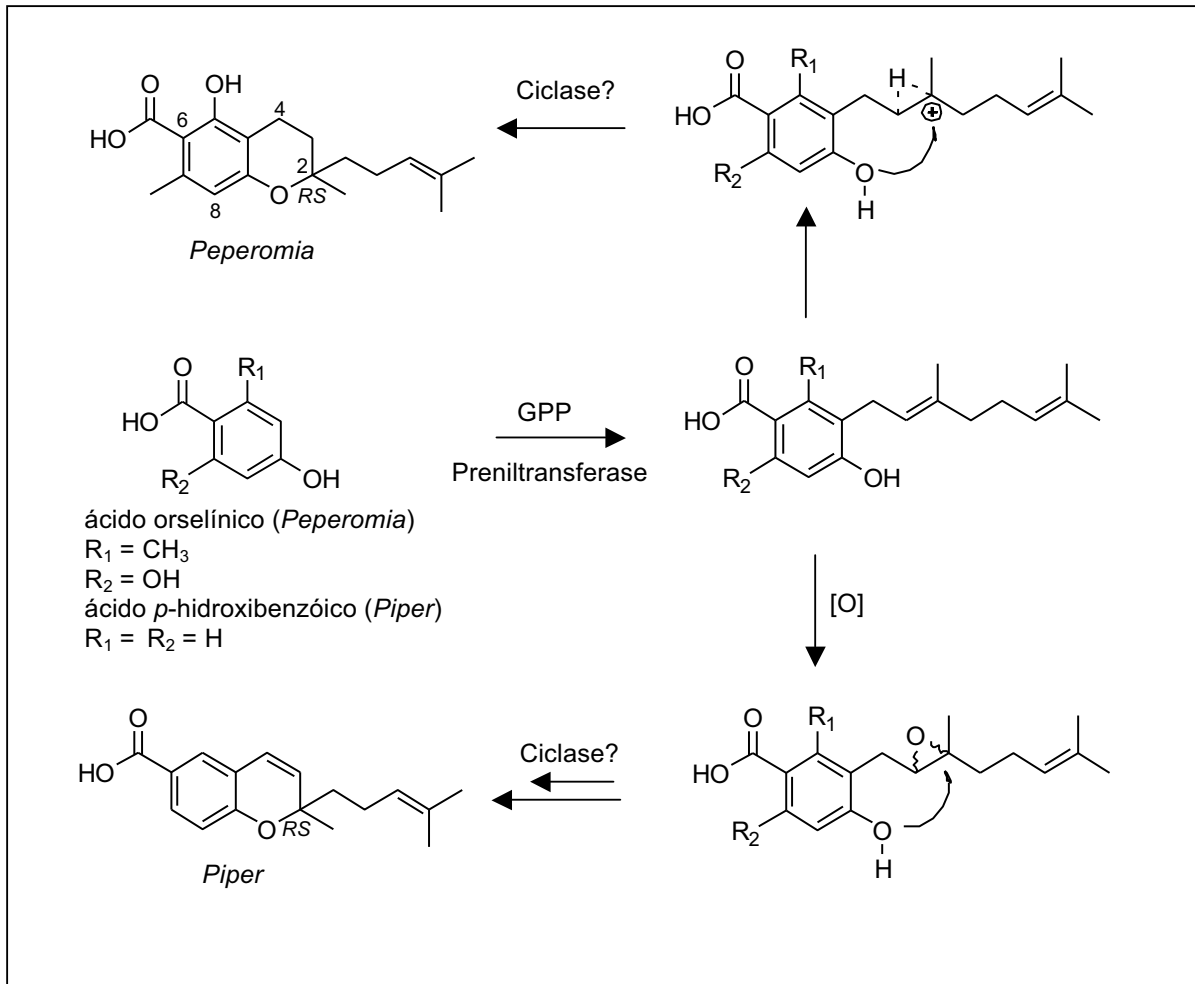
Os benzopiranos são considerados na química medicinal como compostos privilegiados, ou seja, estão presentes como subunidades em um grande número de moléculas naturais com diversas atividades biológicas descritas. São capazes de se ligar à múltiplas classes de receptores protéicos com alta afinidade, permitem a introdução de variados substituintes através de síntese em fase sólida, possuem um ou mais anéis heterocíclicos e rígidos em sua estrutura e são, em geral, suficientemente lipofílicos para atravessar membranas celulares. Existe relato na literatura de mais de 12000 compostos naturais ou sinteticamente planejados contendo o núcleo benzopirano (NICOLAOU et al., 2000).

Diversas moléculas com atividade anti-hipertensiva (ASHWOOD et al., 1986), vasodilatadora coronariana (CHO et al., 1996), moduladora dos canais de potássio do miocárdio (GADWOOD et al., 1993; ATWAL et al., 1995), hipolipêmica (KOYAMA et al., 2005) e inibidoras da enzima aldose redutase (LIPINSKI et al., 1992) apresentam em

comum o núcleo benzopirano. Além das atividades relacionadas ao sistema cardiovascular e endócrino, cromanos e cromenos apresentam atividade antifúngica (BALDOQUI et al., 1999; LAGO et al., 2004; SALAZAR et al., 2005; KITAMURA et al., 2006), antitumoral e citotóxica (BALDOQUI et al., 1999; PARMAR et al., 2003), antimicrobiana (SABRY et al., 2011; EL-AGRODY et al., 2001) e antimicobacteriana (PRADO et al., 2007), anti HIV-1 (MA et al., 2008), antioxidante (MORI et al., 2006), antiúlcera (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2010), antiviral (MORI et al., 2006), moluscicida (ORJALA et al., 1993), leishmanicida (NAZARIAN et al., 2010) e tripanocida (BATISTA et al., 2008; MOTA et al., 2009).

Devido ao fato da biossíntese proposta para os benzopiranos em *Piper* e *Peperomia* envolver a ciclização de uma unidade prenila ou geranila ligada aos ácidos *p*-hidroxibenzóico ou orselínico pelo ataque de uma hidroxila fenólica à ligação dupla (GRÜTTER et al., 2006) ou a um epóxido (SALAZAR et al., 2005) formado nessas unidades, existe a possibilidade de geração de um centro estereogênico em C-2 (Figura 8, pág. 24). A referida ciclização é creditada à existência de uma ou mais enzima(s) semelhante(s) à tocoferol ciclase, a(s) qual(ais) cataliza(m) a formação do anel cromano nos derivados de vitamina E de forma estereosseletiva (GRÜTTER et al., 2006). No entanto, como será descrito a seguir, os cromanos quirais isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* apresentaram-se como misturas racêmicas, o que levanta dúvidas a respeito do nível de controle enzimático na ciclização dessas moléculas ou da existência de racemização posterior. Assim, a determinação da configuração absoluta dos centros estereogênicos presentes torna-se indispensável para o melhor entendimento da biossíntese e atividade biológica desses compostos.

Figura 8 - Biogênese para formação de benzopiranos quirais em *Piper* e *Peperomia*



1.2 OBJETIVOS

- Isolamento dos benzopiranos quirais presentes em *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*;
- Determinação das estruturas químicas e estereoquímica relativa por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Resolução das misturas enantioméricas/diastereoisoméricas por meio de técnicas cromatográficas.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Material vegetal

A espécie *Peperomia obtusifolia* foi mantida na casa de vegetação do Instituto de Química da Unesp em Araraquara. A espécie *Piper gaudichaudianum* foi mantida na casa de vegetação do Instituto de Química da USP em São Paulo, pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato. Ambas as espécies foram identificadas pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo e suas exsiccatas foram depositadas no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo” (São Paulo) sob código Kato 070 e no Herbário do Instituto de Biociências - USP - SP sob código Kato 093, respectivamente.

1.3.2 Obtenção dos extratos vegetais

O material vegetal foi seco em estufa a 40°C e posteriormente pulverizado em moinho de facas tipo Willey. Todas as extrações foram feitas por maceração, a temperatura ambiente, utilizando EtOH como solvente. Após a evaporação do solvente, o extrato obtido foi dissolvido em uma solução de MeOH:H₂O (8:2, v/v), sendo submetido à partição líquido-líquido, utilizando Hex e AcOEt. A concentração dos extratos e das frações foi realizada em evaporador rotatório a pressão reduzida.

1.3.3 Cromatografia em camada delgada

Tanto para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), quanto para preparativa (CCDP), em fase normal, foram utilizadas placas de vidro com dimensões variadas, recobertas com sílica gel 60 (Merck), com granulometria entre 70 - 230 Mesh (0,063 - 0,200 mm), com 0,5 e 1,0 mm de espessura, respectivamente. Foram utilizadas fases estacionárias com presença, bem como, ausência de marcador fluorescente. Para CCDC também foram utilizadas placas comerciais de sílica gel (Sorbent), sobre suporte de alumínio, com espessura de 0,2 mm e presença de marcador fluorescente para 254 nm. A revelação das cromatoplasmas foi efetuada

através de inspeção em câmara com luz ultravioleta (UV) (Solab), nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e também mediante o uso dos seguintes reveladores:

- Câmara saturada com iodo sublimado;
- Solução de *p*-anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisalaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 8,5 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, em banho de gelo, mantendo essa solução estocada em frasco opaco). As cromatoplasmas foram borrifadas e, em seguida, aquecidas em estufa a 120 °C até o desenvolvimento de manchas características (WAGNER; BLADT, 2001).

1.3.4 Cromatografia em coluna (CC)

Para a CC em fase normal, foram utilizadas colunas de vidro, com diâmetros variados, preenchidas com sílica gel 60 (Merck), com granulometria entre 70 - 230 Mesh (0,063 - 0,200 mm) e sílica gel 60 (Acros), 220-440 Mesh (0,035 - 0,070 mm). Para a CC em fase reversa, foram utilizadas colunas de vidro, com diâmetros variados, sob pressão reduzida, preenchidas com sílica gel derivatizada com grupos octadecil (C-18) (J.T. Baker).

1.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

1.3.5.1 Solventes

Metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol (i-PrOH) e *n*-hexano (95%) das marcas J.T. Baker, Mallinckrodt e Tedia foram utilizados para CLAE e outros fins. Água foi purificada antes do uso em sistema Milli-Q, Millipore.

1.3.5.2 Cromatógrafos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-6AD, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-10AF, coletor de frações

FRC-10A, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-8A, detector UV-VIS SPD-10Avp, auto-injetor modelo SIL-10AF, controladora SCL-10Avp e processador de dados ClassVP;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-20A, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A/QP-5050A equipado com injetor de amostras AOC20i e processador de dados GCMSolutions v. 1.02;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Jasco 2000 equipado com bomba de quatro canais PU-2089 Plus, injetor automático AS-2055 Plus, detector UV-DAD MD-2010 Plus e detector de dicroísmo circular CD-2095 Plus.

1.3.5.3 Colunas cromatográficas

- Daicel Chiralcel OD-H[®], 250 x 4,6 mm, 5 μ m;
- Daicel Chiralcel OD-H[®], 250 x 10 mm, 5 μ m;
- Phenomenex Lux[®] Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m;
- Coluna com fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) em celulose, 250 x 21,2 mm, preparada pela Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass, UFSCar.

1.3.6 Cromatografia gasosa (CG)

1.3.6.1 Cromatógrafo

- Cromatógrafo automático CG-EM Shimadzu, modelo GC-17A/QP-5050A, equipado com injetor de amostras modelo AOC20i e processador de dados GCMS Solutions v. 1.02.

1.3.6.2 Coluna cromatográfica

- Coluna capilar J&W Scientific DB-5ms, 30 m x 0.25 mm, 0,25 μm .

1.3.7 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz na frequência do ^1H e a 125 MHz na frequência do ^{13}C . Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna. Foram utilizados solventes deuterados das marcas Synth e Cambridge Isotopes.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Bruker ultrOTOF_Q ESI-TOF, no modo positivo, utilizando ácido fórmico como agente ionizante. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro Fisons-Platform II, com ionização por eletrospray e gás nebulizador He.

Os espectros no UV foram obtidos a partir dos detectores de arranjo de diodos, acoplados aos equipamentos de CLAE utilizados nas separações enantioméricas e/ou diastereoisoméricas. As medidas da rotação específica da luz polarizada por moléculas quirais foram realizadas em polarímetro Perkin Elmer 241, equipado com lâmpada de Na operando a 589 nm (linha D).

1.4 PARTE EXPERIMENTAL

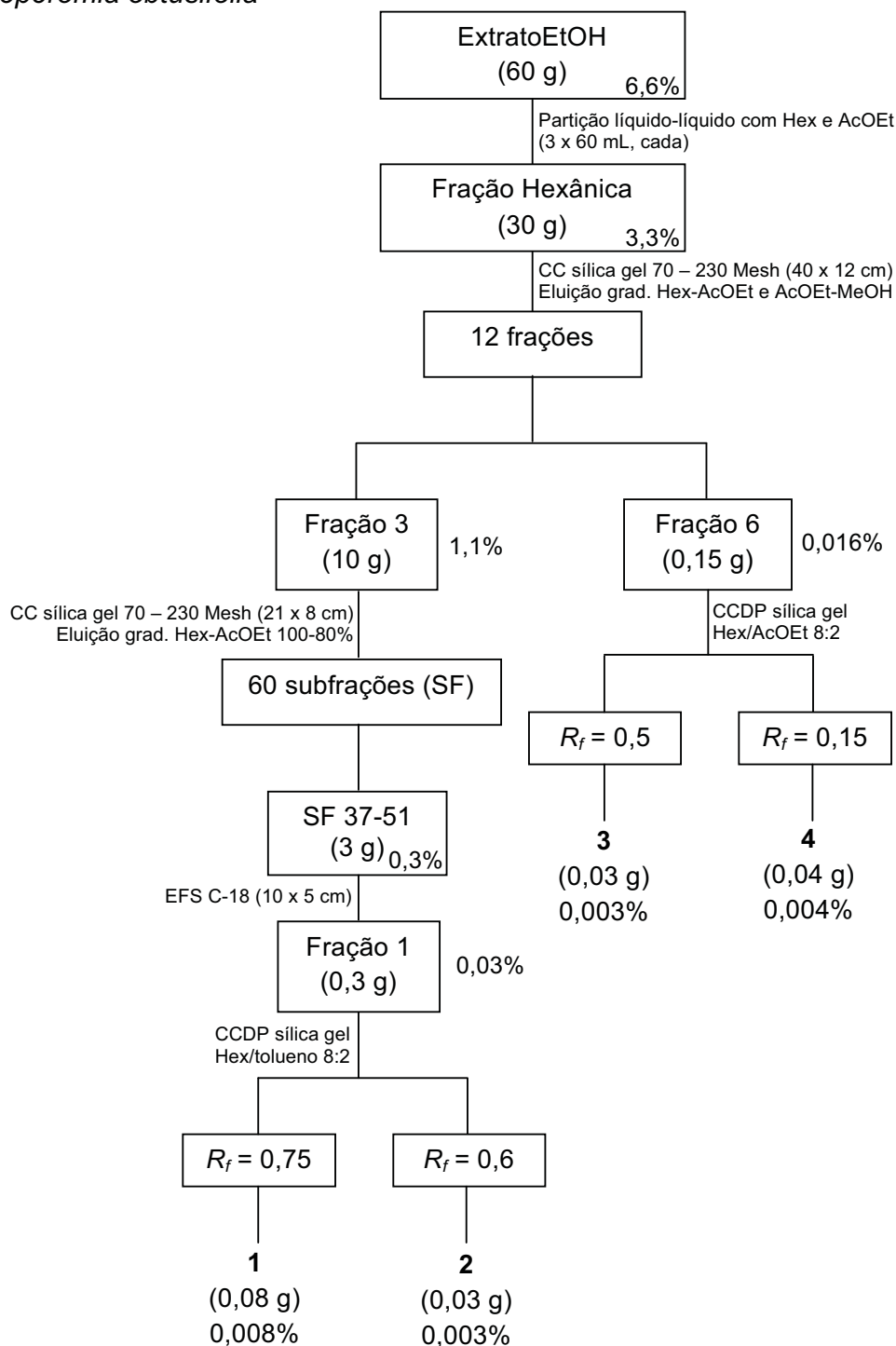
1.4.1 Isolamento dos benzopiranos de *Peperomia obtusifolia*

O extrato bruto EtOH de *P. obtusifolia* foi preparado a partir de 900 g de folhas e caules secos e moídos, utilizando o processo de maceração a temperatura ambiente, por 72 h (3 x 3 L) resultando em 60 g (6,6%). A massa total do extrato EtOH (60 g) foi suspensa em 200 mL de MeOH/H₂O 8:2 (v/v) e submetida à partição líquido-líquido com Hex e AcOEt (3 x 60 mL, cada), os quais foram posteriormente evaporados sob pressão reduzida. A fração hexânica (30 g, 3,3%) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna (40 x 12 cm), a pressão ambiente, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) e fase móvel em modo de eluição gradiente de Hex a AcOEt e AcOEt a MeOH, o que originou 12 frações.

A fração 3 (10 g, 1,1%) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna (21 x 8 cm), a pressão ambiente, com fase estacionária sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) e fase móvel em eluição gradiente de 100 a 80% de Hex em AcOEt, o que originou 60 subfrações. As subfrações 37 a 51, após análises por CCDC, foram reunidas (3 g, 0,3%) e submetidas à extração em fase sólida (EFS), a pressão reduzida, com fase estacionária sílica gel C-18 (10 x 5 cm) e fase móvel em modo de eluição isocrático utilizando 100% de MeOH. A fração obtida (0,3 g, 0,03%) foi submetida, sucessivas vezes, à CCDP (6 placas de 20 x 20 cm; 0,05 g de amostra por placa), desenvolvida em Hex/tolueno 8:2. A fração com $R_f = 0,75$ originou a substância **1** (0,08 g, 0,008%) e a fração com $R_f = 0,6$ originou a substância **2** (0,03 g, 0,003%).

Uma alíquota da fração 6 (0,15 g, 0,016%), originada do primeiro fracionamento cromatográfico ao qual foi submetida a fração hexânica, foi submetida, sucessivas vezes, à CCDP (3 placas com 20 x 20 cm; 0,05 g de amostra por placa), desenvolvida em Hex/AcOEt 8:2 (v/v). A fração com $R_f = 0,5$ originou a substância **3** (0,03 g, 0,003%) e a fração com $R_f = 0,15$ originou a substância **4** (0,04 g, 0,004%). O esquema 1 (pág. 31) resume o fracionamento cromatográfico realizado com o extrato EtOH das folhas e caules de *P. obtusifolia*.

Esquema 1 - Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH das folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*

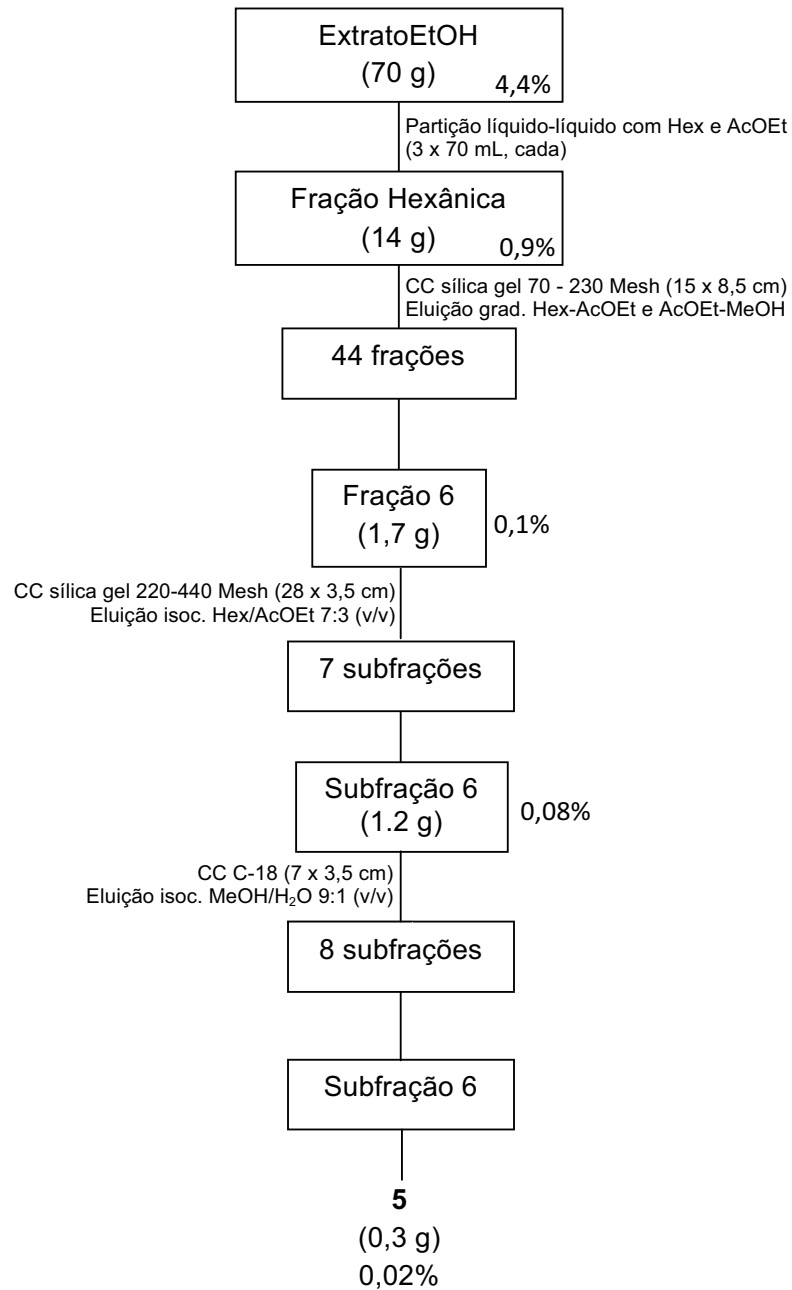


1.4.2 Isolamento do benzopirano majoritário de *Piper gaudichaudianum*

O extrato bruto EtOH de *P. gaudichaudianum* foi preparado a partir de 1600 g de caules secos e moídos, utilizando o processo de maceração a temperatura ambiente, por 72 h (3 x 5 L) resultando em 70 g (4,4%). A massa total do extrato EtOH (70 g) foi suspensa em 300 mL de MeOH/H₂O 8:2 (v/v) e submetida à partição líquido-líquido com Hex e AcOEt (3 x 70 mL, cada), os quais foram posteriormente evaporados sob pressão reduzida. A fração hexânica (14 g, 0,9%) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna (15 x 8,5 cm), a pressão ambiente, com fase estacionária sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) e fase móvel em eluição gradiente de Hex a AcOEt e AcOEt a MeOH, o que originou 44 frações.

A fração 6 (1,7 g, 0,1%) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna (28 x 3,5 cm), a pressão ambiente, com fase estacionária sílica gel 60 (0,035 - 0,070 mm) e fase móvel em eluição isocrática utilizando Hex/AcOEt 7:3 (v/v). Foram obtidas 7 subfrações, sendo que a subfração 6 (1,2 g, 0,08%), após novo fracionamento cromatográfico, dessa vez em modo reverso com fase estacionária sílica gel C18 (7,0 x 3,5 cm) e fase móvel em eluição isocrática utilizando MeOH/H₂O 9:1 (v/v), originou 8 subfrações. A subfração 6 originou a substância **5** (0,3 g, 0,02%). O esquema 2 (pág. 33) resume o fracionamento realizado com o extrato bruto EtOH dos caules *P. gaudichaudianum*.

Esquema 2 - Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH dos caules de *Piper gaudichaudianum*



1.4.3 Análises espectrométricas e cromatográficas dos compostos isolados

As substâncias isoladas e purificadas tiveram seu poder óptico rotatório avaliado em 589 nm. As substâncias **1** e **2** apresentaram $[\alpha]_D^{25} = -5$ (c 0,3; CHCl₃) e -10 (c 0,3; CHCl₃), respectivamente, enquanto **3-5** apresentaram $[\alpha]_D^{25} = 0$ (c 0,1 a 1,0; CHCl₃) o que sugere a presença de misturas racêmicas. Para os compostos cujo $[\alpha]_D$ diferia de zero, a análise por RMN de ¹H e de ¹³C indicou, por meio de sinais aparentemente duplicados, a possibilidade de misturas diastereoisoméricas. Vale ressaltar que os espectros no UV obtidos para **1** e **2** foram idênticos entre si e também ao obtido para **4**. A fim de obter mais informações a respeito de tais misturas, foram realizadas análises por CLAE-DAD, empregando coluna com fase estacionária quiral.

A coluna cromatográfica selecionada, Chiralcel OD-H, possui como seletor quiral o tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) em celulose, um dos mais comumente utilizados na literatura (LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010). As análises cromatográficas foram iniciadas com eluição gradiente exploratória de *n*-hexano em EtOH e, após diversas tentativas, a condição otimizada para os compostos **1** e **2** consistiu em *n*-hexano 100% enquanto para **3-5** encontrou-se *n*-hexano/EtOH 99,5:0,5 (v/v) com ou sem adição de modificador AcOH, ambas em eluição isocrática. Os cromatogramas obtidos para as substâncias **1-5** são apresentados a seguir nas figuras 9-13.

Figura 9 - Cromatograma obtido para **1**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, isocrático, *n*-hexano 100%, 0,7 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 10 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os quatro picos presentes

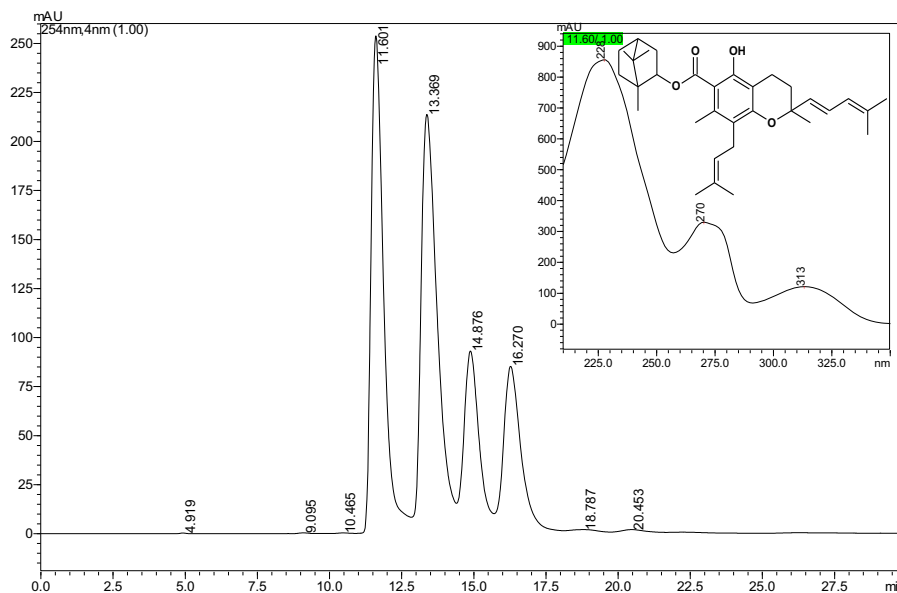


Figura 10 - Cromatograma obtido para **2**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, isocrático, *n*-hexano 100%, 0,7 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 10 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes

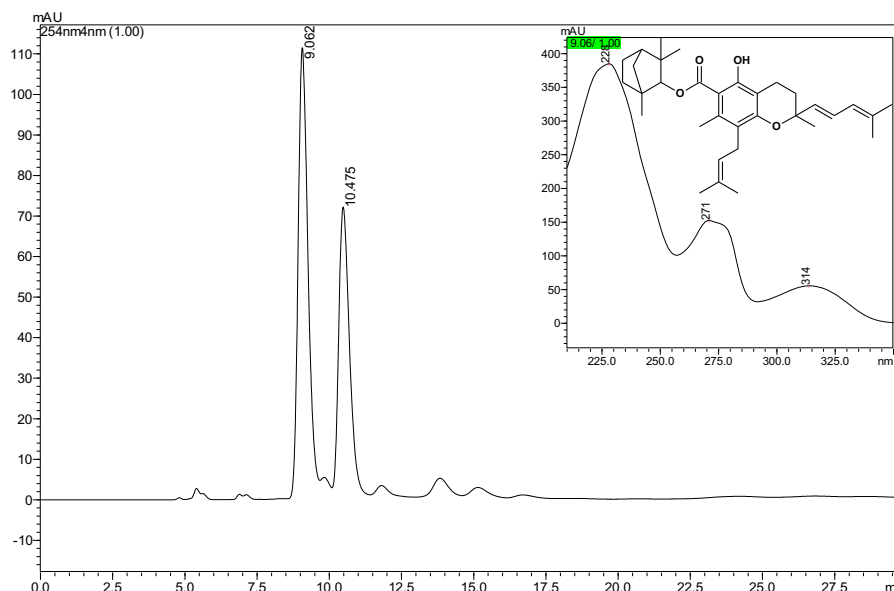


Figura 11 - Cromatograma obtido para **3**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 0,5 mg/mL, v.i. 50 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes

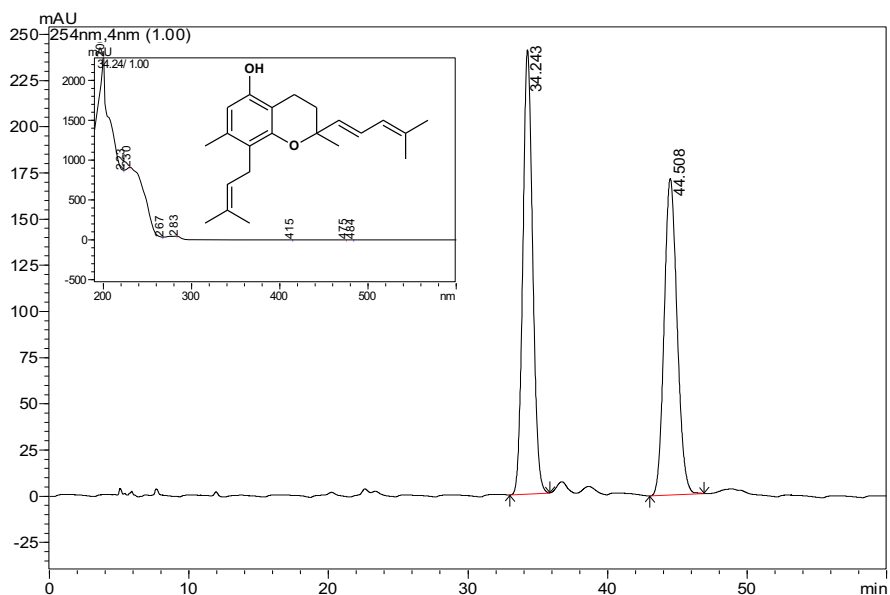


Figura 12 - Cromatograma obtido para **4**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes

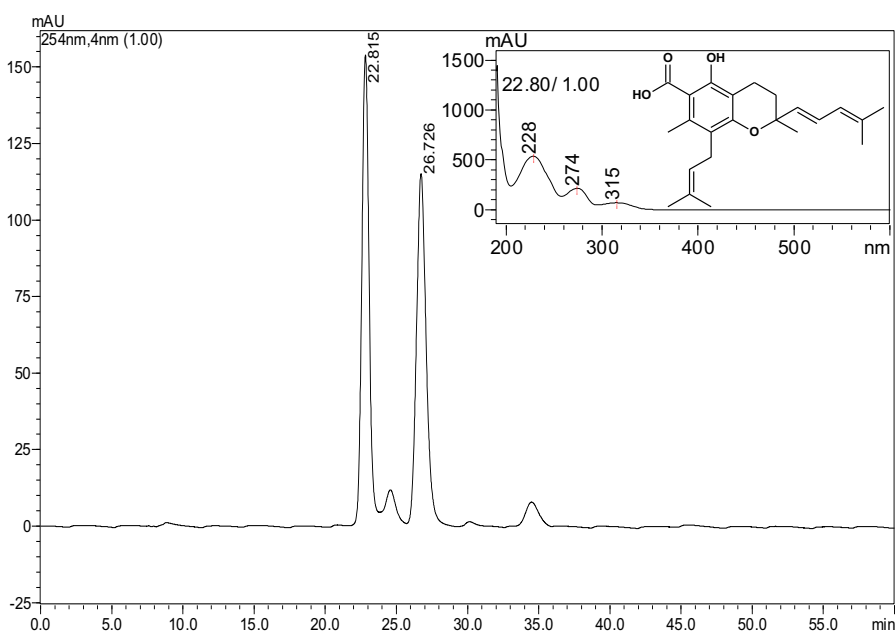
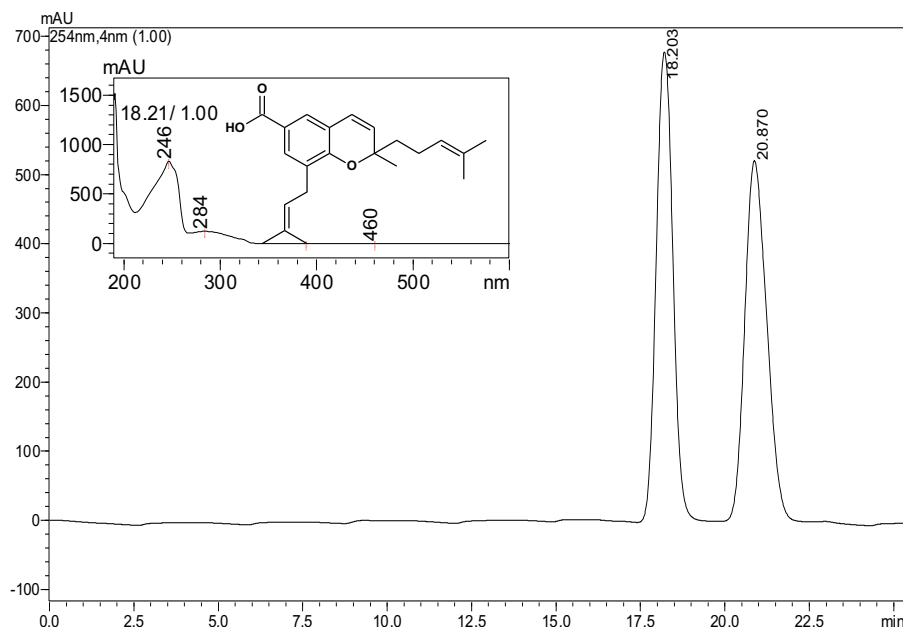


Figura 13 - Cromatograma obtido para **5**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm. O espectro no UV é idêntico para os dois picos presentes



1.4.4 Resolução das misturas enantioméricas e/ou diastereoisoméricas de 1-5

Uma vez constatada a presença de misturas estereoisoméricas para todos os compostos isolados, o próximo passo consistiu na resolução de tais misturas utilizando CLAE quiral semipreparativo. Após sucessivas injeções no sistema cromatográfico, a partir de **1** foram isolados quatro novos compostos: (-)-**1.1** (30 mg, t_R = 11,6 min), (+)-**1.2** (20 mg, t_R = 13,3 min), (-)-**1.3** (6 mg, t_R = 14,8 min) e (+)-**1.4** (7 mg, t_R = 16,2 min). Já a partir de **2**, foram isolados dois compostos: (-)-**2.1** (6 mg, t_R = 9,0 min) e (+)-**2.2** (7 mg, t_R = 10,4 min). Os enantiômeros de **3** foram resolvidos em (-)-**3.1** (10 mg, t_R = 34,3 min) e (+)-**3.2** (10 mg, t_R = 44,5 min). Do composto **4**, foram isolados (-)-**4.1** (7 mg, t_R = 23,1 min) e (+)-**4.2** (8 mg, t_R = 26,6 min). Por fim, a partir da mistura racêmica **5**, foram isolados (+)-**5.1** (8 mg, t_R = 18,3 min) e (-)-**5.2** (8 mg, t_R = 21,1 min).

Para as separações semipreparativas de **1** e **2**, utilizou-se soluções a 2,0 mg/mL, volumes de injeção de 500 μ L e vazão de 2,0 mL/min. No caso de **3**, utilizou-se

solução da amostra de 10 mg/mL, volume de injeção de 1,0 mL e vazão de 3,5 mL/min. Para **4**, as condições consistiram em solução da amostra de 2,5 mg/mL, volume de injeção de 500 μ L e vazão de 3,0 mL/min. Por fim, para **5**, utilizou-se solução de 10 mg/mL, volume de injeção de 50 μ L e vazão de 3,0 mL/min. Os cromatogramas analíticos dos compostos isolados são apresentados a seguir nas figuras 14-18.

Figura 14 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os compostos isolados de **1**, coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; isocrático, *n*-hexano 100%, 0,8 mL/min, detecção em 254 nm

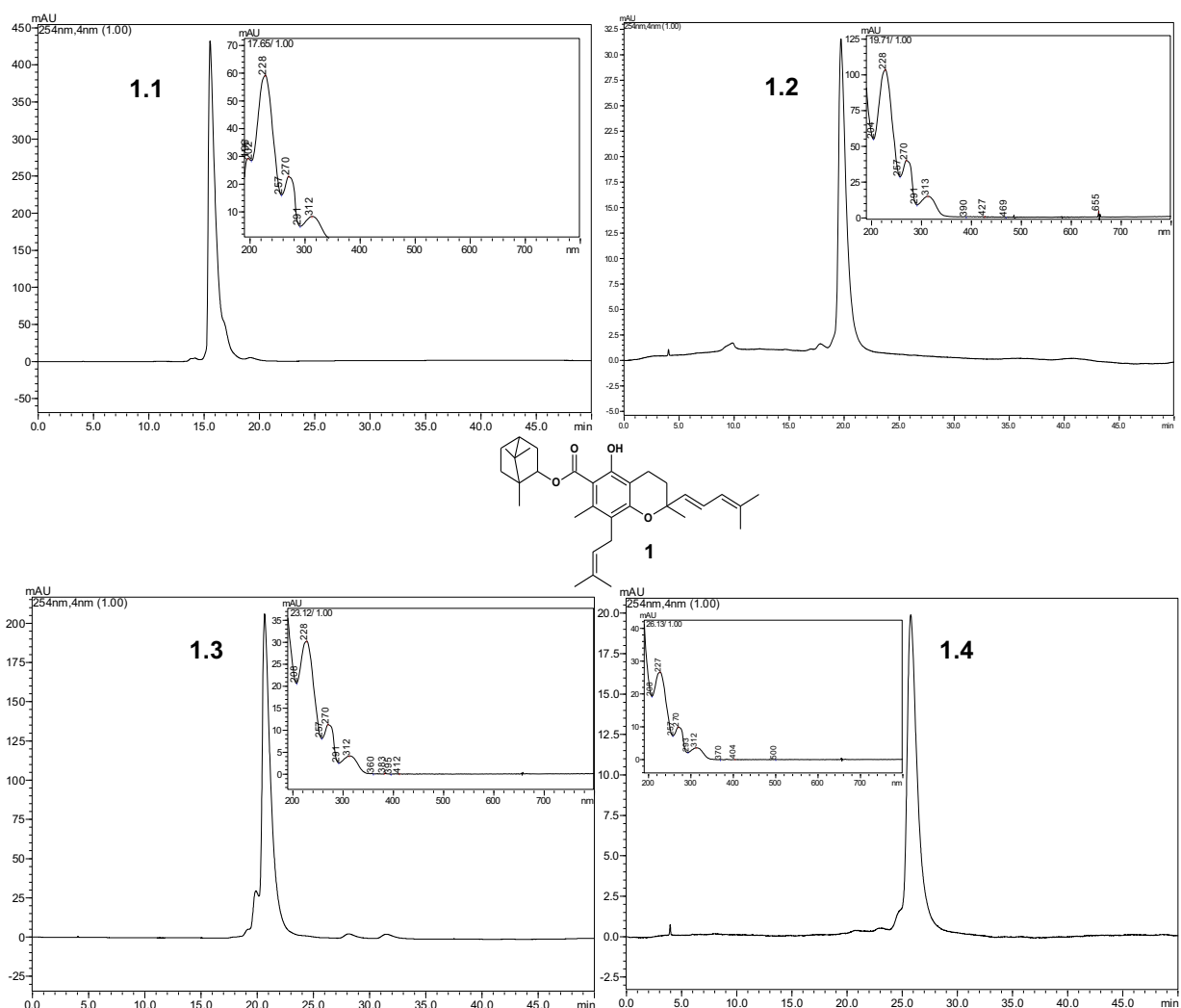


Figura 15 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os compostos isolados de **2**, coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; isocrático, *n*-hexano 100%, 0,8 mL/min, detecção em 254 nm

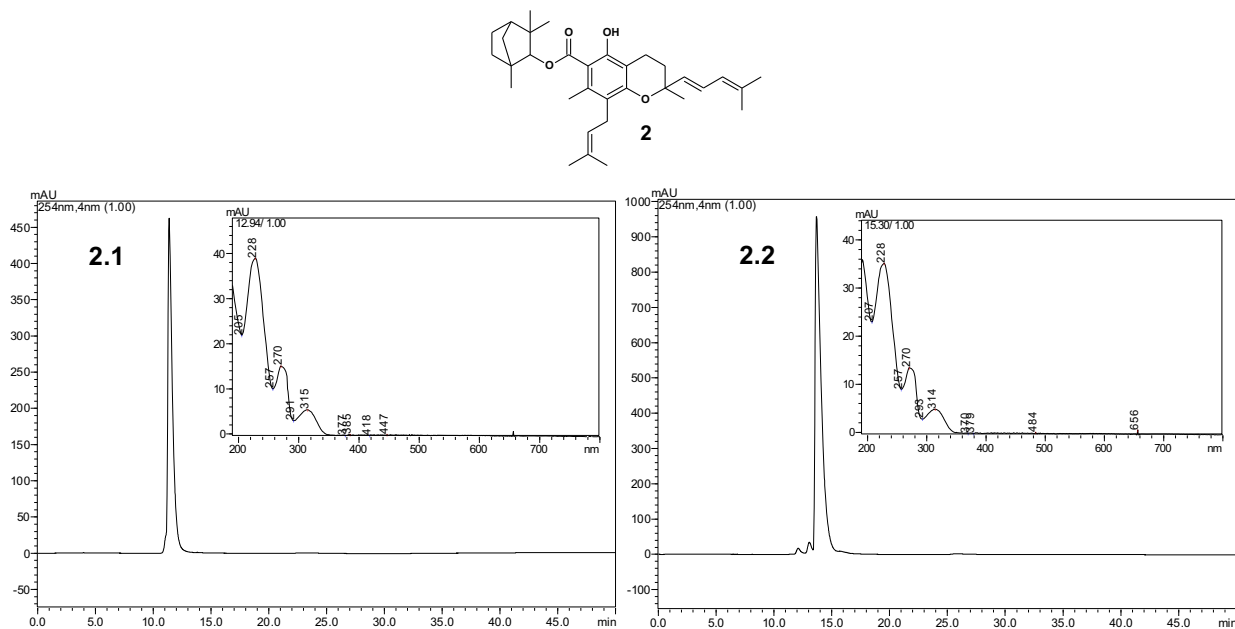


Figura 16 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de **3**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm

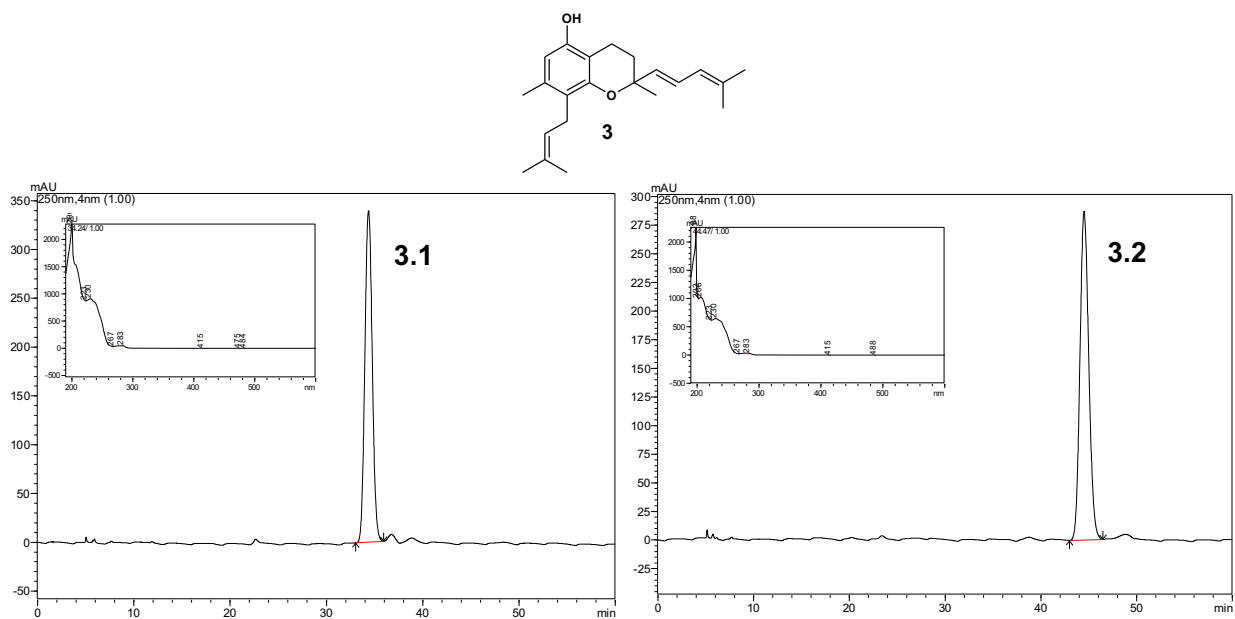


Figura 17 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de **4**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm

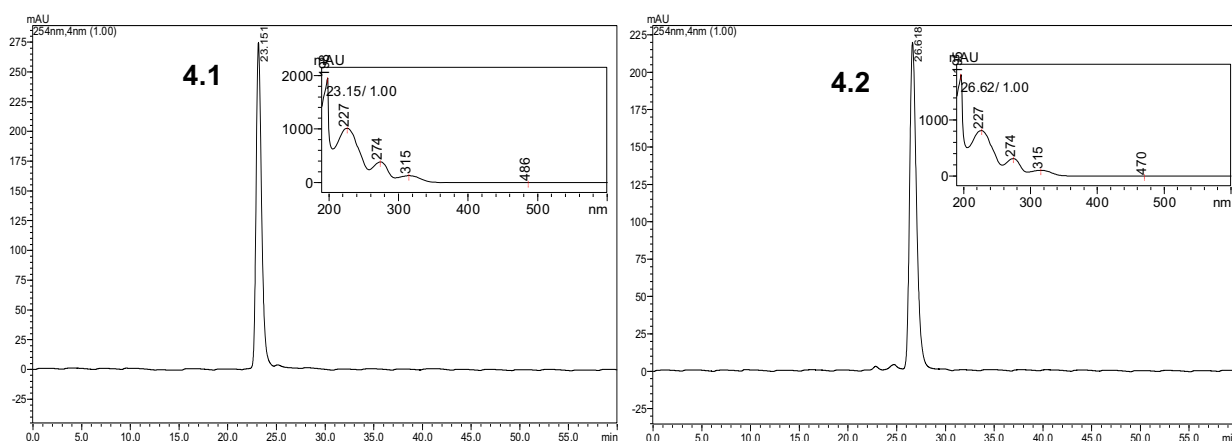
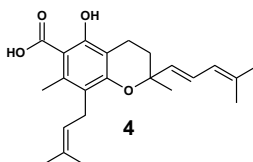
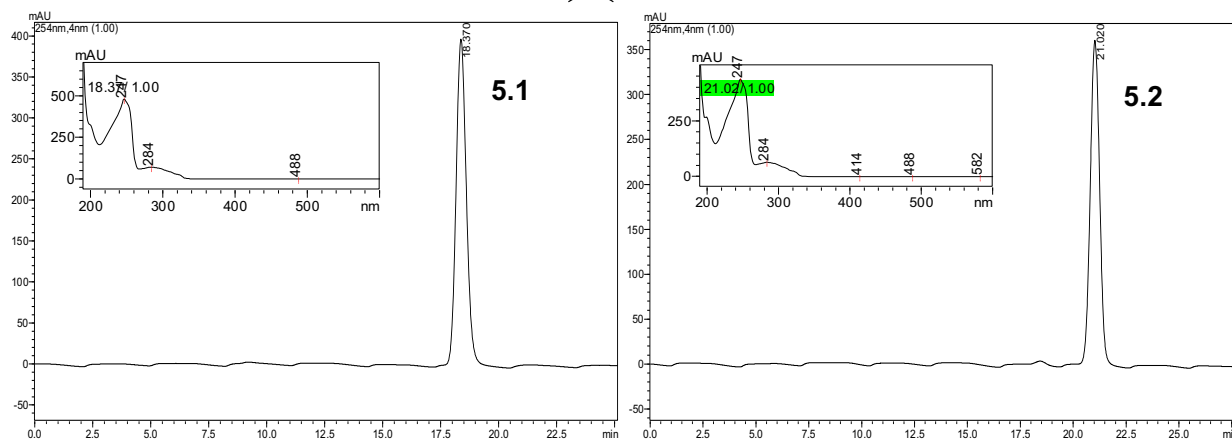
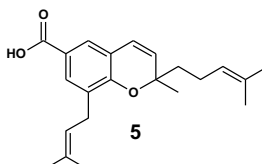


Figura 18 - Cromatogramas e espectros no UV obtidos para os enantiômeros de **5**, coluna Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm, 5 μ m, isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,1% AcOH, 3,0 mL/min, amostra 1,0 mg/mL, v.i. 25 μ L, detecção em 254 nm



1.4.5 Extração do óleo essencial das folhas de *Peperomia obtusifolia*

Como para as substâncias **1** e **2**, foram propostas as estruturas químicas de cromanos esterificados com os monoterpenos borneol e fenchol, respectivamente (vide Resultados e Discussões), foi realizada a extração do óleo essencial das folhas de *P. obtusifolia* a fim de confirmar a presença desses terpenóides na matriz vegetal.

Para tanto, foi utilizado o método de destilação por arraste a vapor. Folhas frescas (120 g) foram trituradas em liquidificador juntamente com 500 mL de água. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão de fundo redondo, acoplado a aparelhagem de Clevenger modificada (WASICKY, 1963) e condensador. A água foi mantida em ebulição durante duas horas. Após o resfriamento da aparelhagem, o óleo essencial foi extraído com éter dietílico.

A análise dos constituintes do óleo essencial foi realizada utilizando CG-EM nas seguintes condições: coluna DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), injetor a 240°C, detector a 250°C, temperatura da coluna programada de 60 a 290°C com incremento de 2°C/min. Utilizou-se hélio como gás de arraste com vazão de 1 mL/min. A ionização no espectrômetro de massas foi efetuada empregando ionização por elétrons com energia de 70 eV.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela análise dos espectros de massas obtidos, dos tempos de retenção e dos índices de retenção. Os dados espectrométricos obtidos foram comparados com aqueles publicados por ADAMS (1995), além de dados da biblioteca Wiley para CG-EM.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 Elucidação/identificação estrutural das substâncias isoladas de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*

Os benzopiranos, como descrito anteriormente, caracterizam-se pela presença de um anel benzeno fundido a um anel pirano. Dentre os diversos níveis de saturação possíveis, nas espécies de Piperaceae destaca-se os 1-benzopiranos do tipo cromano e 2*H*-cromeno.

Os cromanos apresentam um espectro de RMN de ^1H característico, com a presença de dois duplo dubletos ou ainda duplo duplo dubletos na região entre δ 1,60 e 2,50, referentes a H-3 e H-4 da porção pirano. As diferentes multiplicidades são influenciadas pelos substituintes presentes em C-2, posição essa, que pode se configurar em um centro estereogênico. Ainda em se tratando da porção pirano do núcleo 1-benzopirano, destaca-se a presença de um ou dois substituintes metila (H-9), que geram um singleto em torno de δ 1,40. No caso de 2*H*-cromenos, o espectro de RMN de ^1H também apresenta sinais característicos para H-3 e H-4, que se apresentam como dois dubletos entre δ 5,0 e 7,0 com constante de acoplamento de 10 Hz, típica de estereoquímica *cis*.

O padrão de substituição no anel aromático de substâncias derivadas do ácido orselínico caracteriza-se pela presença de um grupo metila (aproximadamente δ 2,40) e por uma hidroxila, ambos em posição *meta* entre si. O anel aromático pode ainda apresentar-se substituído por uma unidade isoprênica e um grupo ácido carboxílico, o qual, quando em posição *orto* à hidroxila, permite a formação de um pseudo-anel de seis membros, o que gera um singleto em torno de δ 11,0 referente à hidroxila quelada.

Já para substâncias derivadas de ácido benzóico, o padrão de substituição do anel aromático se caracteriza pela presença de dois dubletos e um duplo dubleto entre δ 6,5 e 8,0, com constantes de acoplamento de 2,0 e 8,0 Hz, sendo o duplo dubleto ausente em compostos substituídos com uma unidade isoprênica em C-8 ou aqueles derivados de ácido protocatecúico. Nesses casos, observa-se apenas dois dubletos

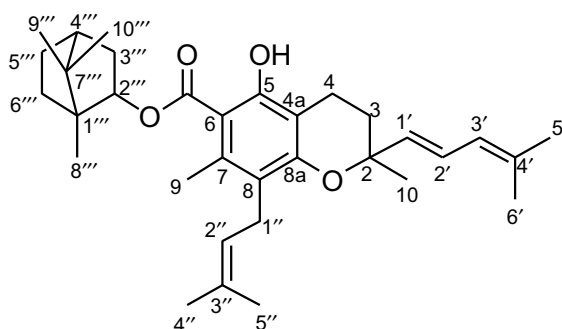
com constantes de acoplamento de 2,0 Hz, típica de acoplamento *meta* entre os hidrogênios H-5 e H-7.

Os dados de RMN de ^{13}C evidenciam a presença de um anel aromático com sinais entre δ 105,0 e 160,0, além de sinais de carbonos sp^2 em δ 120,0 e 155,0, atribuídos aos carbonos C-4a e C-8a, respectivamente, responsáveis pela fusão entre os anéis benzeno e pirano. O carbono C-2 gera um sinal em torno de δ 78,0. O $-\text{CH}_3$ ligado ao anel aromático e o carbono fenólico geram sinais em torno de δ 18,0 e 160,0, respectivamente. No caso de derivados de ácido benzóico esses sinais não são observados.

As substâncias descritas a seguir tiveram suas propostas de determinação estrutural baseadas em espectros mono- e bidimensionais homo- e heteronucleares de RMN, além de espectros de massas tanto de baixa quanto de alta resolução. Os espectros de massas e de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados em seguida à discussão dos dados espectroscópicos e espectrométricos, a fim de confirmar a identidade de cada composto.

1.5.1.1 Elucidação estrutural de 1.1-1.4

As substâncias **1.1-1.4** foram isoladas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto EtOH da folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*, descrito nas seções **1.4.1** (pág. 30) e **1.4.4** (pág. 37).

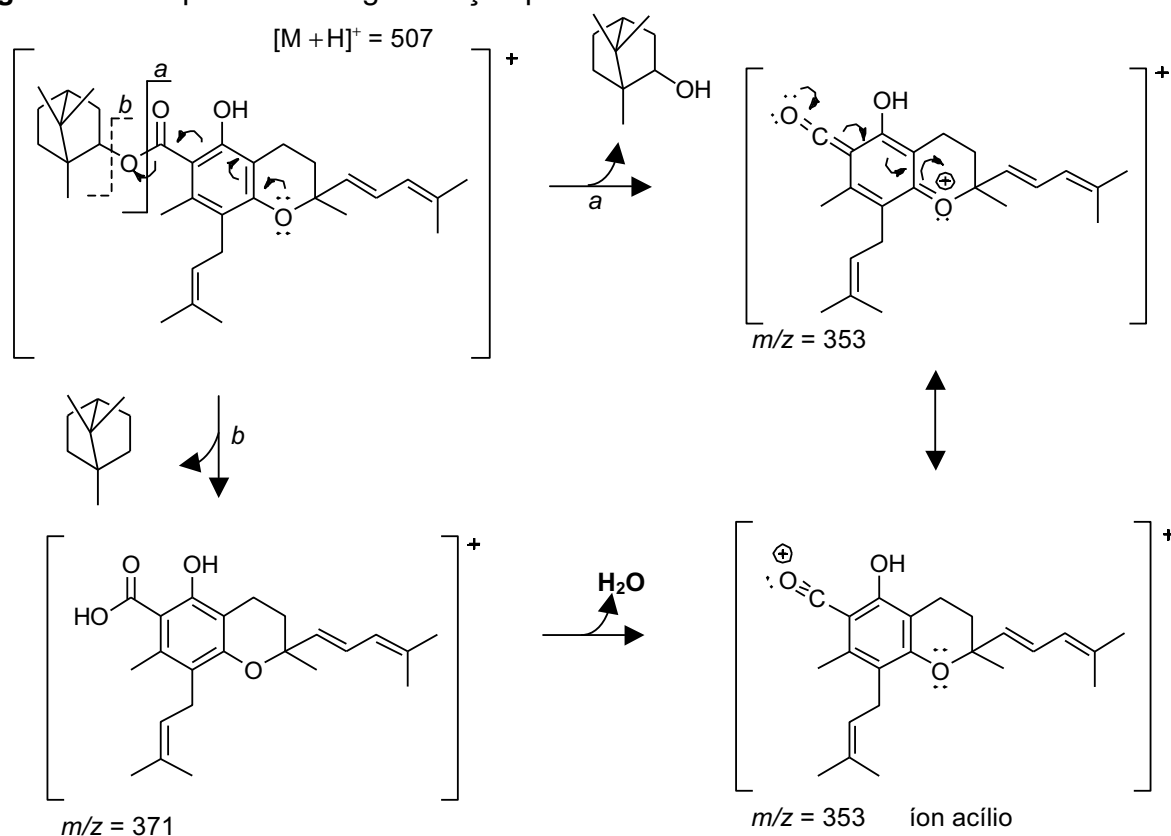


Os compostos **1.1** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20$ (c 1,0; CHCl_3), **1.2** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +10$ (c 0,9; CHCl_3), **1.3** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -9$ (c 0,4; CHCl_3) e **1.4** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19$ (c 0,5; CHCl_3), os quais foram obtidos como óleos de coloração amarelo claro, apresentaram espectros de RMN de

^1H e de ^{13}C praticamente indistinguíveis, além de espectros de massas de alta resolução idênticos. Como as substâncias em questão são oriundas de fracionamento cromatográfico utilizando coluna com fase estacionária quiral, esses resultados sugerem a presença de estereoisômeros.

A fórmula molecular de **1.1-1.4** foi determinada como $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_4$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo (molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ obsd m/z 507,3468; calcd 507,3474; Δ -0.6 mmu e aduto com sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$ obsd m/z 529,3278; calcd 529,3293; Δ -1.5 mmu), bem como por extensiva análise por RMN. Além disso, a subsequente fragmentação por EM-EM do íon $[\text{M} + \text{H}]^+ = 507,3468$ gerou os fragmentos m/z 371,2215 e m/z 353,2114 indicando a perda da unidade monoterpênica seguida de uma provável perda de H_2O . A formação do íon m/z 353,2114 pode ainda ser explicada pela formação de um íon acílio, resultado de rearranjo durante a perda da unidade monoterpênica em questão (Figura 19, pág. 44).

Figura 19 - Propostas de fragmentação para **1.1-1.4** utilizando EM-ESI



A análise dos espectros de RMN de ^{13}C , bem como gHMQC revelou a presença de 33 carbonos, incluindo um grupo carboxila em δ 173,0 sugestivo de função éster, quatro grupos metinos olefinicos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,02/123,1; 5,46/133,7; 5,68/124,4; 6,24/125,2), quatro grupos metila ligado a carbonos alifáticos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 0,86/13,7; 0,84/19,7; 0,89/18,9; 1,36/27,3), quatro grupos metila ligados a carbonos olefinicos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,60/18,2; 1,60/25,7; 1,66/25,8; 1,71/18,0), um grupo metila ligado a um anel aromático ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2,45/18,9), seis grupos metilênicos, um grupo metino alifático ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,68/44,8), um grupo oximetino ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,06/82,3), oito carbonos olefinicos ou aromáticos não protonados, dois carbonos aromáticos ligados a oxigênio (δ 159,8 e 156,3), além de um carbono carbinólico quaternário (δ 77,0).

Dos 33 sinais observados, 23 estavam de acordo com aqueles que caracterizam o composto ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico, isolado anteriormente das partes aéreas de *P. obtusifolia* (MOTA et al., 2009) e descrito no presente trabalho como substância **4**. Assim, os 10 sinais adicionais foram corroborados como pertencentes à uma porção monoterpênica. A análise dos espectros gHMQC, gHMBC e gCOSY permitiu a identificação do monoterpene em questão como borneol. Experimentos NOESY 1D indicaram que todos os compostos possuem H-2''' (δ 5,06) na posição *exo* e o grupo cromano na posição *endo* do núcleo bornila. Ao irradiar H-2''', foi observado NOE positivo para -CH₃-8''' (δ 0,86), -CH₃-10''' (δ 0,89) e H-3''' (δ 2,44) (Figura 29, pág. 56). Dessa forma, existiam duas possibilidades de configuração absoluta para o grupo bornila: 1'''*R*,2'''*S*,4'''*R* e 1'''*S*,2'''*R*,4'''*S*.

Os experimentos de RMN de ^1H permitiram a identificação de um anel aromático totalmente substituído com a presença de uma hidroxila em δ 11,7 (1H, s), uma metila em δ 2,45 (3H, s) e um grupo isopentenílico em C-8, caracterizado pelos sinais em δ_{Ha} 3,36 (1H, dd, $J = 7,0$ e $15,0$ Hz), δ_{Hb} 3,25 (1H, dd, $J = 7,0$ e $15,0$ Hz) e δ 5,02 (1H, t, $7,0$ Hz) referentes a H-1'' e H-2'', respectivamente, além dos sinais em δ 1,60 (3H, sl) e δ 1,71 (3H, sl) atribuídos aos grupos metílicos H-4'' e H-5'', respectivamente. Ligados a C-2, foram identificados um grupo metílico em δ 1,36 (3H, s) referente a H-9 e uma unidade isopentadienílica ligada através de C-1', caracterizada pelos sinais em δ 5,46 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), δ 6,24 (1H, dd, $J = 11,0$ e $15,0$ Hz) e δ 5,68 (1H, d, $J = 11,0$ Hz)

referentes a H-1', H-2' e H-3', respectivamente. Os grupos metílicos dessa unidade foram confirmados a partir dos sinais em δ 1,55 (3H, s) e δ 1,66 (3H, s), atribuídos a H-5' e H-6', respectivamente. Experimentos NOESY, associados às constantes de acoplamento descritas confirmam o dieno com estereoquímica *trans*. A ausência da insaturação entre C-3 e C-4 confirmou-se pelos sinais em δ_{Ha} 1,85 (1H, ddd, $J = 5,5, 5,5$ e $13,5$ Hz), δ_{Hb} 1,72 (1H, m), δ_{Ha} 2,64 (1H, ddd, $J = 5,5, 5,5$ e 17 Hz) e δ_{Hb} 2,45 (1H, m), referentes a H-3 e H-4, respectivamente.

Embora não tenha sido observada correlação no experimento *g*HMBC entre o hidrogênio oximetínico H-2''' e o carbono carboxílico da função éster, correlações de NOE evidenciaram a junção das duas porções. A irradiação do grupo metila -CH₃-8''' (δ 0,86) resultou em NOE positivo para o grupo metila aromático -CH₃-9 em δ 2,45. Por fim, como será abordado no próximo capítulo, a presença de uma banda de absorção no IV em 1650 cm^{-1} , comum a todos os compostos, reforça o assinalamento de **1.1-1.4** como ésteres. Assim, **1.1**, **1.2**, **1.3** e **1.4** foram identificados como estereoisômeros do 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxilato de bornila. As principais correlações observadas nos experimentos *g*HMBC, *g*COSY e NOE são apresentadas na figura 20 (pág. 46). Os dados de RMN de ¹H e de ¹³C são apresentados na tabela 2 (pág. 47). Essa é a primeira vez que esses compostos são descritos na literatura (BATISTA et al., 2011a) e os dados espectroscópicos e espectrométricos estão de acordo com aqueles descritos para ésteres de monoterpênos (AHMED et al., 2008).

Figura 20 - Algumas correlações observadas nos experimentos *g*HMBC (H→C), ¹H-¹H COSY e NOE comuns aos compostos **1.1-1.4**

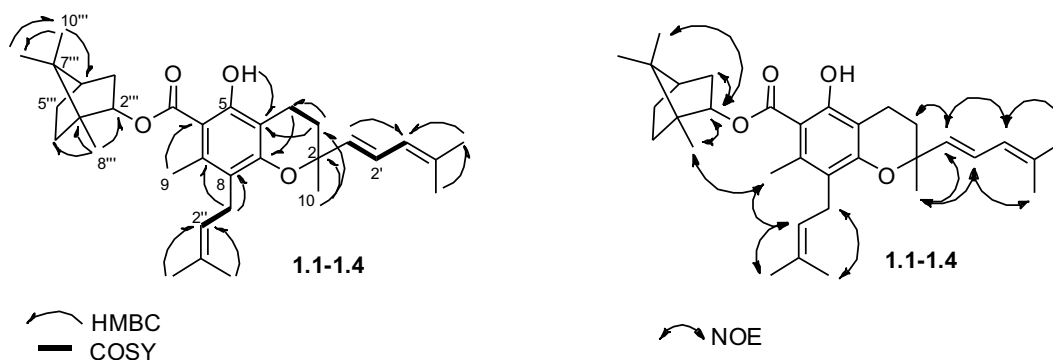


Tabela 2 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para 1.1-1.4 em CDCl_3

No.	$^{13}\text{C}^a$	1.1 $^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)	$^{13}\text{C}^a$	1.2 $^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)	$^{13}\text{C}^a$	1.3 $^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)	$^{13}\text{C}^a$	1.4 $^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)
2	77,0	–	77,2	–	77,0	–	77,0	–
3(a)	31,5	1,85 ddd 5,5, 5,5, 13,5	31,5	1,86 m	31,5	1,86 m	31,5	1,85 ddd 5,5, 5,5, 13,0
(b)		1,72 m		1,72 m		1,71 m		1,72 m
4(a)	17,0	2,64 ddd 5,5, 5,5, 17,0	17,0	2,66 ddd 5,5, 5,5, 17,0	17,0	2,64 ddd 5,5, 5,5, 17,0	17,0	2,64 ddd 5,5, 5,5, 17,0
(b)		2,45 m		2,45 m		2,44 m		2,45 m
4a	106,9	–	106,9	–	106,9	–	106,9	–
5	159,8	–	159,8	–	159,8	–	159,8	–
6	105,4	–	105,4	–	105,4	–	105,4	–
7	136,8	–	136,8	–	136,8	–	136,8	–
8	120,6	–	120,6	–	120,6	–	120,6	–
8a	156,3	–	156,3	–	156,3	–	156,3	–
9	18,9	2,44 s (3H)	18,9	2,44 s (3H)	18,9	2,44 s (3H)	18,9	2,45 s (3H)
10	27,3	1,36 s (3H)	27,2	1,36 s (3H)	27,2	1,36 s (3H)	27,3	1,36 s (3H)
1'	133,7	5,46 d 15,0	133,7	5,46 d 15,0	133,7	5,46 d 15,5	133,7	5,46 d 15,5
2'	125,2	6,24 dd 11,0, 15,0	125,2	6,22 dd 11,0, 15,0	125,2	6,22 dd 10,5, 15,5	125,2	6,24 dd 11,0, 15,0
3'	124,4	5,68 d 11,0	124,4	5,68 d 11,0	124,4	5,68 d 10,0	124,4	5,68 d 11,0
4'	135,4	–	135,4	–	135,5	–	135,4	–
5'	25,8	1,66 s (3H)	25,8	1,66 s (3H)	25,8	1,66 s (3H)	25,8	1,66 s (3H)
6'	18,2	1,60 s (3H)	18,2	1,59 s (3H)	18,2	1,60 s (3H)	18,2	1,60 s (3H)
1''(a)	24,9	3,36 dd 7,0, 15,0	24,9	3,38 dd 7,0, 15,0	24,9	3,38 dd 7,0, 15,0	24,9	3,37 dd 7,0, 15,0
(b)		3,25 dd 7,0, 15,0		3,26 dd 7,0, 15,0		3,26 dd 7,0, 15,0		3,26 dd 7,0, 15,0
2''	123,1	5,02 tl 7,0	123,1	5,02 tl 7,0	123,1	5,02 tl 7,0	123,1	5,02 tl 7,0
3''	130,8	–	130,8	–	130,8	–	130,8	–
4''	25,7	1,60 sl (3H)	25,7	1,60 sl (3H)	25,8	1,60 sl (3H)	25,7	1,60 sl (3H)
5''	18,0	1,71 sl (3H)	18,0	1,71 sl (3H)	18,0	1,71 sl (3H)	18,0	1,71 sl (3H)
1'''	48,8	–	48,7	–	48,7	–	48,7	–
2'''	82,3	5,06 m	82,3	5,07 m	82,3	5,05 m	82,3	5,06 m
3'''(a)	37,1	2,44 m	37,2	2,42 m	37,2	2,42 m	37,1	2,42 m
(b)		1,06 dd 3,5, 14,0		1,05 m		1,05 m		1,05 m
4'''	44,8	1,68 m	44,7	1,67 m	44,7	1,66 m	44,8	1,68 m
5'''(a)	28,0	1,70 m	28,0	1,70 m	28,0	1,71 m	28,0	1,70 m
(b)		1,20 m		1,20 m		1,18		1,20
6'''(a)	27,9	1,98 ddd 4,0, 11,0, 13,5	27,8	1,98 m	27,8	1,98 m	27,9	1,98
(b)		1,34 m		1,34 m		1,34 m		1,34 m
7'''	47,8	–	47,8	–	47,8	–	47,8	–
8'''	13,7	0,86 s (3H)	13,7	0,86 s (3H)	13,8	0,86 s (3H)	13,7	0,85 s (3H)
9'''	19,7	0,84 s (3H)	19,7	0,84 s (3H)	19,7	0,85 s (3H)	19,7	0,84 s (3H)
10'''	18,9	0,89 s (3H)	18,9	0,89 s (3H)	18,9	0,89 s (3H)	18,9	0,89 s (3H)
C=O	173,0	–	173,0	–	173,0	–	173,0	–
O-H	–	11,7 s	–	11,6 s	–	11,6 s	–	11,6 s

^a125 MHz ^b500 MHz. Deslocamentos químicos em ppm.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1

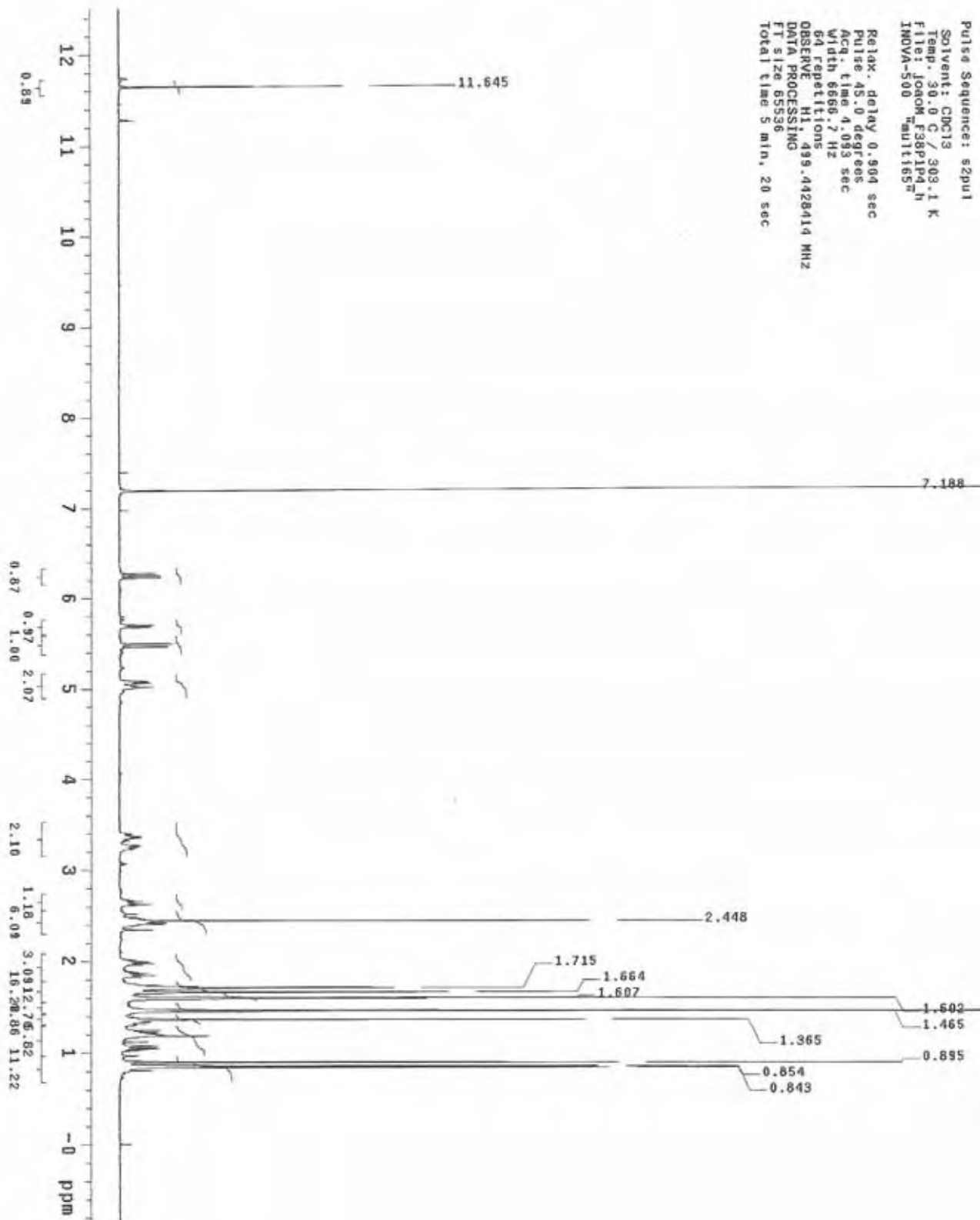


Figura 22 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1

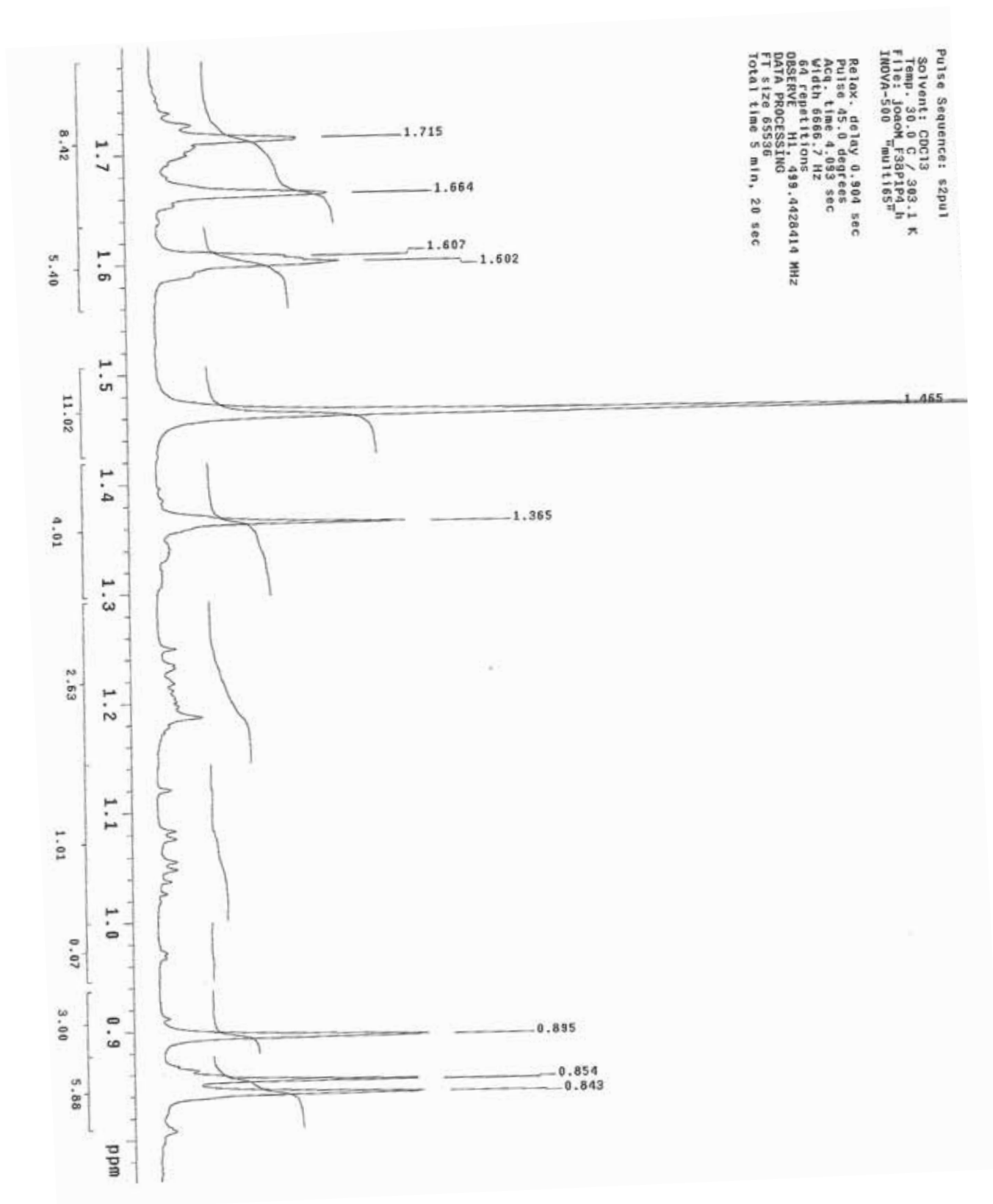


Figura 23 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1

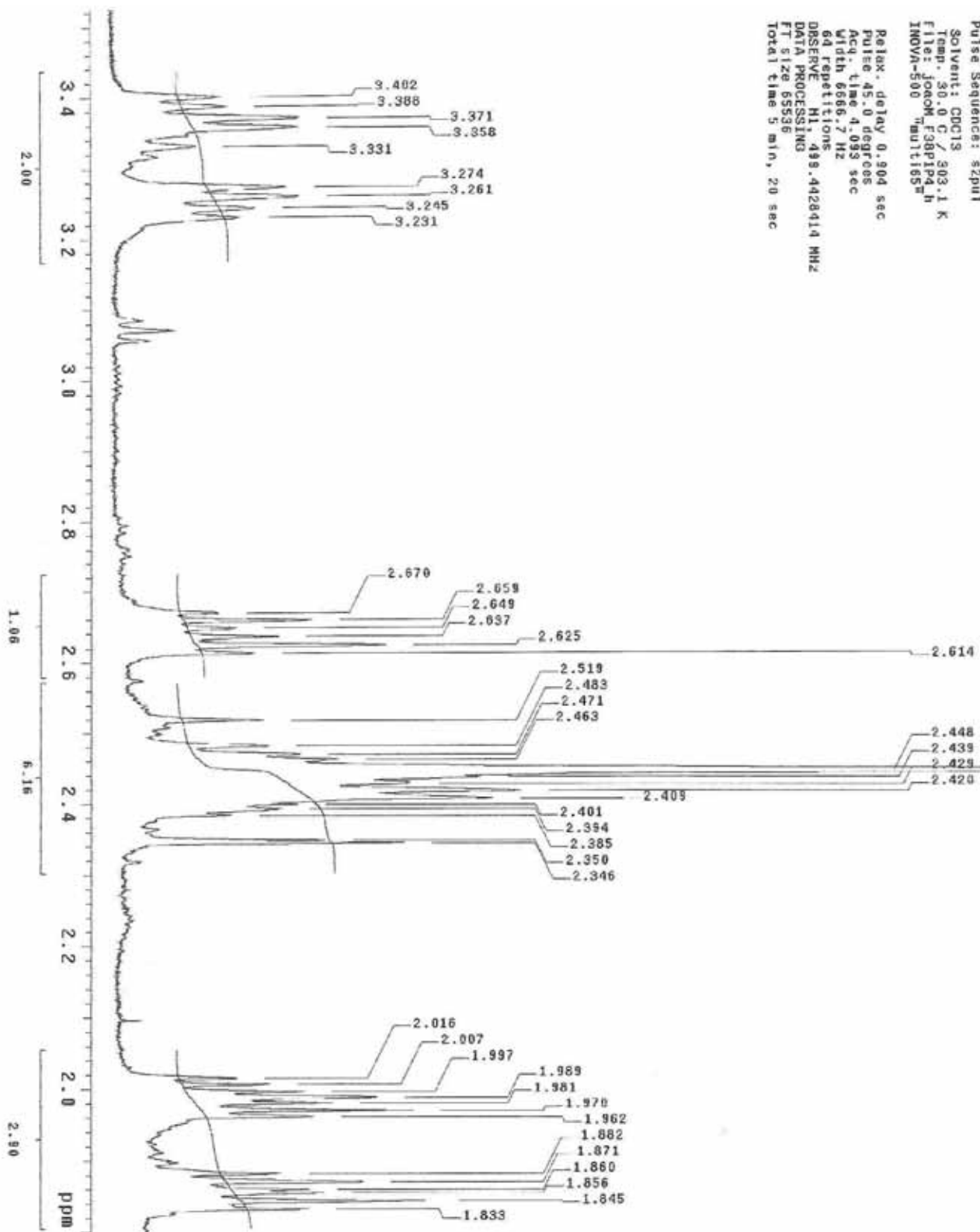


Figura 24 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.1

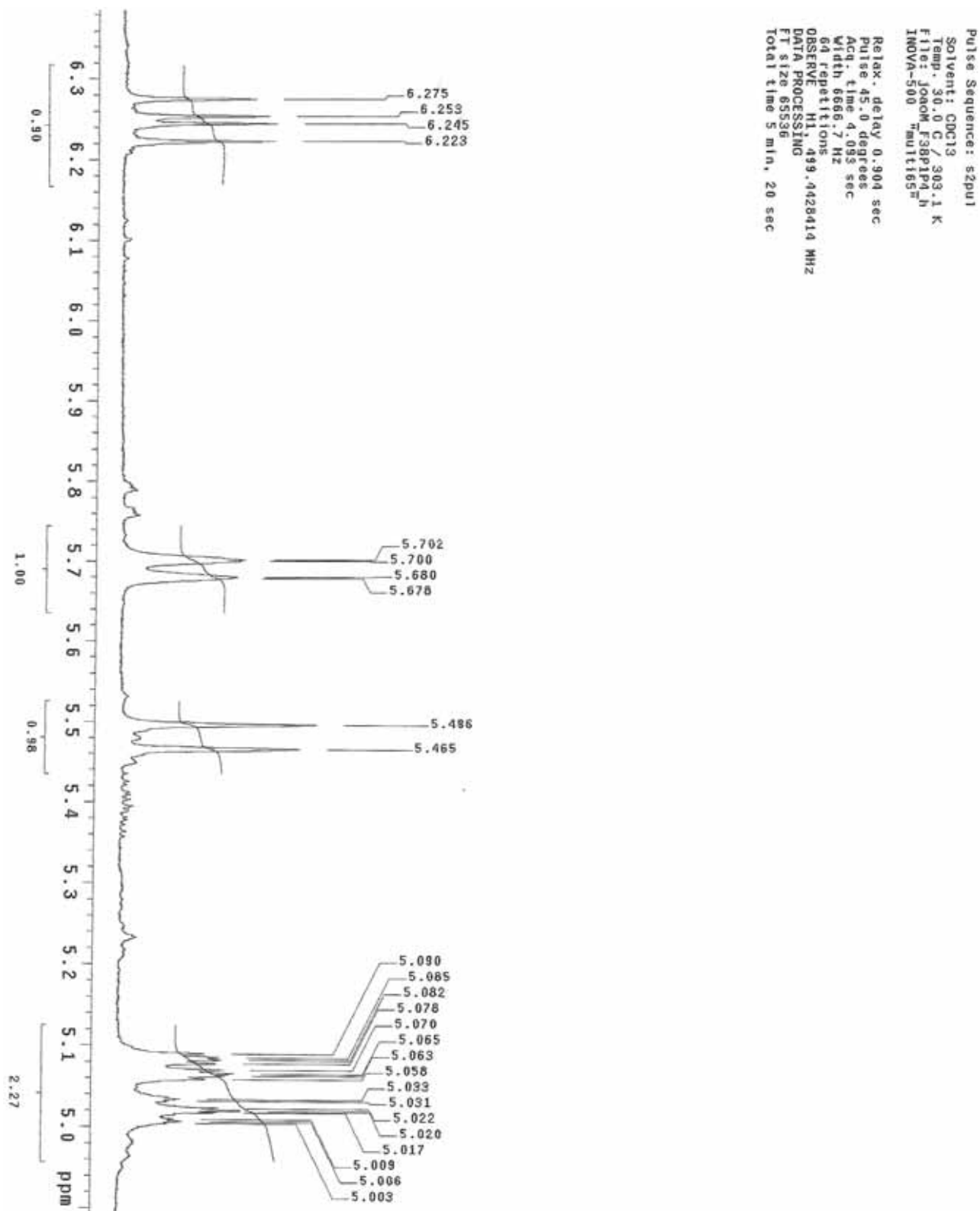


Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.1

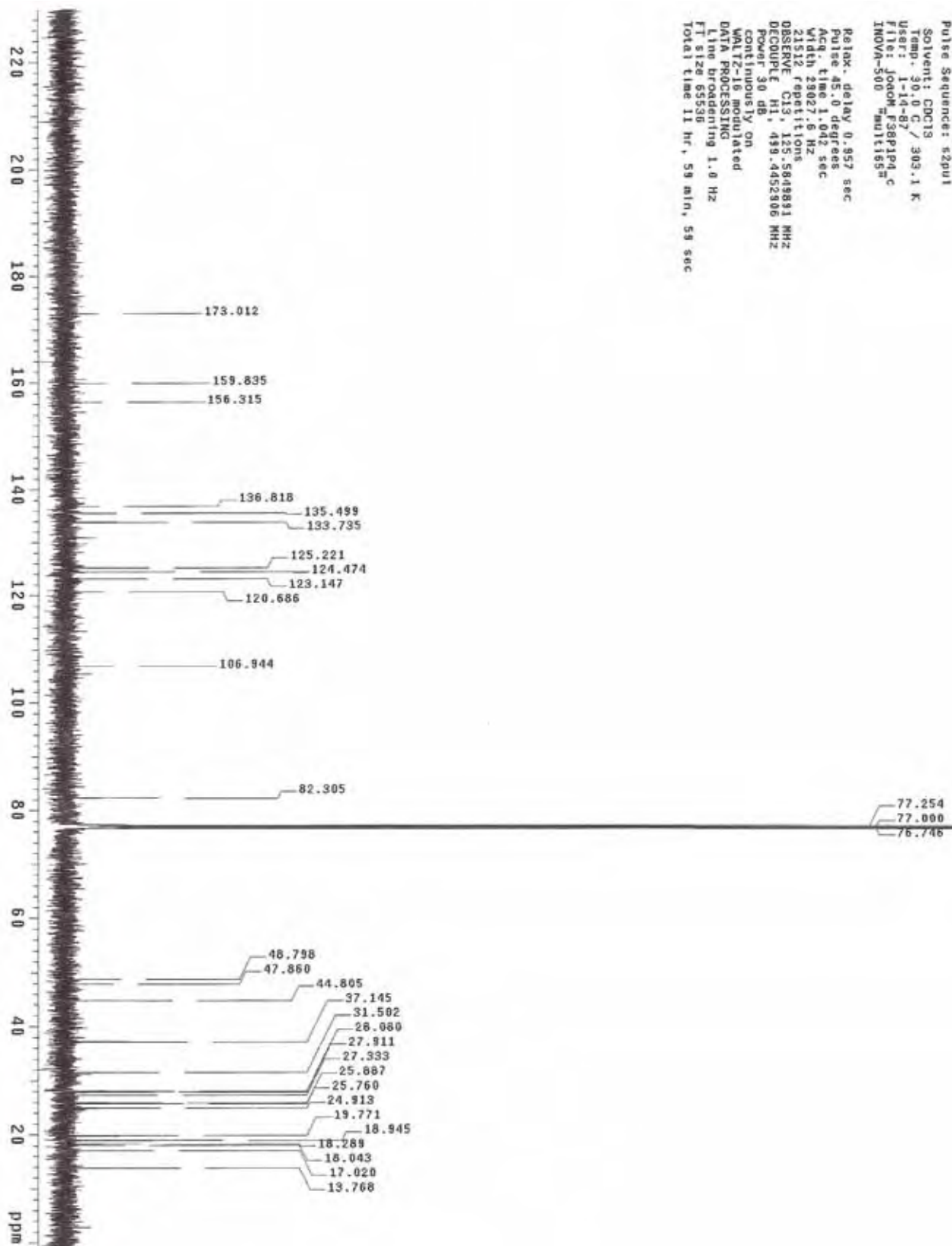


Figura 26 - Espectro gHMQC (CDCl₃, 500 MHz) de 1.1

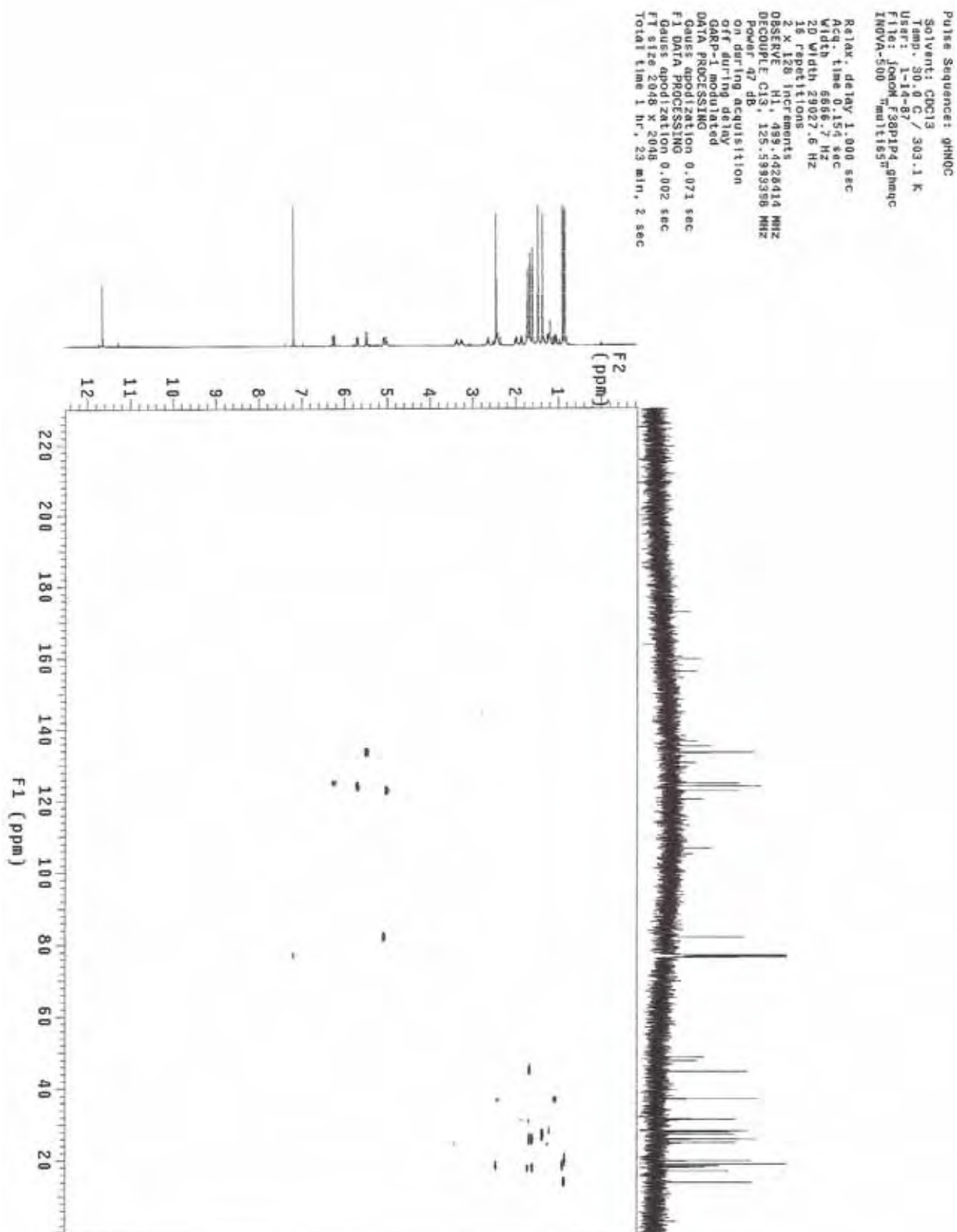


Figura 27 - Espectro gHMBC (CDCl₃, 500 MHz) de 1.1

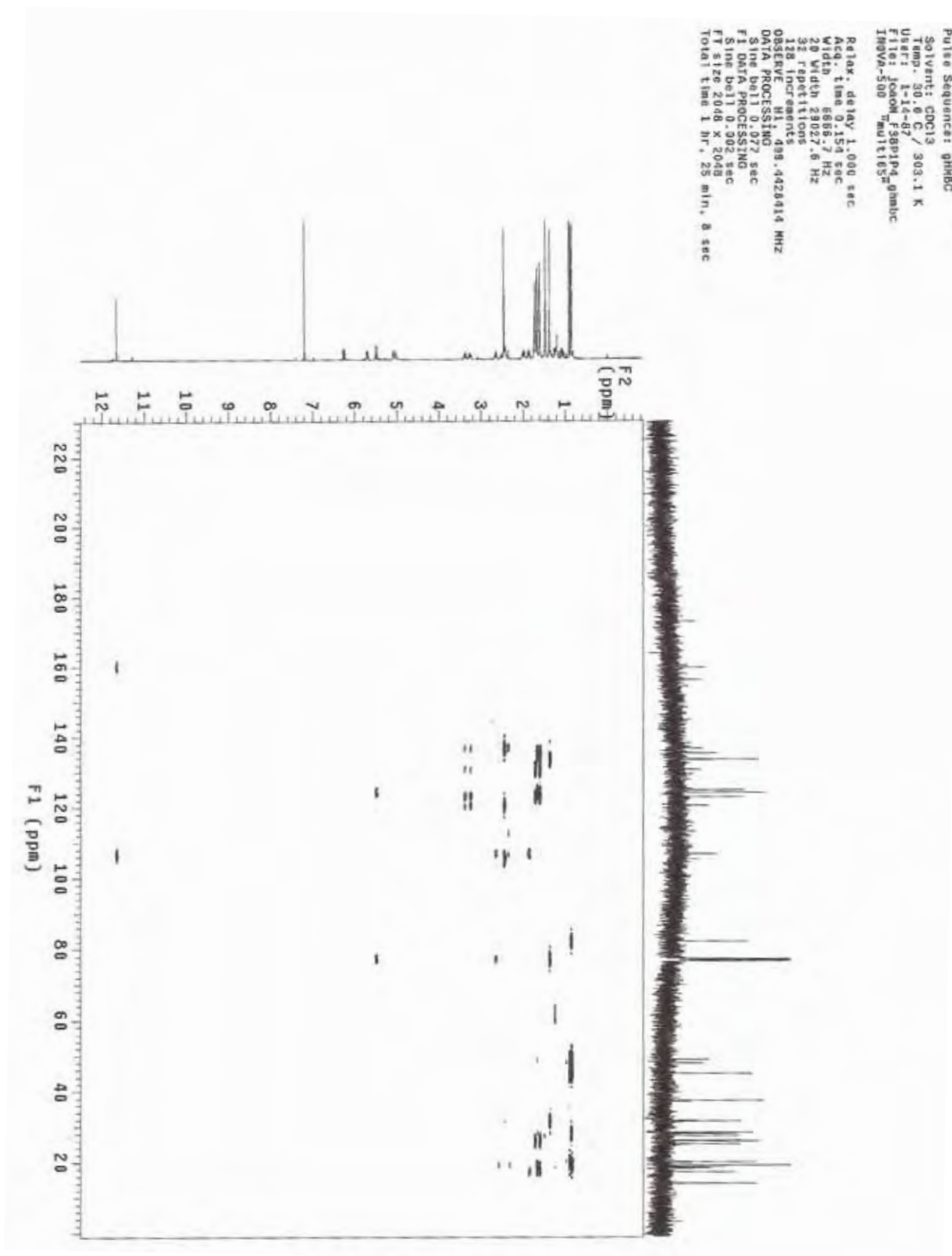


Figura 28 - Espectro gCOSY (CDCl₃, 500 MHz) de 1.1

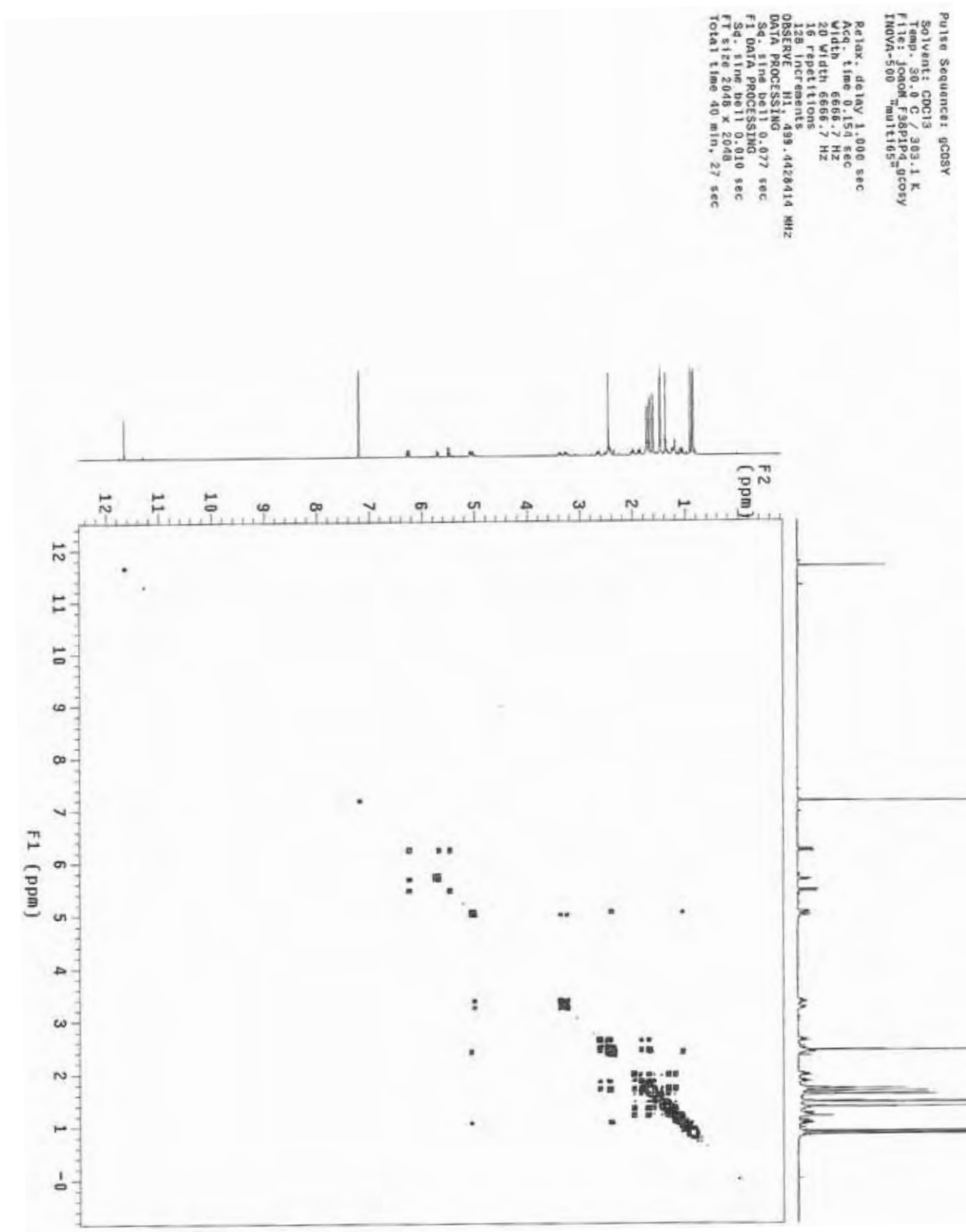


Figura 29 - Espectro NOESY 1D de 1.1

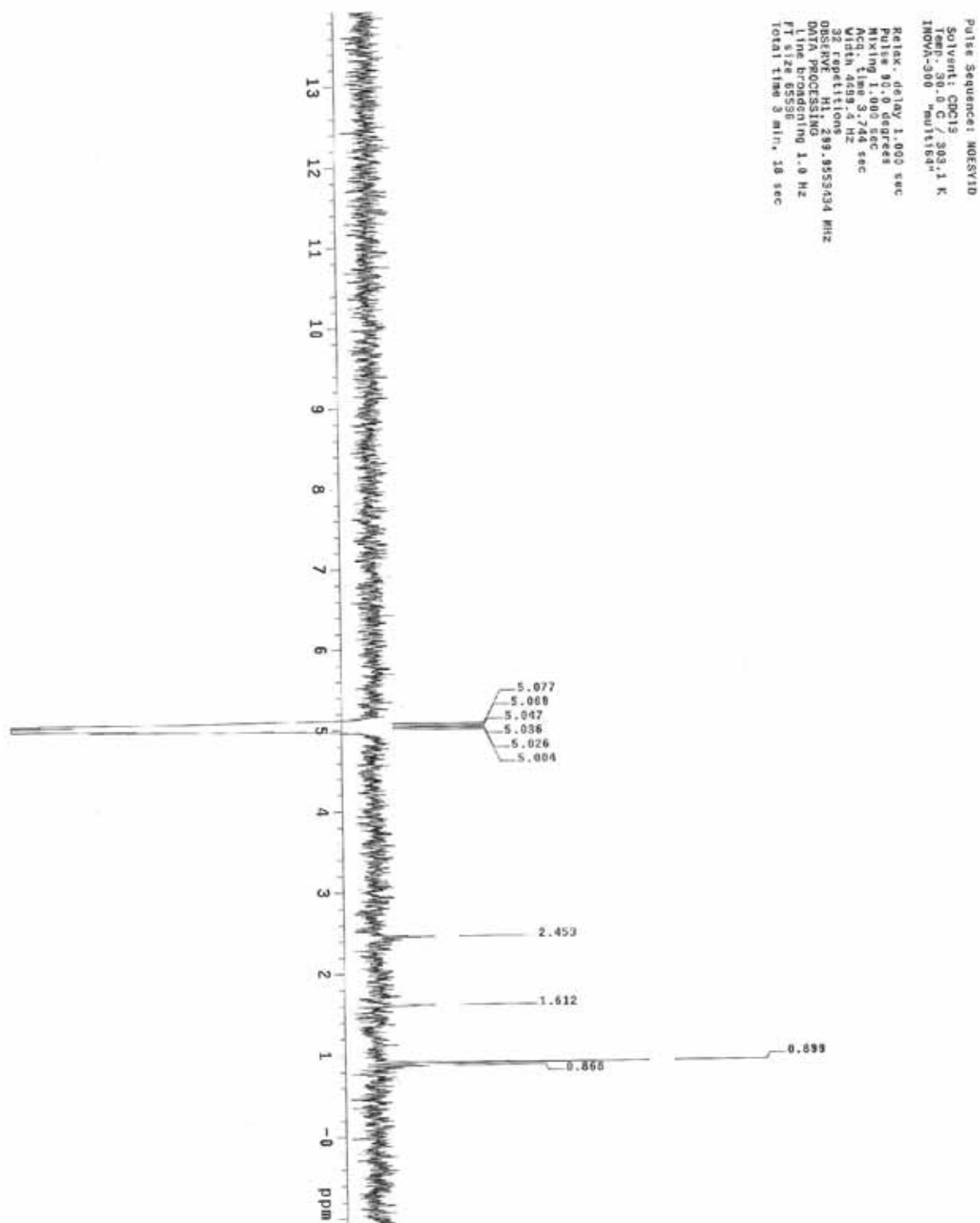


Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, e íons filhos de 1.1 no modo positivo

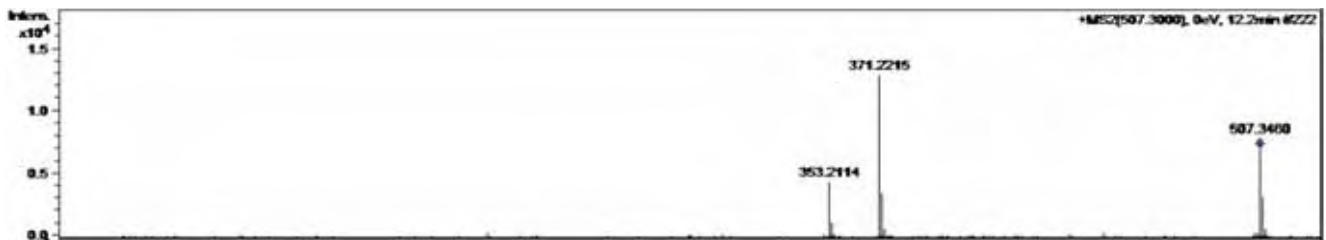
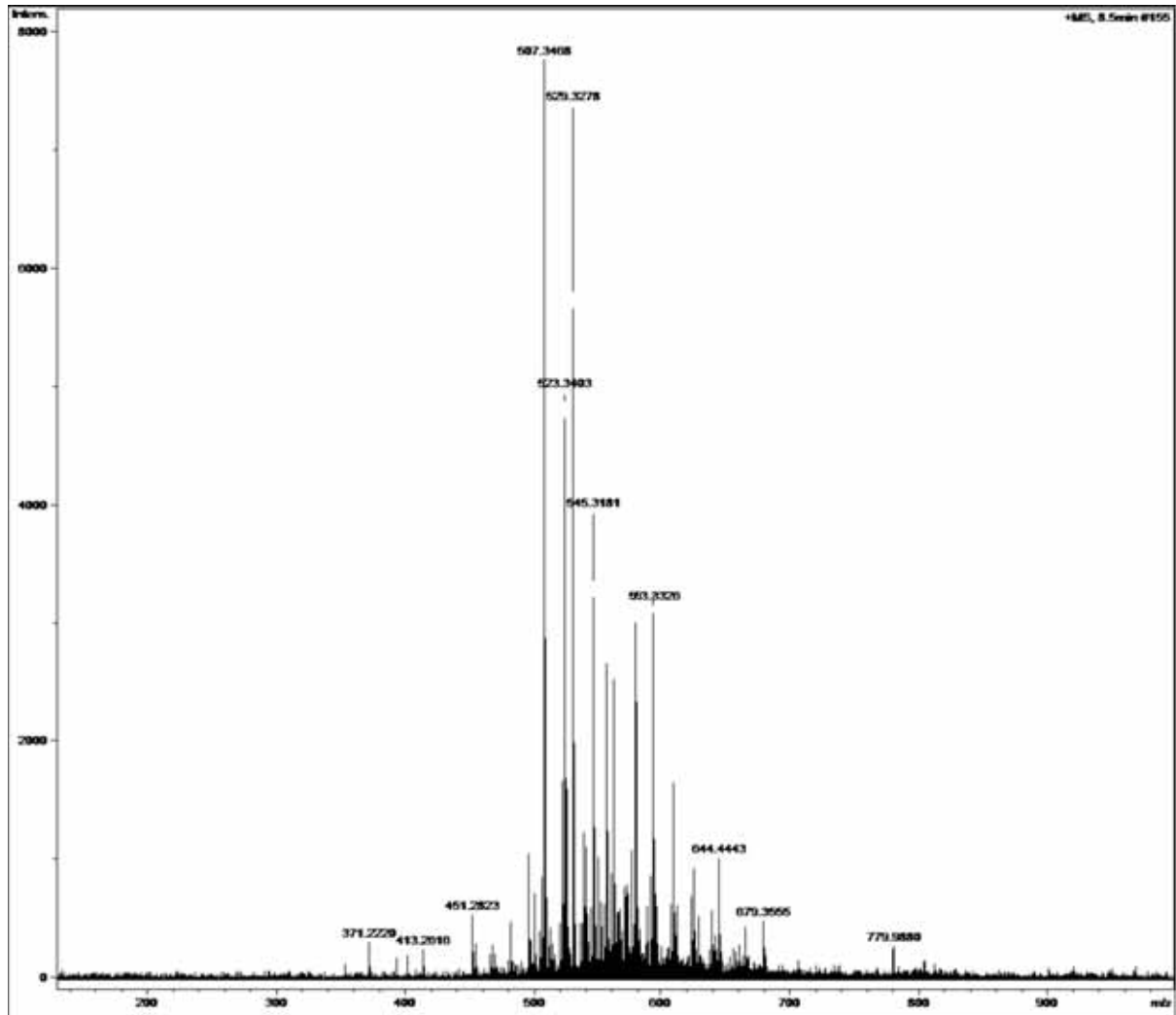


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.2

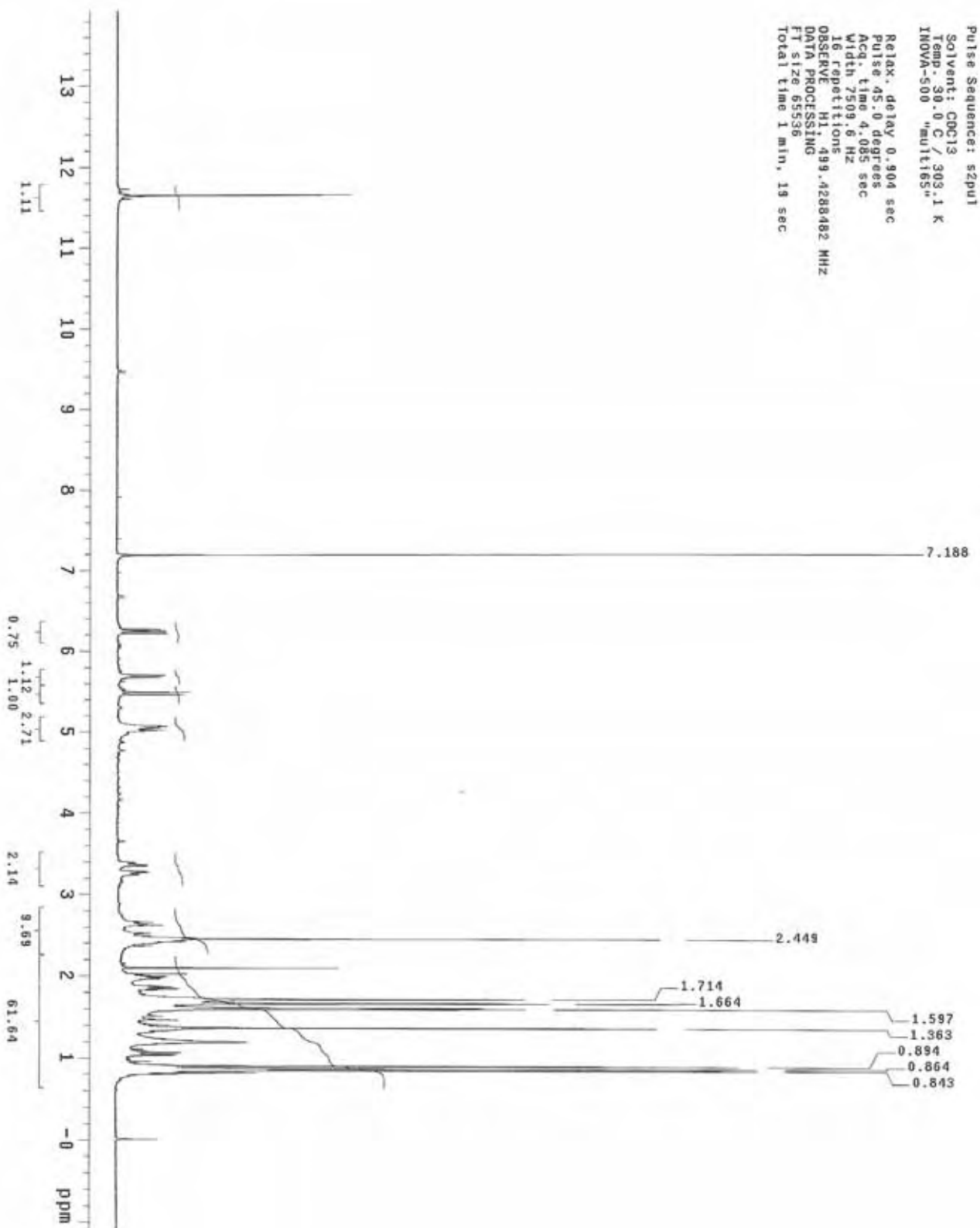


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.2

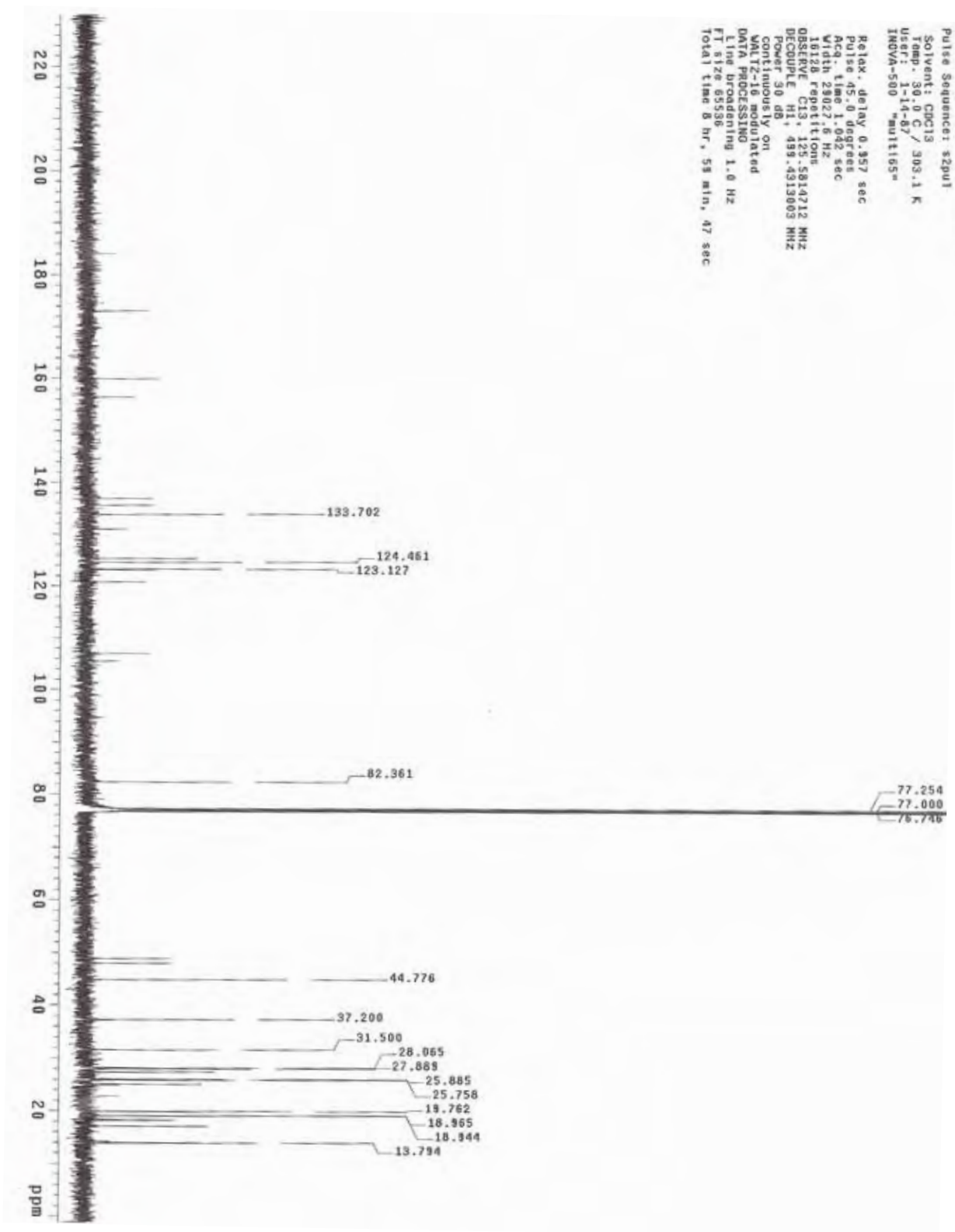


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.3

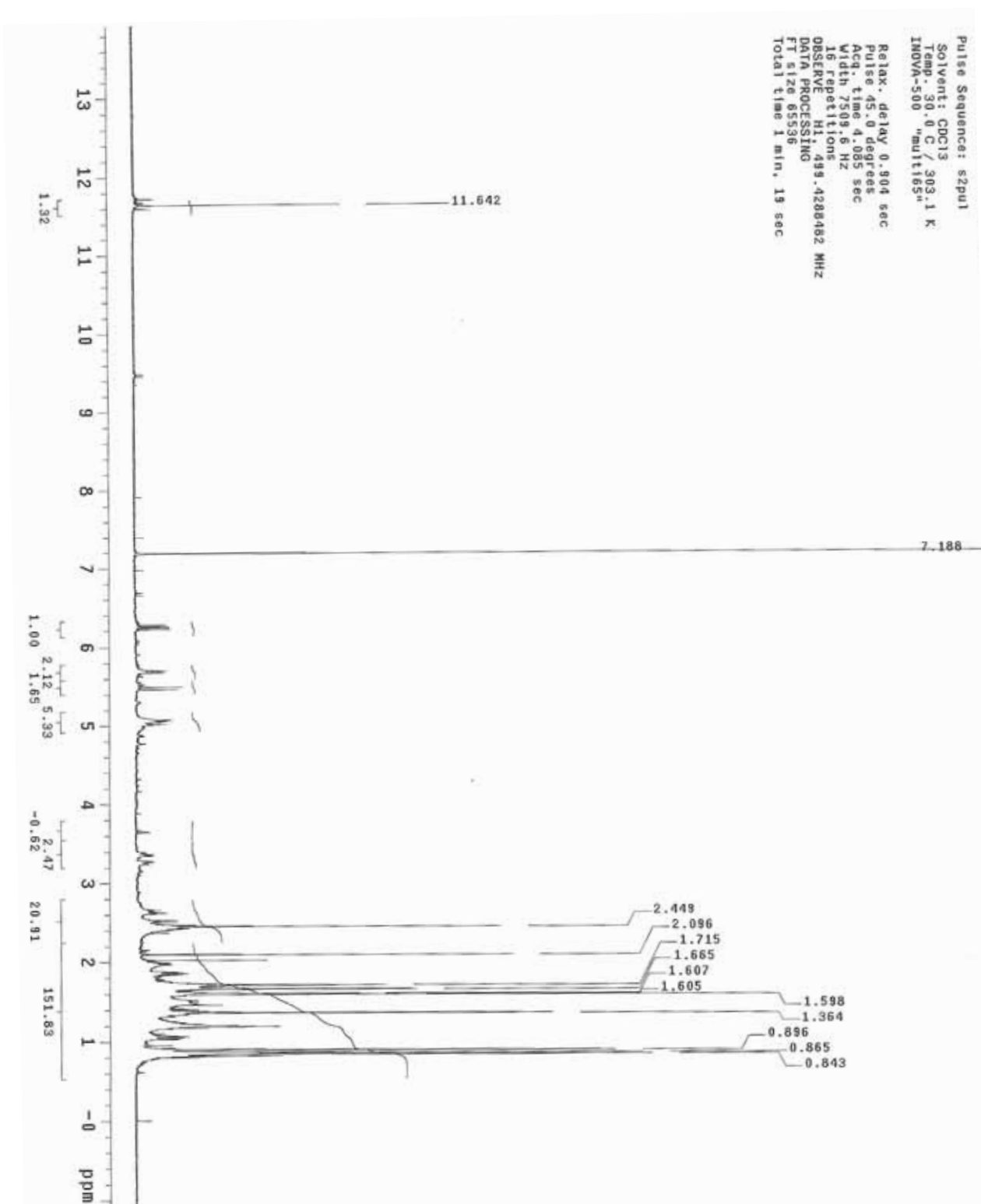


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.3

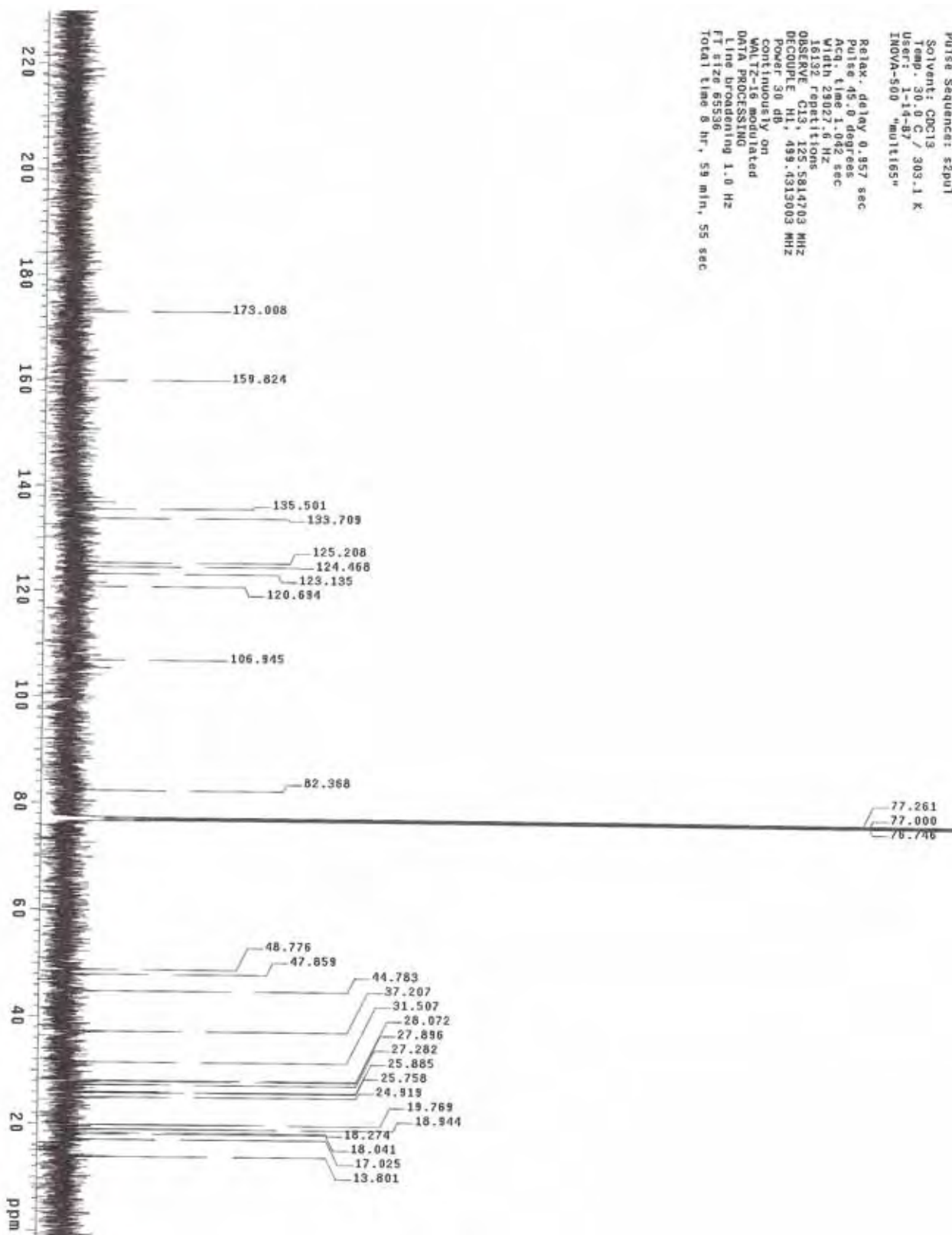


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1.4

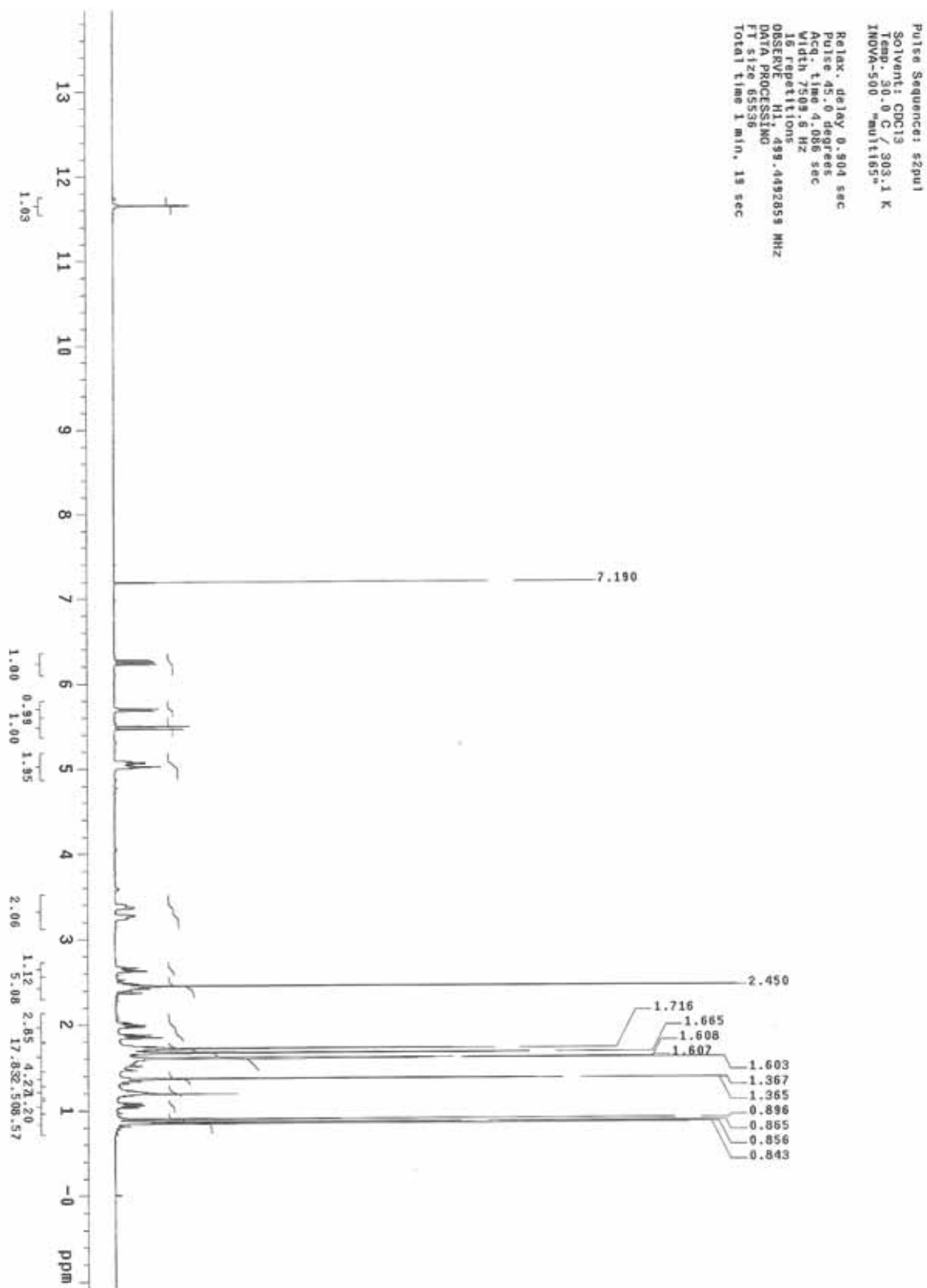
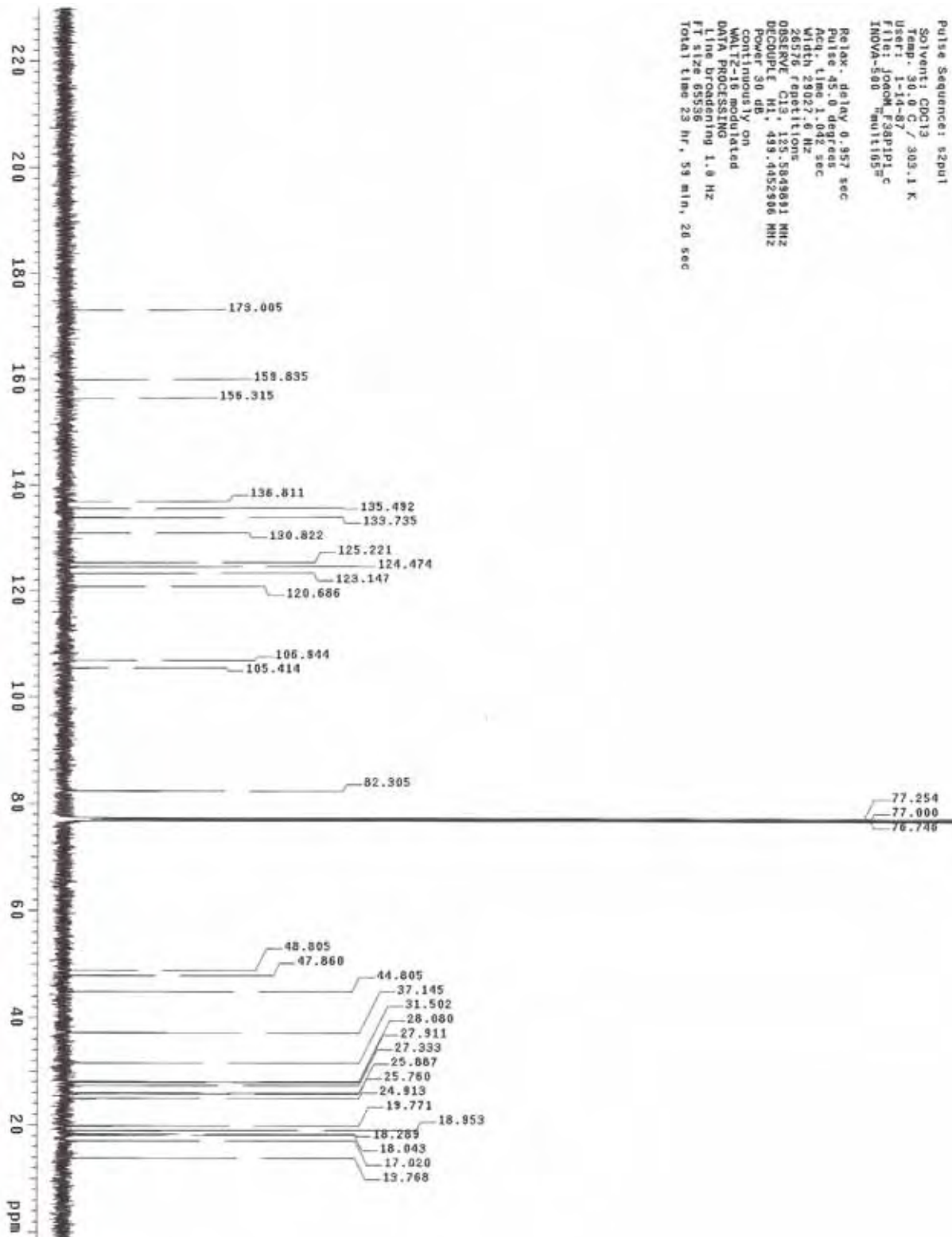
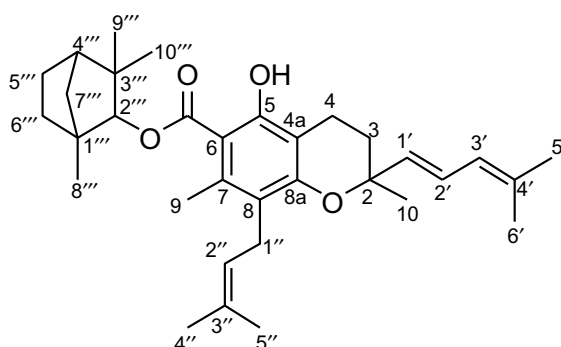


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1.4



1.5.1.2 Elucidação estrutural de 2.1 e 2.2

As substâncias **2.1** e **2.2** foram isoladas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto EtOH das folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*, descrito nas seções **1.4.1** (pág. 30) e **1.4.4** (pág. 37).



Os compostos **2.1** $\{[\alpha]_D^{25} = -10 (c 0,4; CHCl_3)\}$ e **2.2** $\{[\alpha]_D^{25} = +20 (c 0,5; CHCl_3)\}$, os quais também foram obtidos como óleos de coloração amarelo claro, apresentaram espectros de RMN de 1H e de ^{13}C praticamente indistinguíveis, além de espectros de massas de alta resolução idênticos. Como as substâncias em questão são oriundas de fracionamento cromatográfico utilizando coluna com fase estacionária quiral, esses resultados sugerem a presença de estereoisômeros.

A fórmula molecular de **2.1** e **2.2** foi determinada como $C_{33}H_{46}O_4$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray, no modo positivo (molécula protonada $[M + H]^+$ obsd m/z 507,3468; calcd 507,3474; $\Delta -0.6$ mmu e aduto com sódio $[M + Na]^+$ obsd m/z 529,3282; calcd 529,3293; $\Delta -1.1$ mmu), bem como por extensiva análise por RMN. Além disso, a subsequente fragmentação por EM-EM do íon $[M + H]^+ = 507,3468$ gerou os fragmentos m/z 371,2260 e m/z 353,2143 indicando a perda da unidade monoterpênica seguida de uma provável perda de H_2O . A formação do íon m/z 353,2143 pode ainda ser explicada pela formação do íon acílio, resultado de rearranjo durante a perda da unidade monoterpênica em questão, de maneira análoga ao descrito para **1.1-1.4** (Figura 19, pág. 44).

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C , bem como gHMQC revelou a presença de 33 carbonos, incluindo um grupo carboxila δ 173,0 sugestivo de função éster, quatro grupos metinos olefínicos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,01/123,1; 5,45/133,7; 5,66/124,4; 6,22/125,2), quatro grupos metila ligados a carbonos alifáticos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 0,75/20,5; 1,07/19,7; 1,15/29,5; 1,38/27,3), quatro grupos metila ligados a carbonos olefínicos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,60/18,2; 1,62/25,8; 1,67/25,8; 1,72/18,0), um grupo metila ligado a um anel aromático ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2,47/19,1), seis grupos metilênicos, um grupo metino alifático ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,68/48,4), um grupo oximetino ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4,58/89,0), oito carbonos olefínicos ou aromáticos não protonados, dois carbonos aromáticos ligados a oxigênio (δ 160,8 e 156,3) além de um carbono carbinólico quaternário (δ 77,0).

Dos 33 sinais observados, 23 também estavam de acordo com aqueles que caracterizam o composto ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico, isolado anteriormente das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* (MOTA et al., 2009) e descrito no presente trabalho como substância **4**. Assim, os 10 sinais adicionais foram corroborados como pertencentes à uma porção monoterpêica. Adicionalmente, os espectros gHMBC de **2.1** e **2.2** apresentaram correlação entre H-2''' e o carbono carbonílico confirmando a função éster. Análises subsequentes dos espectros gHMQC, gHMBC e gCOSY permitiram a identificação do monoterpene em questão como fenchol. Experimentos NOESY 1D indicaram que todos os compostos possuem H-2''' (δ 4,58) na posição *exo* e o grupo cromano na posição *endo* do núcleo fenchila. Ao irradiar H-2''', foi observado NOE positivo para -CH₃-8''' (δ 1,07), -CH₃-9''' (δ 0,75) e H-10''' (δ 1,15), além de H-7''' (δ 1,59) (Figura 46, pág. 76). Dessa forma, existiam duas possibilidades de configuração absoluta para o grupo fenchila: (1'''*R*,2'''*R*,4'''*S*) e (1'''*S*,2'''*S*,4'''*R*).

De maneira análoga aos compostos **1.1-1.4**, os experimentos de RMN de ^1H permitiram a identificação de um anel aromático totalmente substituído com a presença de uma hidroxila em δ 11,8 (1H, s), uma metila em δ 2,47 (3H, s) e um grupo isopentenílico em C-8, caracterizado pelos sinais em δ_{Ha} 3,39 (1H, dd, $J = 6,5$ e $15,0$ Hz), δ_{Hb} 3,25 (1H, dd, $J = 6,5$ e $15,0$ Hz) e δ 5,01 (1H, t, $6,5$ Hz) referentes a H-1'' e H-2'', respectivamente, além dos sinais em δ 1,62 (3H, sl) e δ 1,72 (3H, sl) atribuídos aos

grupos metílicos H-4'' e H-5'', respectivamente. Ligados a C-2, foram identificados um grupo metílico em δ 1,38 (3H, s) referente a H-9 e uma unidade isopentadienílica ligada através de C-1', caracterizada pelos sinais em δ 5,45 (1H, d, $J = 15,5$ Hz), δ 6,22 (1H, dd, $J = 11,0$ e $15,5$ Hz) e δ 5,66 (1H, d, $J = 11,0$ Hz) referentes a H-1', H-2' e H-3', respectivamente. Os grupos metílicos dessa unidade foram confirmados a partir dos sinais em δ 1,60 (3H, s) e δ 1,67 (3H, s), atribuídos a H-5' e H-6', respectivamente. A ausência da insaturação entre C-3 e C-4 confirmou-se pelos sinais em δ_{Ha} 1,88 (1H, ddd, $J = 5,5; 5,5$ e $13,0$ Hz), δ_{Hb} 1,74 (1H, m), δ_{Ha} 2,64 (1H, ddd, $J = 5,5, 5,5$ e $17,5$ Hz) e δ_{Hb} 2,44 (1H, m), referentes a H-3 e H-4, respectivamente.

Por fim, como será abordado no próximo capítulo, a presença de uma banda de absorção no IV em 1650 cm^{-1} , comum a todos os compostos, reforça o assinalamento de **2.1** e **2.2** como ésteres. Assim, **2.1** e **2.2** foram identificados como estereoisômeros do 3,4-dihidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxilato de fenchila. As principais correlações observadas nos experimentos *g*HMBC, *g*COSY e NOE são apresentadas na figura 37 (pág. 66). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados na tabela 3 (pág. 67). Essa é a primeira vez que esses compostos são descritos na literatura (BATISTA et al., 2011a) e os dados espectroscópicos e espectrométricos estão de acordo com aqueles descritos para ésteres de monoterpênos (AHMED et al., 2008).

Figura 37 - Algumas correlações observadas nos experimentos *g*HMBC (H→C), ^1H - ^1H COSY e NOE comuns aos compostos **2.1** e **2.2**

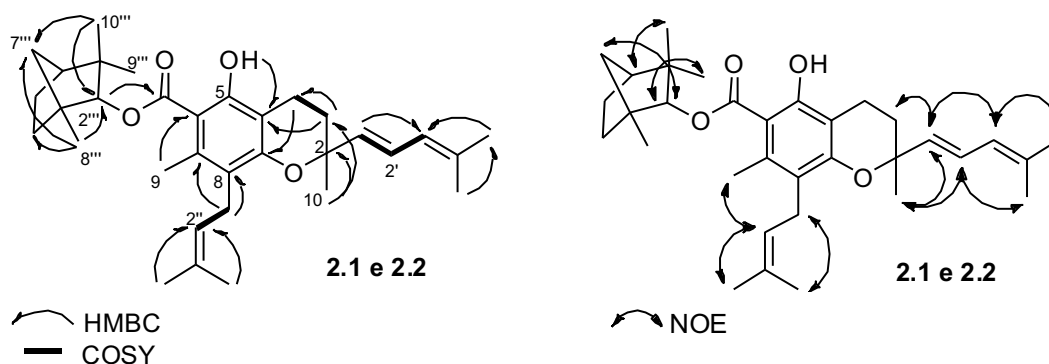


Tabela 3 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para **2.1** e **2.2** em CDCl_3

No.	2.1		2.2	
	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)
2	77,0	–	77,0	–
3(a)	31,5	1,86 ddd 5,5, 5,5, 13,0	31,5	1,85 m
(b)		1,74 m		1,71 m
4(a)	17,0	2,64 ddd 5,5, 5,5, 17,5	17,2	2,64 ddd 5,5, 5,5, 17,0
(b)		2,44 m		2,45 m
4a	106,9	–	106,5	–
5	160,1	–	160,1	–
6	105,0	–	104,5	–
7	136,8	–	136,5	–
8	120,5	–	120,0	–
8a	156,3	–	156,3	–
9	19,1	2,47 s (3H)	18,8	2,47 s (3H)
10	27,3	1,38 s (3H)	26,8	1,37 s (3H)
1'	133,7	5,45 d 15,5	133,4	5,49 d 15,5
2'	125,2	6,22 dd 11,0, 15,5	125,2	6,24 dd 11,0, 15,5
3'	124,4	5,66 d 11,0	124,2	5,70 d 11,0
4'	135,4	–	135,2	–
5'	25,8	1,67 s (3H)	25,6	1,68 s (3H)
6'	18,2	1,60 s (3H)	17,8	1,61 s (3H)
1''(a)	24,9	3,39 dd 6,5, 15,0	24,9	3,37 dd 6,5, 15,0
(b)		3,25 dd 6,5, 15,0		3,26 dd 6,5, 15,0
2''	123,1	5,01 tl 6,5	123,1	5,03 tl 6,5
3''	130,8	–	130,5	–
4''	25,8	1,62 sl (3H)	25,6	1,61 sl (3H)
5''	18,0	1,72 sl (3H)	17,4	1,72 sl (3H)
1'''	48,3	–	48,2	–
2'''	89,0	4,58 d 2,0	89,0	4,60 d 2,5
3'''	39,6	–	39,2	–
4'''	48,4	1,68 m	48,2	1,70 m
5'''	25,7	1,20 m (2H)	25,0	1,19 m (2H)
6'''	27,5	1,80 m (2H)	27,0	1,80 m (2H)
7'''	41,5	1,58 m	41,5	1,60 m
		1,15 m		1,18 m
8'''	19,7	1,07 s (3H)	19,7	1,06 s (3H)
9'''	20,5	0,75 s (3H)	20,2	0,76 s (3H)
10'''	29,4	1,15 s (3H)	29,5	1,15 s (3H)
C=O	173,2	–	172,8	–
O-H	–	11,8 s	–	11,8 s

^a125 MHz ^b500 MHz. Deslocamentos químicos em ppm.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1

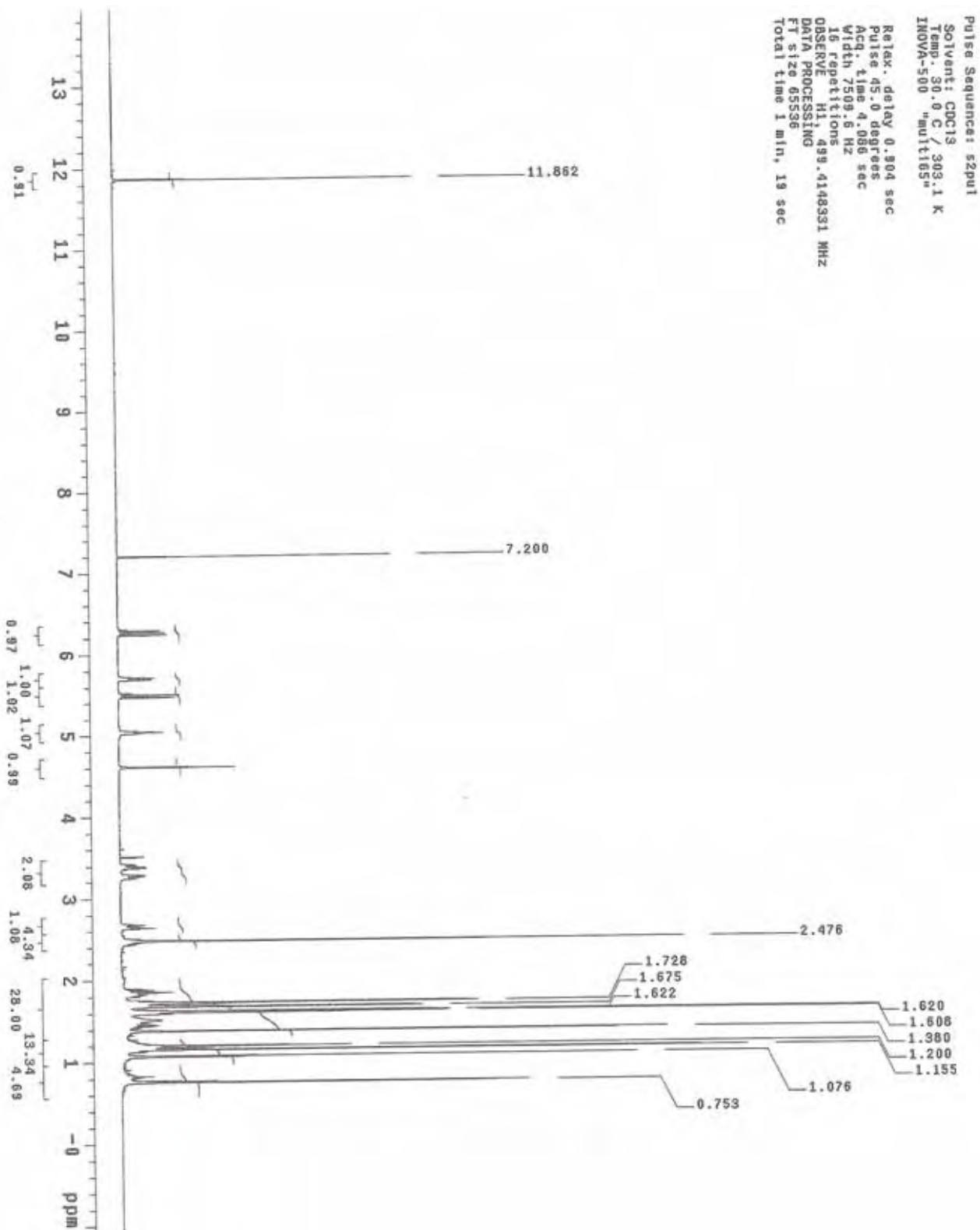


Figura 39 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1

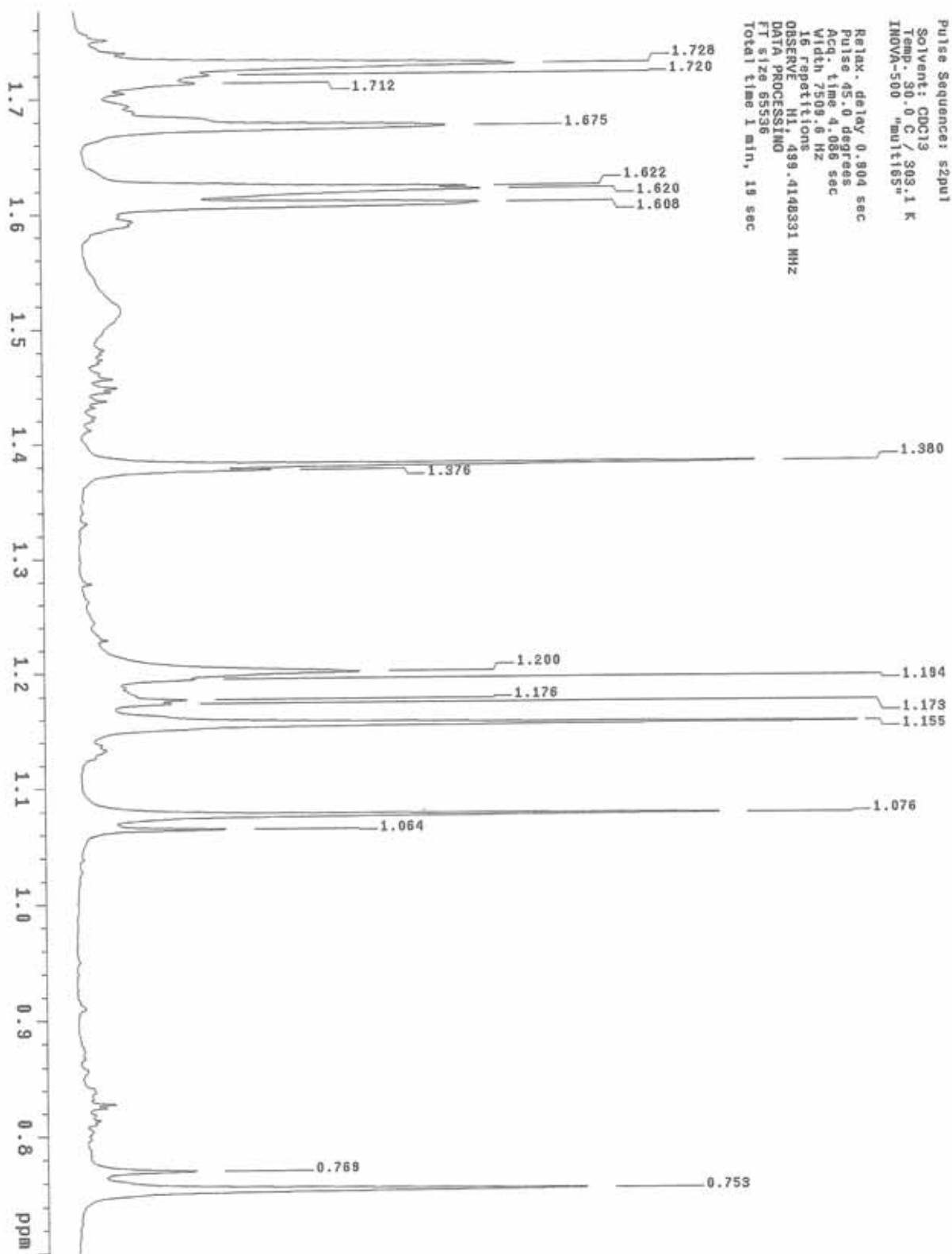


Figura 40 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1

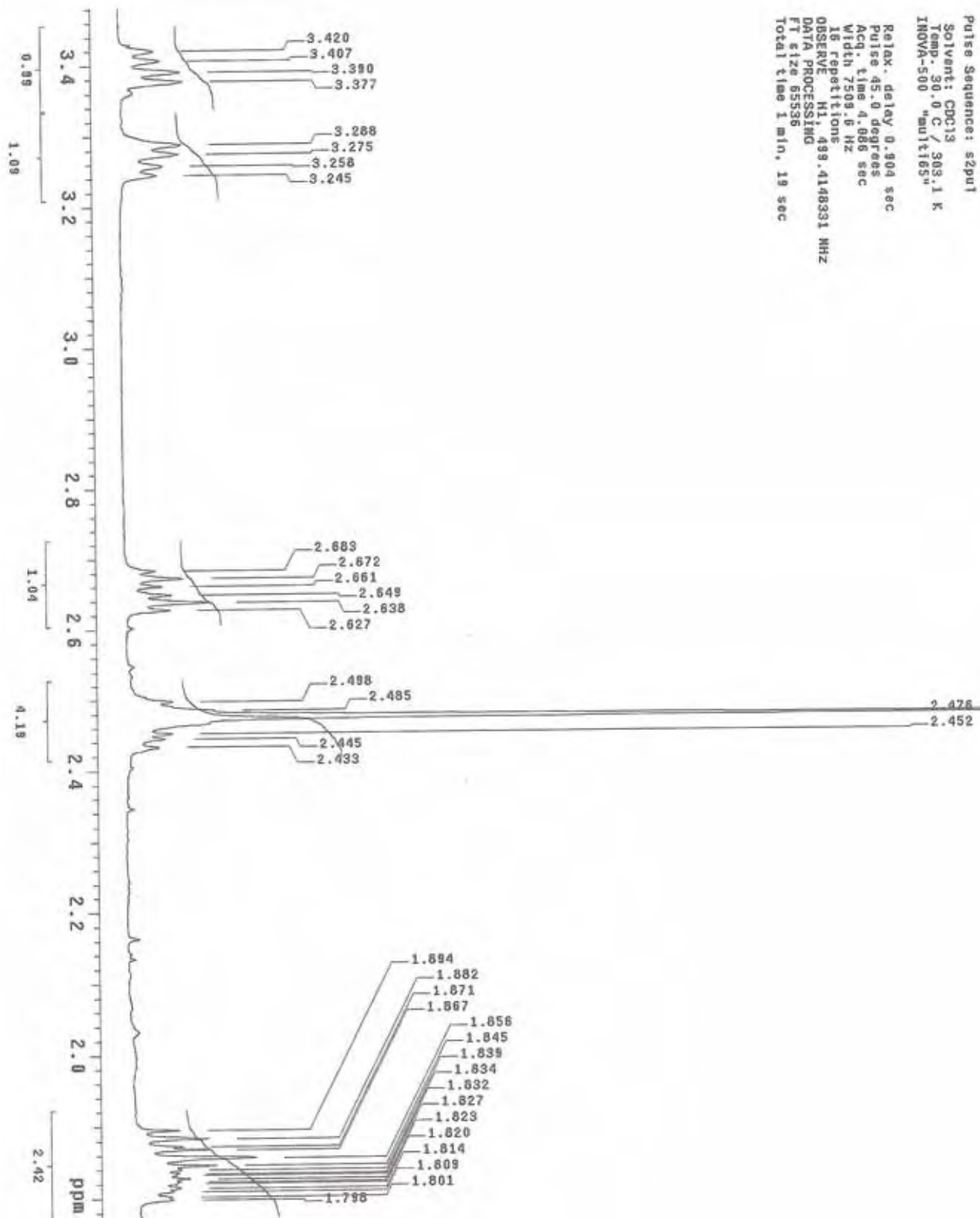


Figura 41 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.1

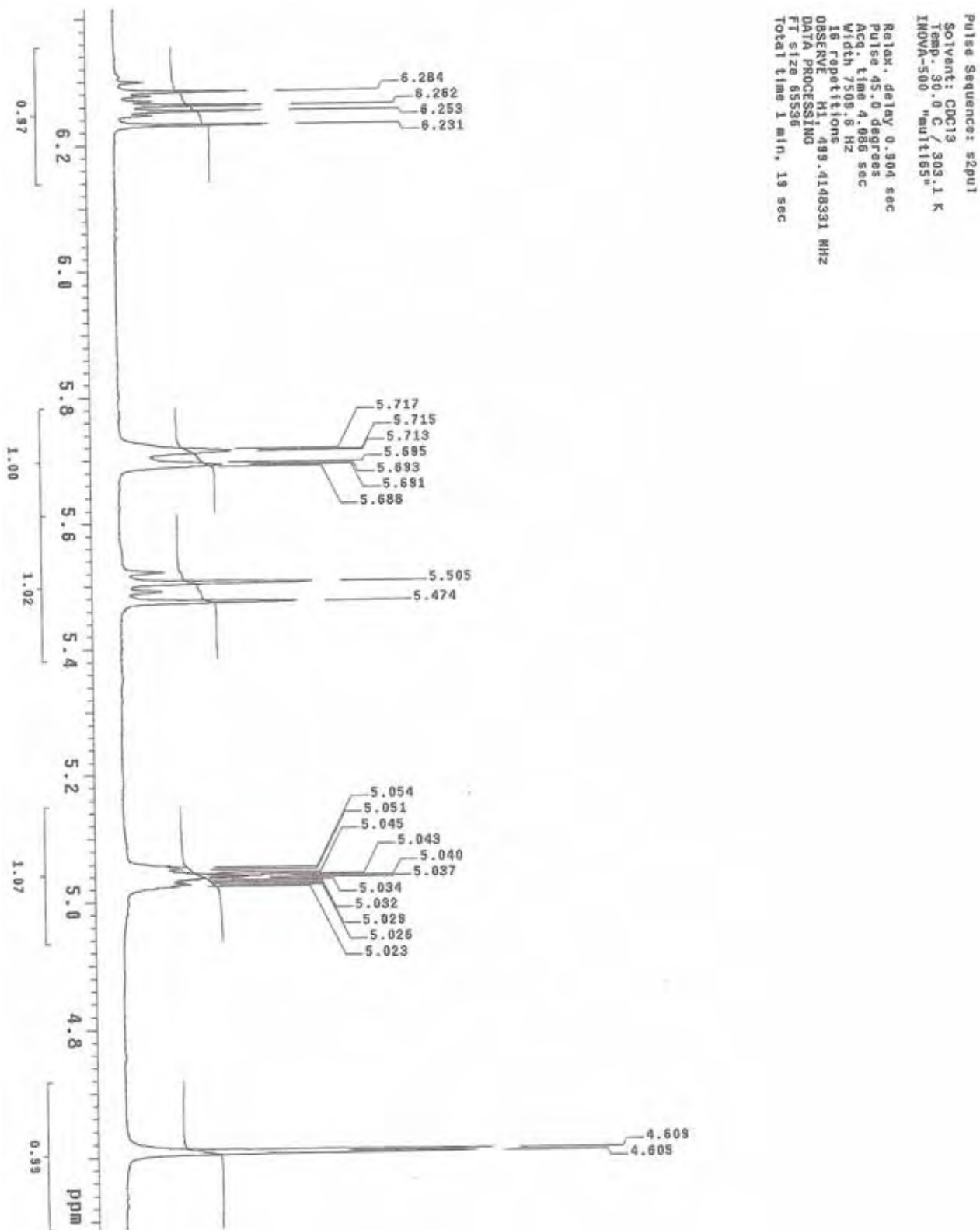


Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2.1

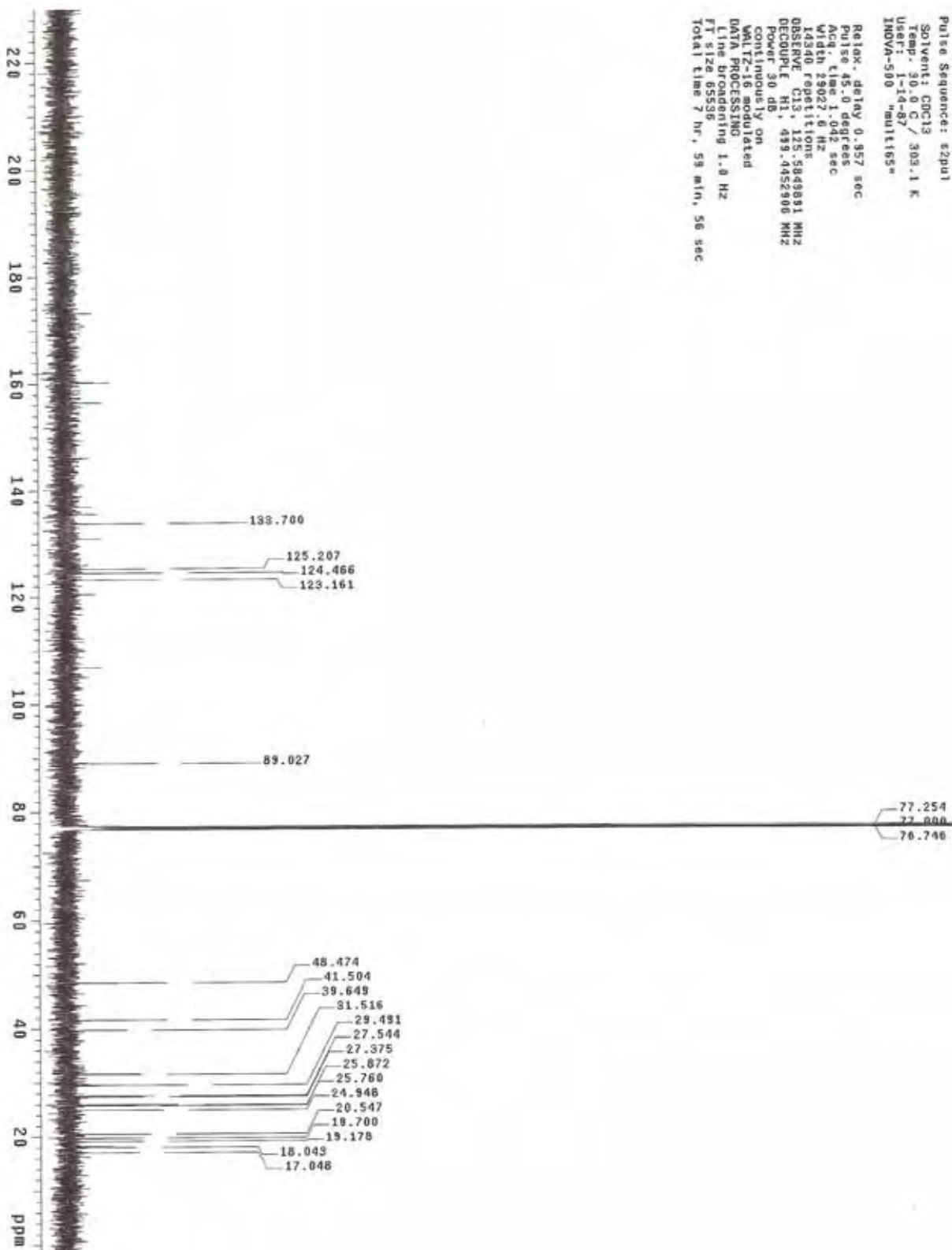


Figura 43 - Espectro gHMQC (CDCl₃, 500 MHz) de 2.1

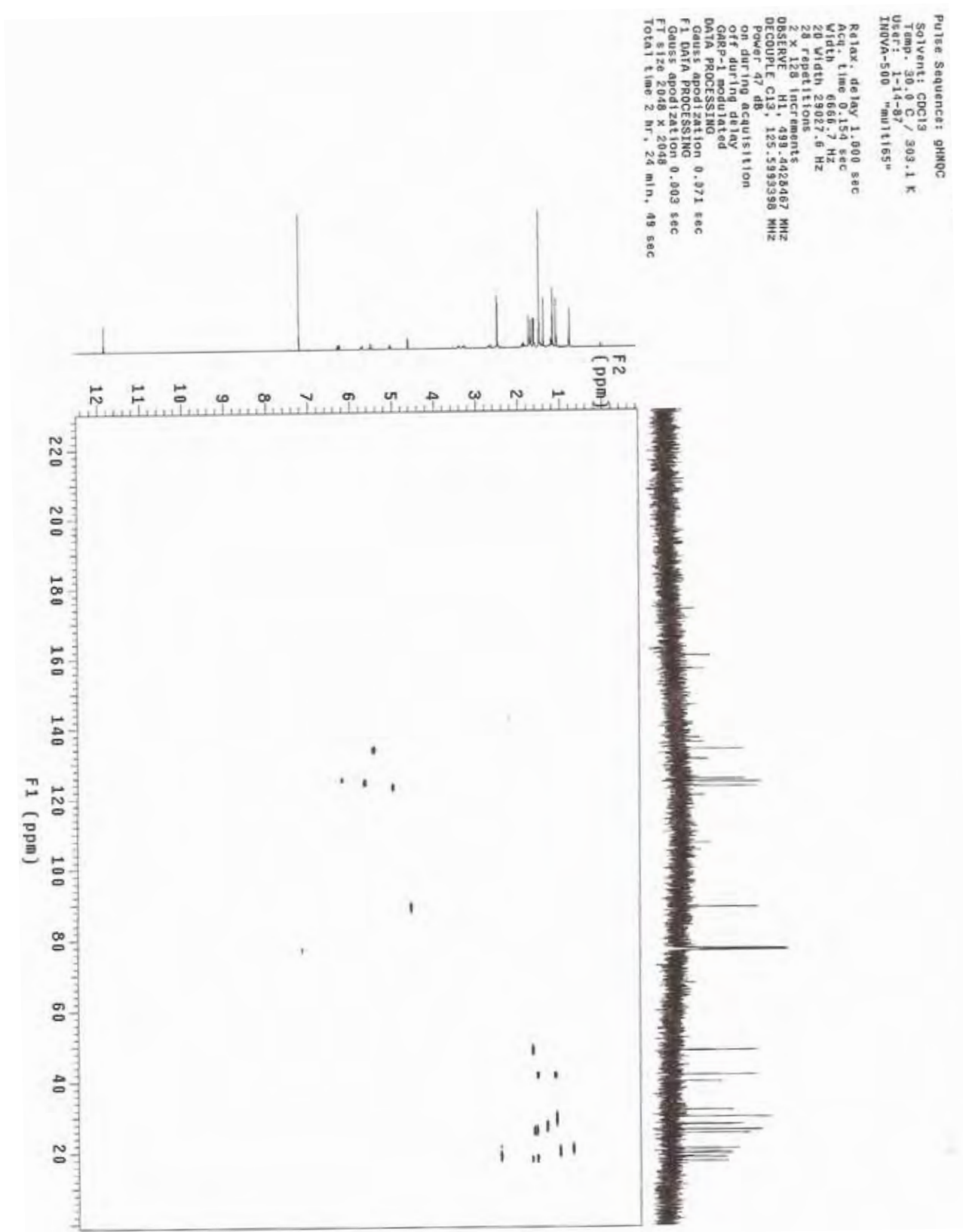


Figura 44 - Espectro gHMBC (CDCl₃, 500 MHz) de 2.1

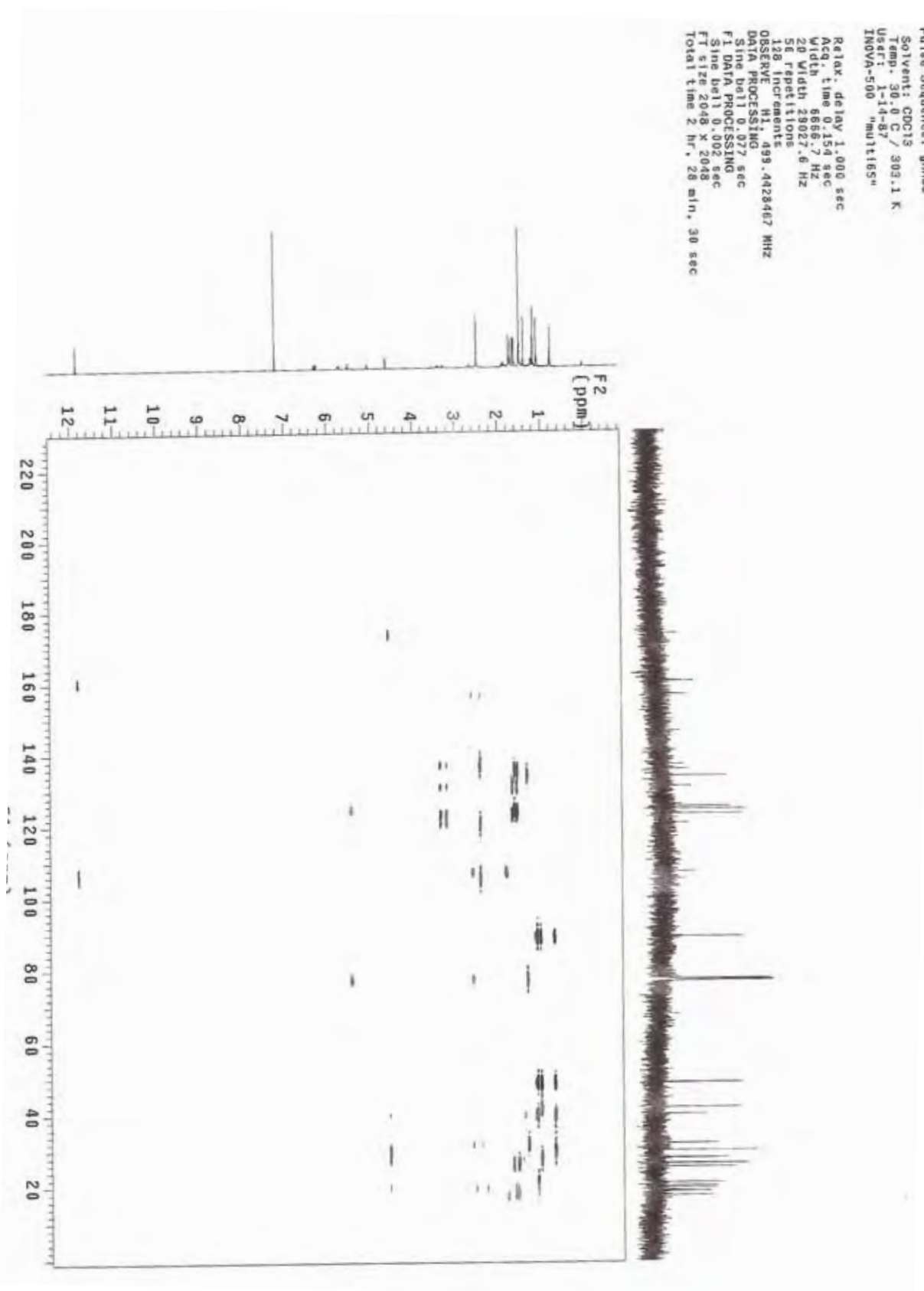


Figura 45 - Espectro gCOSY (CDCl₃, 500 MHz) de 2.1

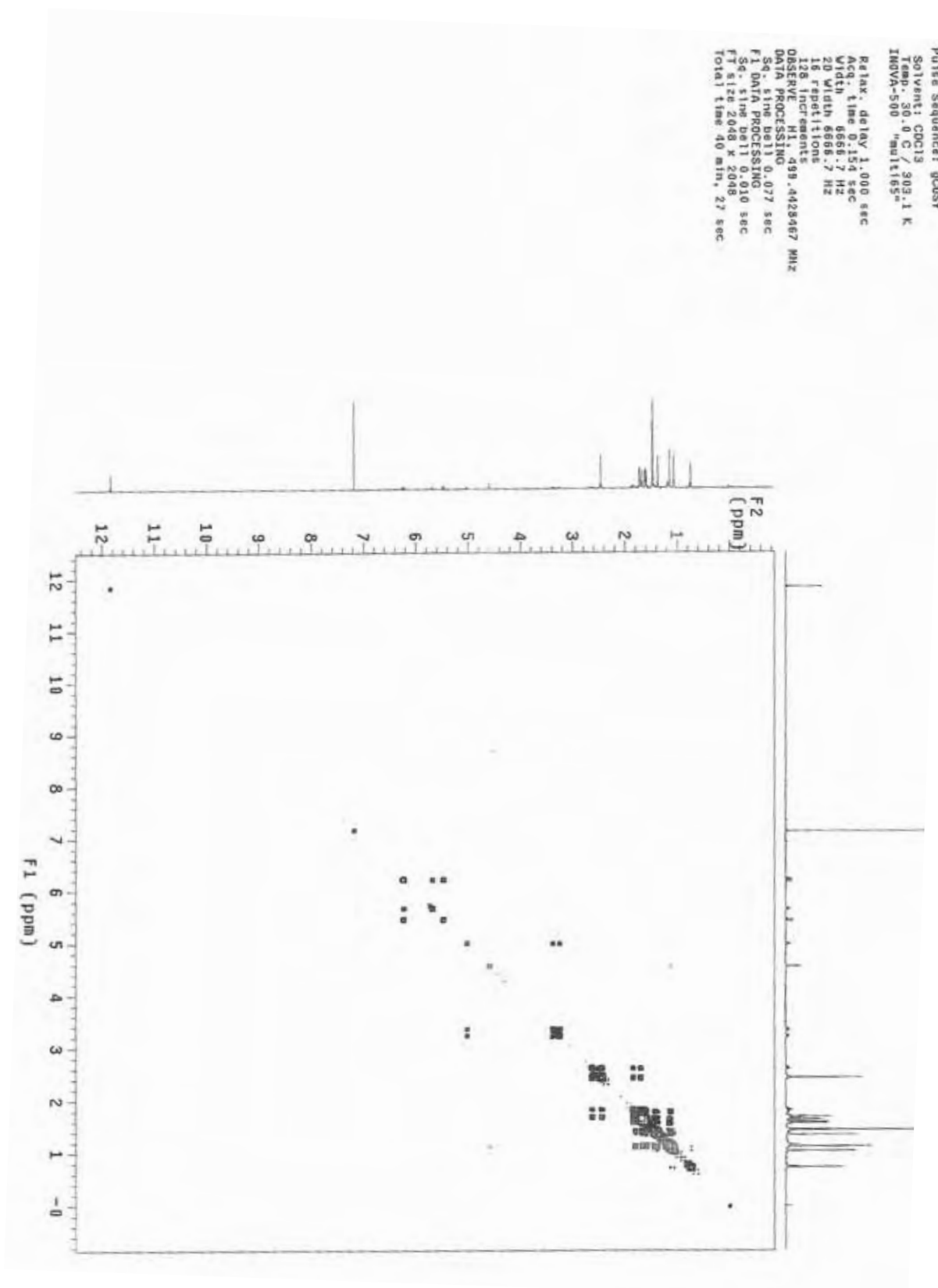


Figura 46 - Espectro NOESY 1D de 2.1

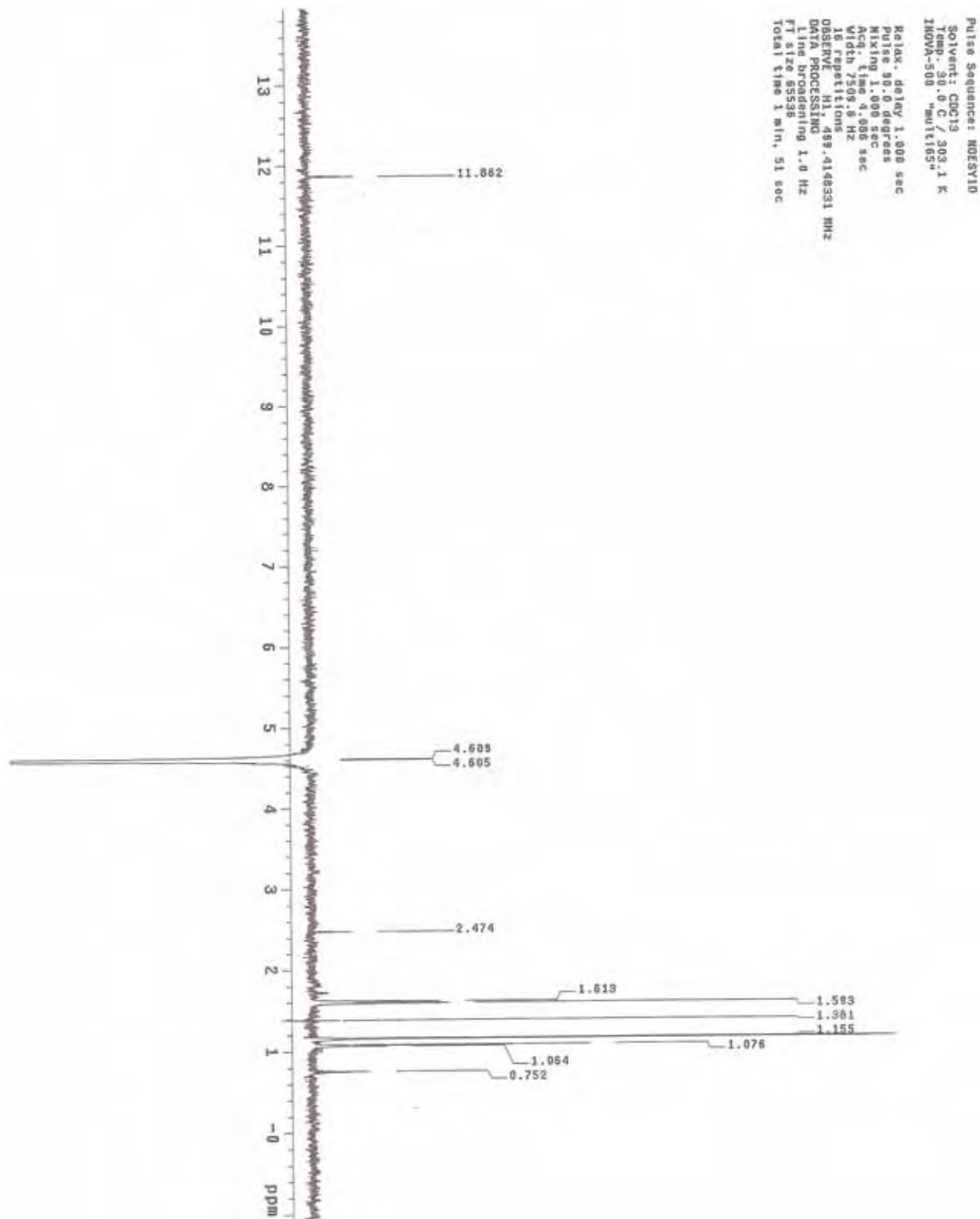


Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, e íons filhos de **2.1** no modo positivo

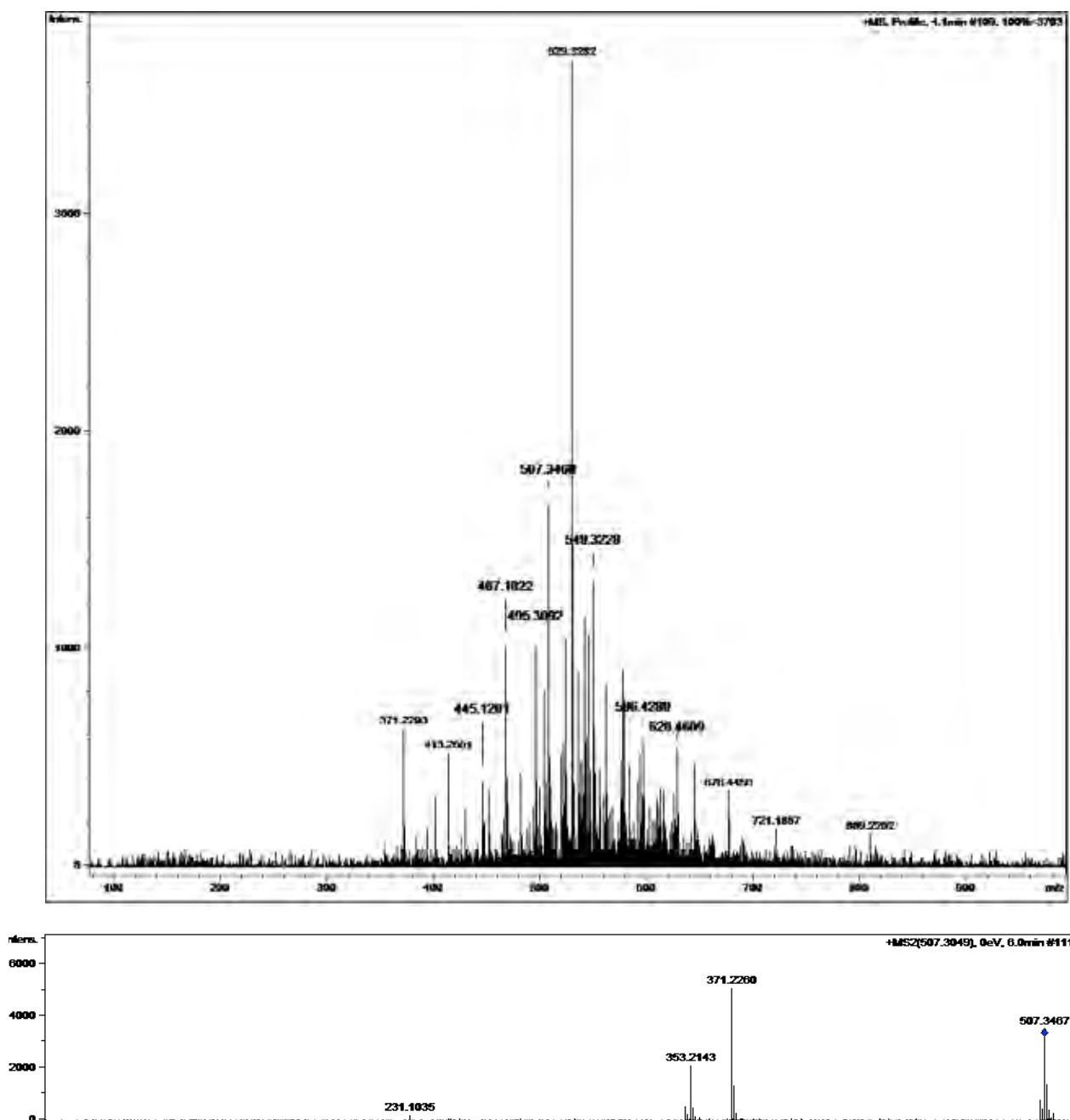


Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 2.2

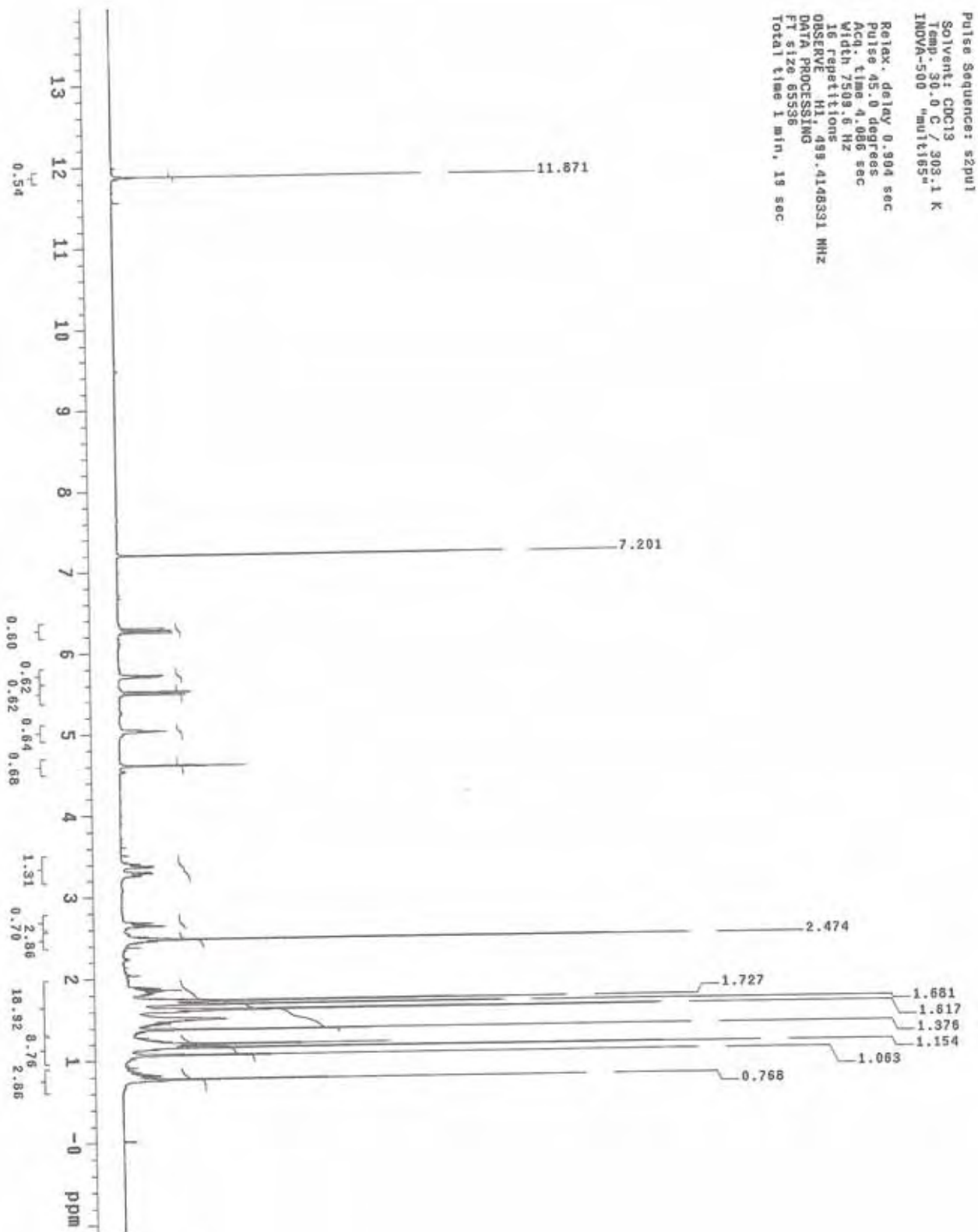


Figura 49 - Mapa de contorno gHMQC (CDCl₃, 500 MHz) de **2.2**

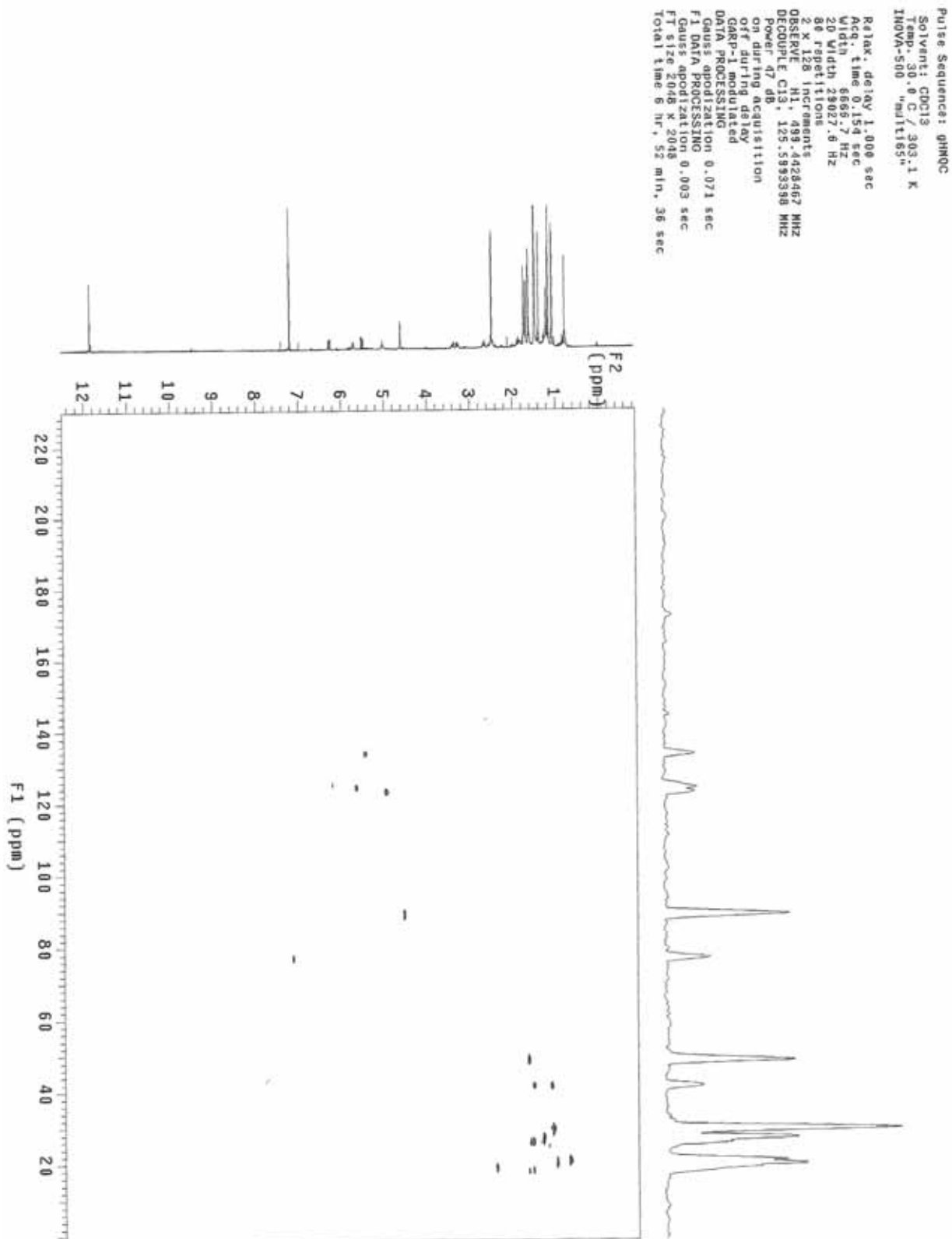
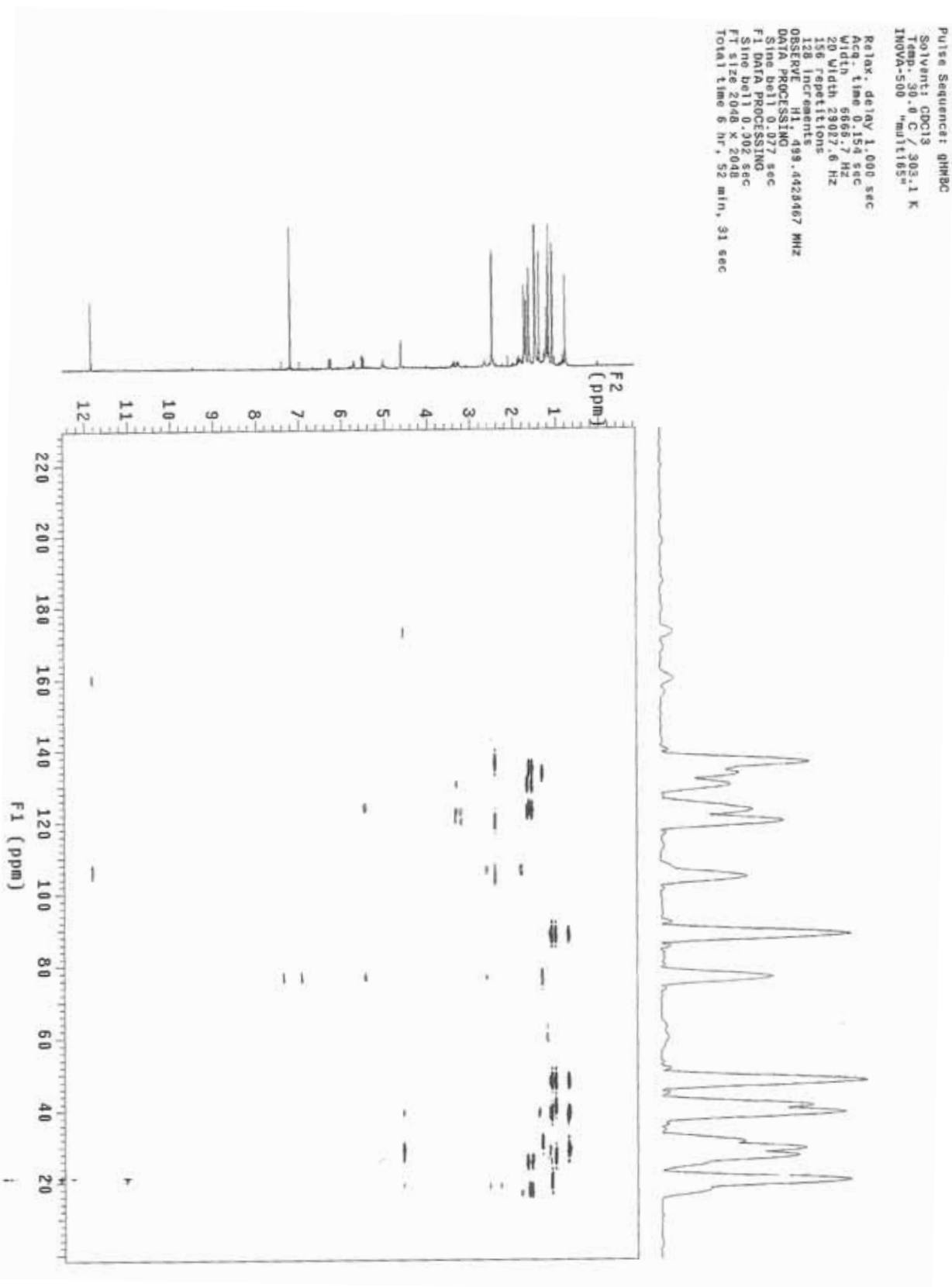
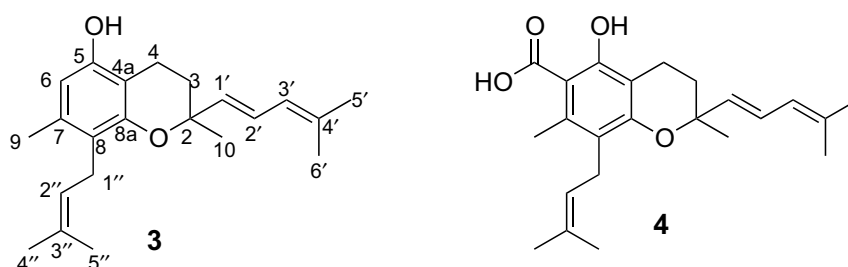


Figura 50 - Mapa de contorno gHMBC (CDCl₃, 500 MHz) de 2.2



1.5.1.3 Identificação estrutural de 3 e 4

As substâncias **3** e **4** foram isoladas como misturas racêmicas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto EtOH das folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*, descrito na seção 1.4.1 (pág. 30). A resolução dos racematos é descrita na seção 1.4.4 (pág. 37).



Para **3** foi proposta a estrutura da peperobtusina A, primeiramente descrita em *P. obtusifolia* por TANAKA et al. (1998) e isolada como uma mistura racêmica, a partir da mesma fonte vegetal, por MOTA et al. (2009). Para **4** foi proposta a estrutura do ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2H-1-benzopirano carboxílico, inicialmente descrito em *P. amplexicaulis* (BURKE et al., 2003) e posteriormente em *P. obtusifolia*, também na forma de racemato (MOTA et al., 2009).

As estruturas dessas moléculas são idênticas ao núcleo benzopirano proposto para os ésteres com monoterpenos descritos nas seções anteriores. A substância **4** consiste no ácido carboxílico correspondente dos ésteres **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, já a substância **3** difere de **4** apenas pela ausência de uma carboxila substituída na posição 6, o que foi evidenciado no espectro de RMN de ^1H através do sinal em δ 6,11 (1H, s) atribuído a H-6. Devido a ausência do grupo carboxílico, não se observou o sinal em δ 11,8 (1H, s) referente a hidroxila quelada em um pseudo-anel de seis membros, mas sim um singlete largo em δ 4,34 (1H, s) referente a hidroxila fenólica livre.

As estruturas propostas foram corroboradas pelos espectros de massas de alta resolução obtidos com ionização por eletrospray, no modo positivo. O composto **3** apresentou um pico correspondente à molécula protonada m/z 327,2318 $[M + H]^+$ e do seu aduto com sódio m/z 349,2137 enquanto **4** apresentou um pico correspondente ao íon molécula protonada m/z 371,2219 $[M + H]^+$, bem como do aduto com sódio m/z 393,2041. Os dados de RMN 1H e de ^{13}C estão de acordo com aqueles descritos na literatura (TANAKA et al., 1998; BURKE et al., 2003) e são apresentados na tabela 4 (pág. 82).

Tabela 4 - Dados de RNM de 1H e de ^{13}C para **3** e **4** em $CDCl_3$

No.	3		4	
	$^{13}C^a$	$^1H^b$, multipl., J (Hz)	$^{13}C^a$	$^1H^b$, multipl., J (Hz)
2	75,9	–	77,0	–
3(a)	31,5	1,83 ddd 5,5, 5,5, 12,5	31,3	1,87 m
(b)		1,70 m		1,72 m
4(a)	17,0	2,53 ddd 5,5, 5,5, 17,0	16,9	2,65 ddd 5,5, 5,5, 17,0
(b)		2,40 ddd 5,5, 5,5, 17,0		2,45 m
4a	106,0	–	106,9	–
5	151,2	–	161,0	–
6	107,0	6,11 s	103,4	–
7	134,9	–	138,5	–
8	120,0	–	121,3	–
8a	152,1	–	157,5	–
9	19,4	2,15 s (3H)	18,3	2,48 s (3H)
10	27,3	1,35 s (3H)	27,3	1,40 s (3H)
1'	133,3	5,48 d 15,5	133,3	5,49 d 15,5
2'	125,2	6,25 dd 11,0, 15,5	125,2	6,24 dd 11,0, 15,5
3'	124,3	5,68 d 11,0	124,3	5,69 d 11,0
4'	135,1	–	135,6	–
5'	25,7	1,67 s (3H)	25,8	1,68 s (3H)
6'	17,9	1,60 s (3H)	18,2	1,61 s (3H)
1''(a)	25,8	3,28 dd 7,0, 15,0	24,8	3,39 dd 6,5, 15,0
(b)		3,17 dd 7,0, 15,0		3,27 dd 6,5, 15,0
2''	123,3	5,01 tl 7,0	122,9	5,02 tl 6,5
3''	130,2	–	130,9	–
4''	25,8	1,60 sl (3H)	25,7	1,61 sl (3H)
5''	18,2	1,71 sl (3H)	18,0	1,73 sl (3H)
C=O	–	–	176,3	–
O-H	–	4,34 sl	–	11,8 s

^a125 MHz ^b500 MHz. Deslocamentos químicos em ppm.

Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3

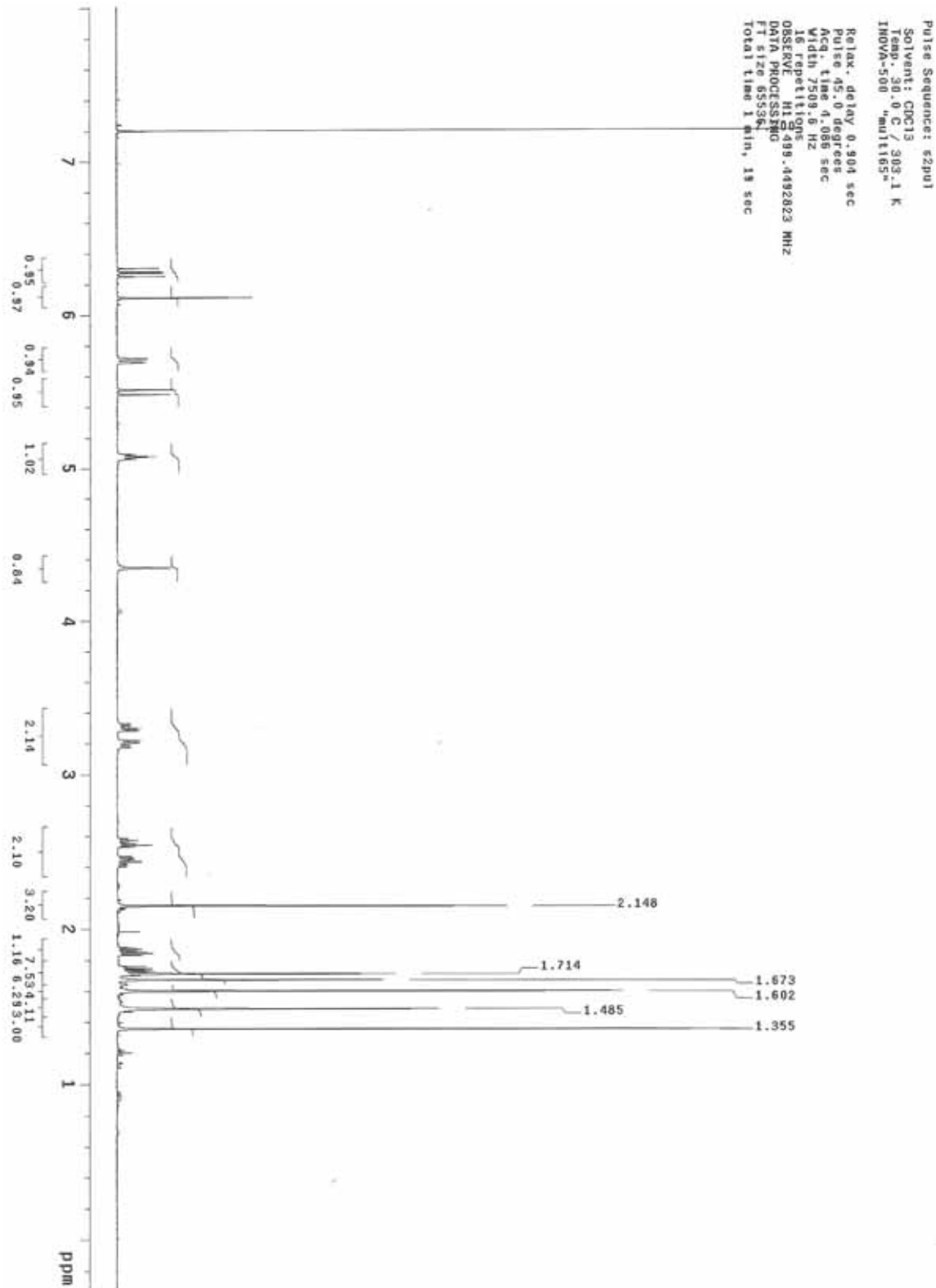


Figura 52 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 3

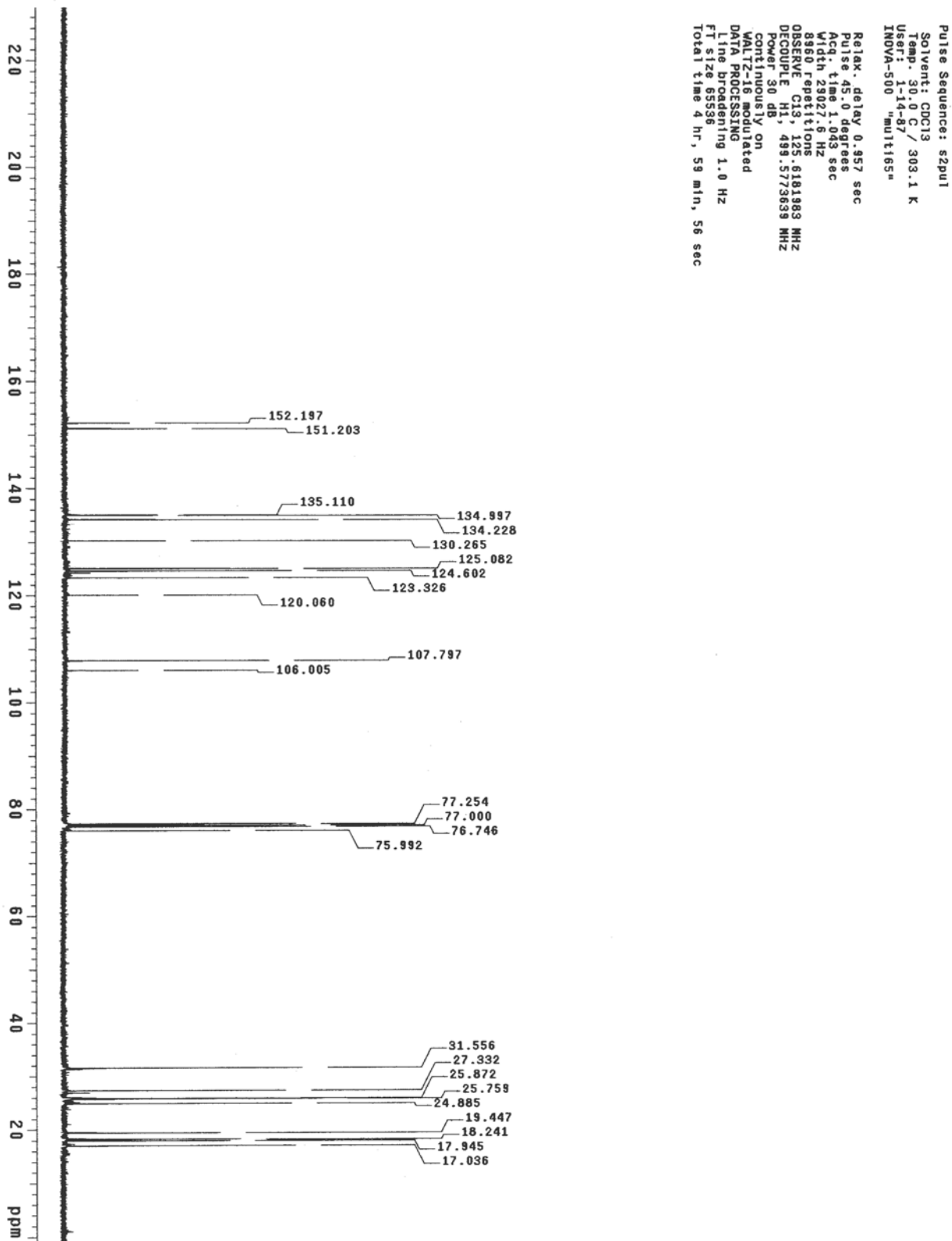


Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3.1

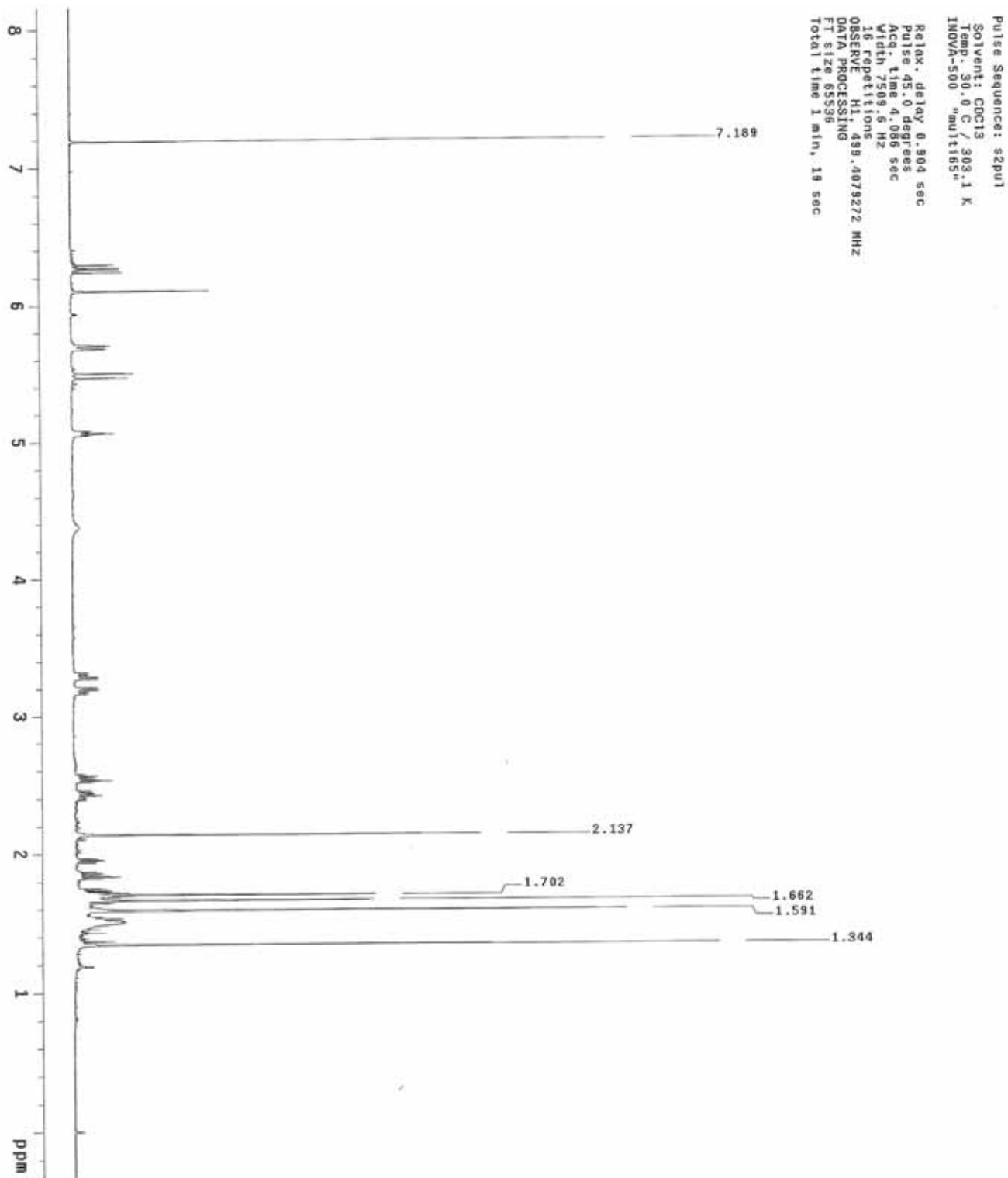


Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3.2

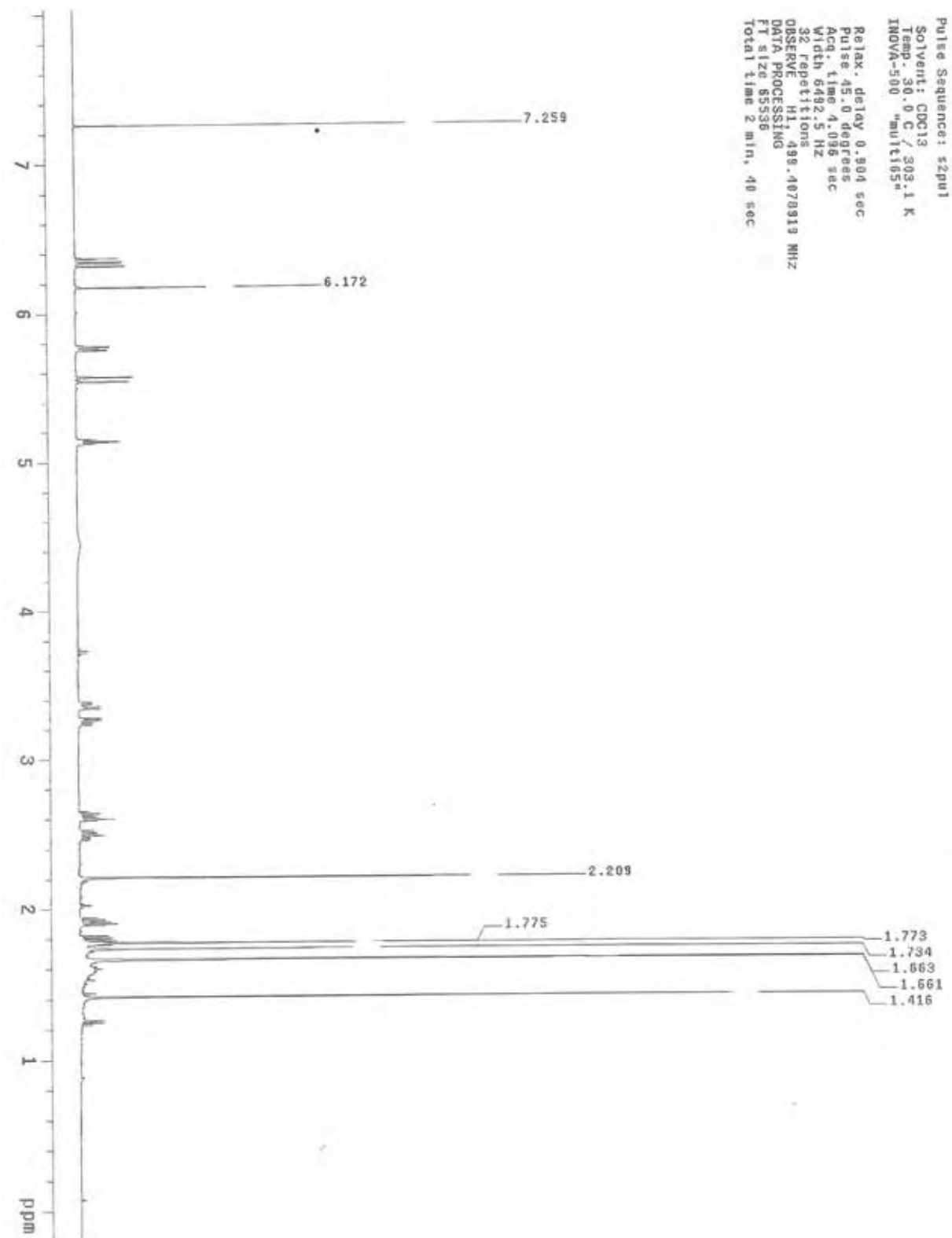


Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4

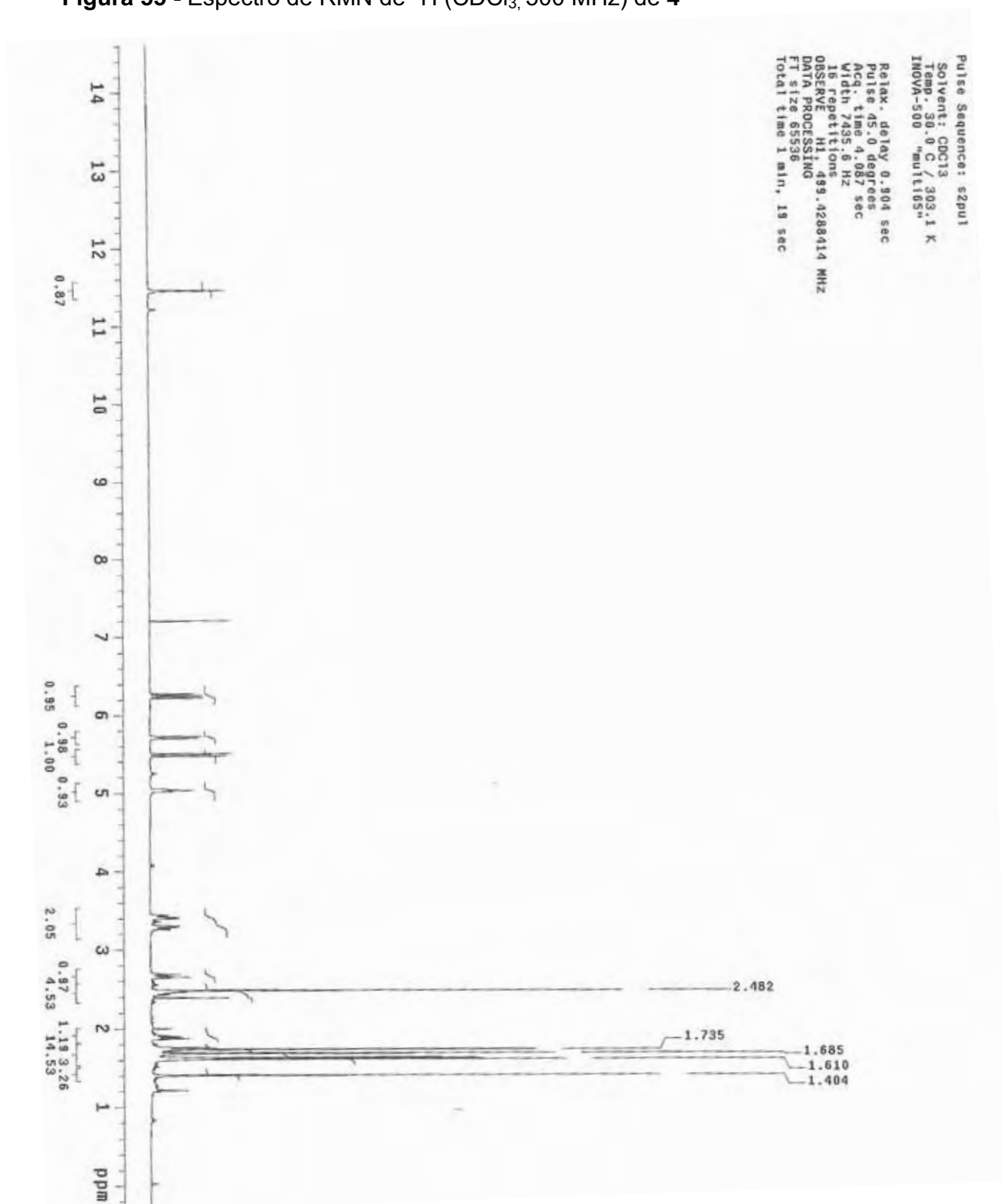


Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **4**

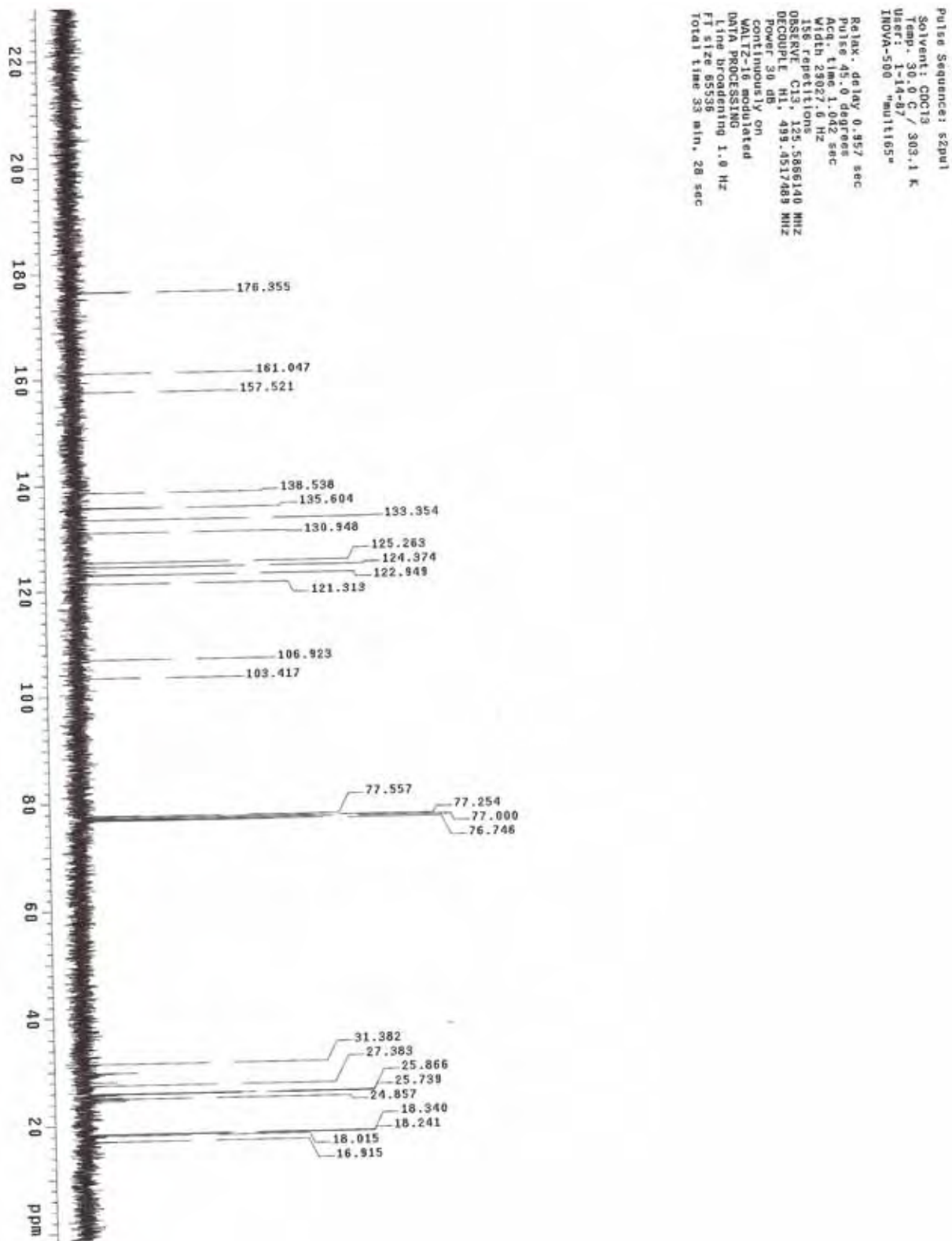


Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4.1

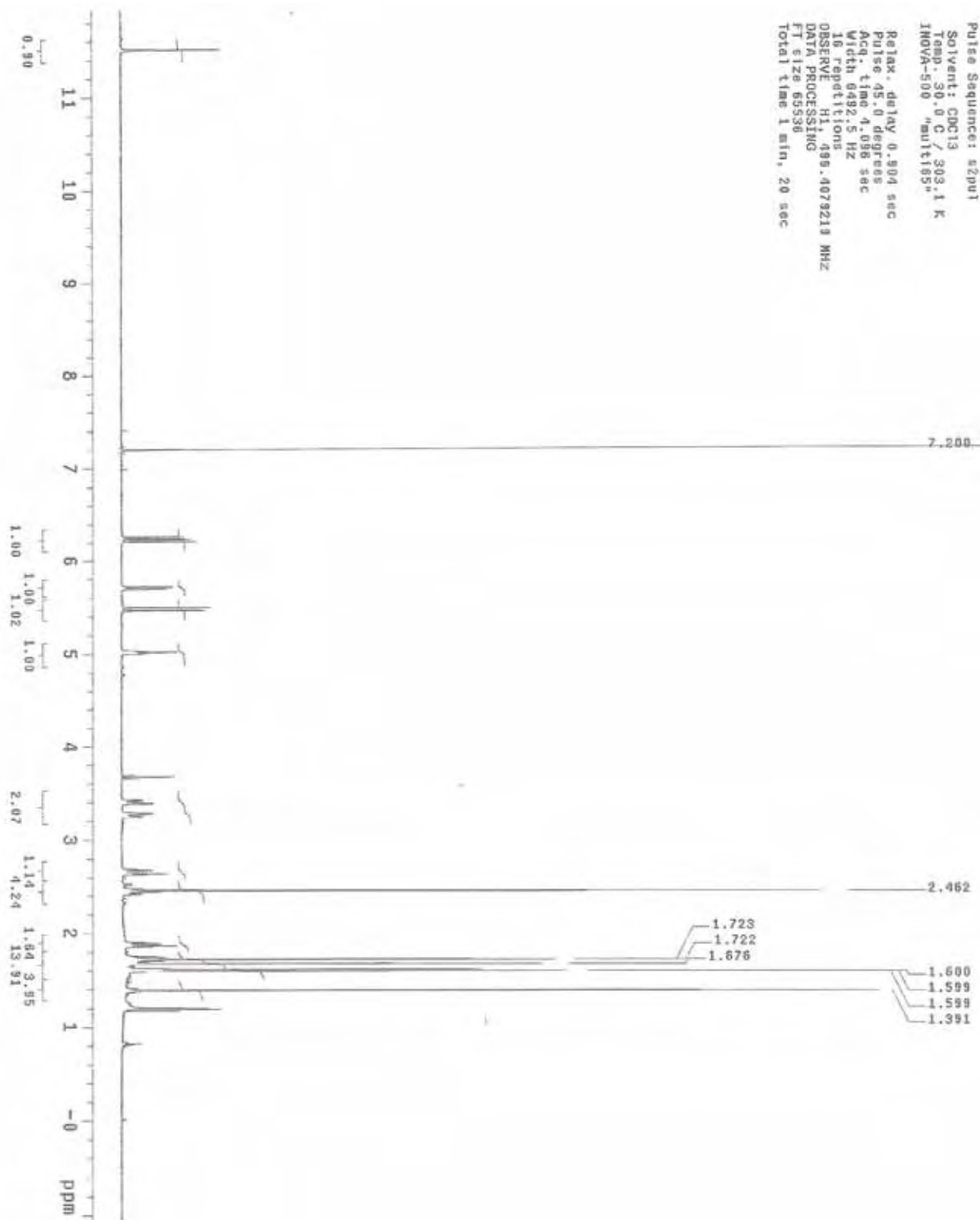


Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 4.2

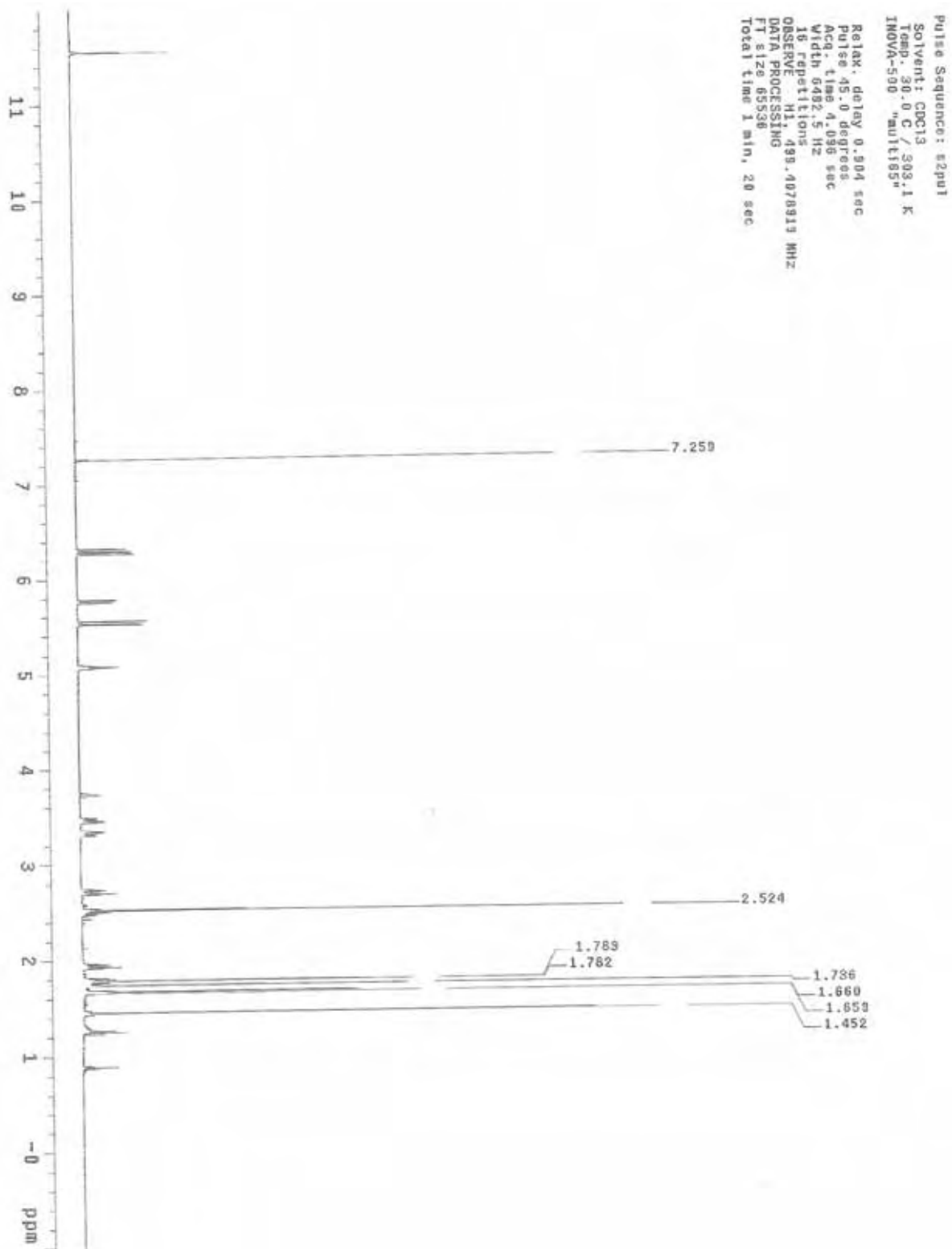


Figura 59 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de **3** no modo positivo

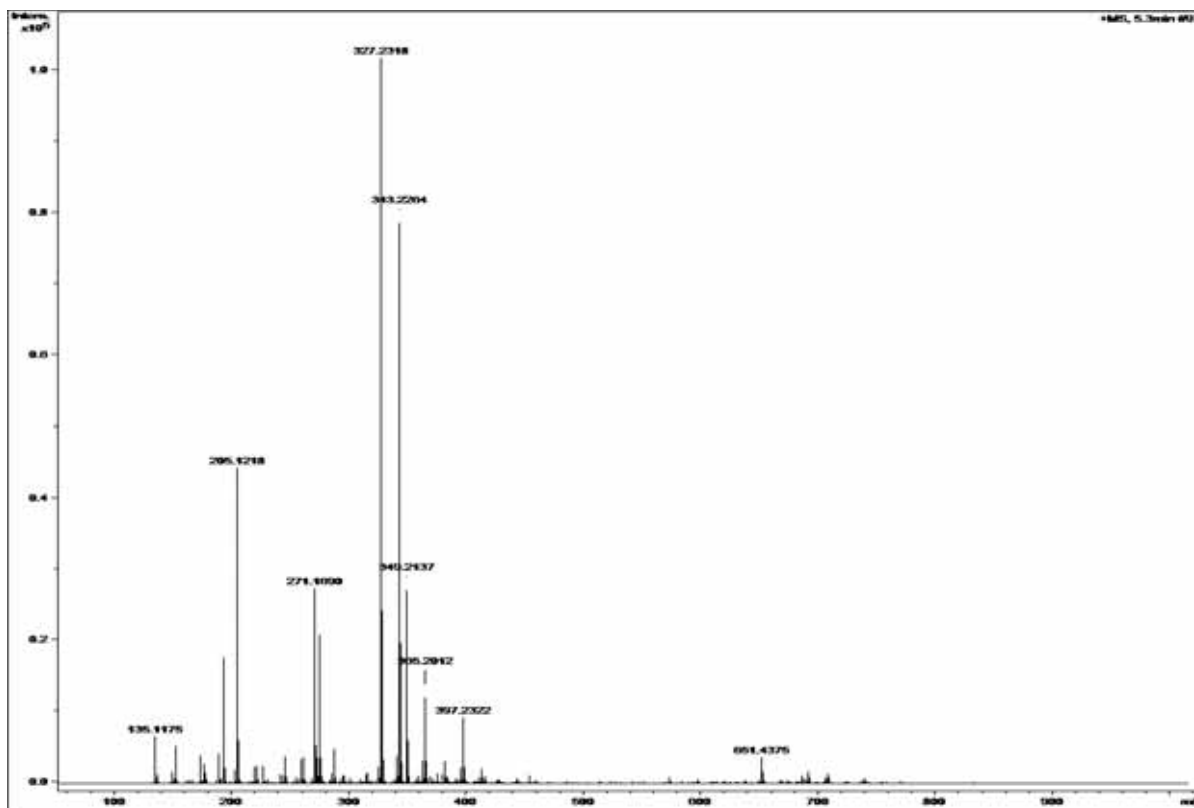
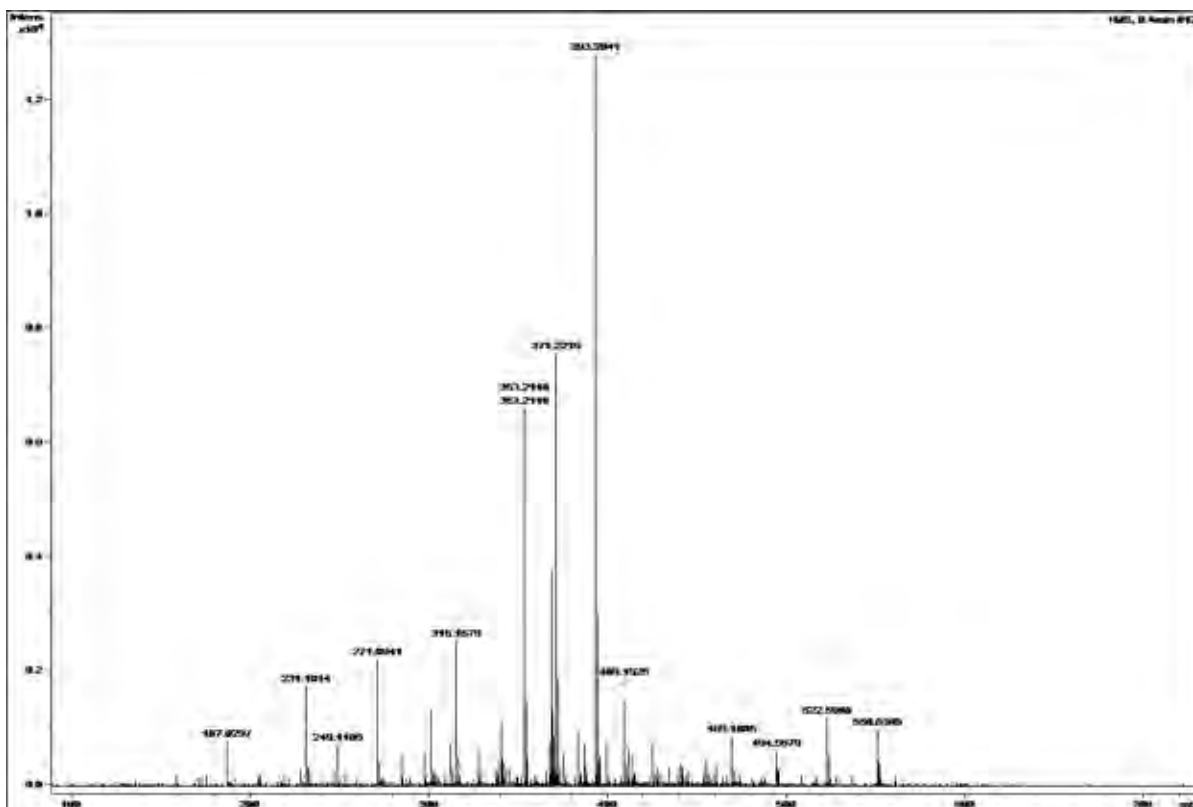
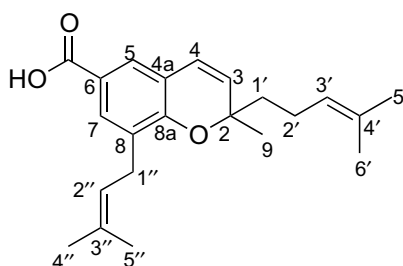


Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de **4** no modo positivo



1.5.1.4 Identificação estrutural de 5

A substância **5** foi isolada como mistura racêmica a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto EtOH dos caules de *Piper gaudichaudianum*, descrito na seção 1.4.2 (pág. 32). A resolução do racemato é descrita na seção 1.4.4 (pág. 37).



Para **5** foi proposta a estrutura do ácido 2-metil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-3-pentenil)-2*H*-cromeno carboxílico, ou ácido gaudichaudiânico (LAGO et al., 2004). Essa substância está de acordo com as características apresentadas para os benzopiranos do tipo 2*H*-cromeno. O padrão de substituição do anel aromático foi definido a partir do espectro de RMN de ^1H pela presença de dois dubletos em δ 7,52 (1H, $J = 2,0$ Hz) e δ 7,67 (1H, $J = 2,0$ Hz), com constante de acoplamento característica de acoplamento *meta*, referentes a H-5 e H-7, respectivamente. O grupo metílico ligado a C-2 e a insaturação $\Delta^{3,4}$ foram confirmados pelos sinais em δ 1,34 (3H, s) referente a H-9 e δ 5,51 (1H, $J = 10$ Hz) e δ 6,31 (1H, $J = 10$ Hz), referentes a H-3 e H-4, respectivamente. O substituinte do anel aromático foi identificado como um grupo isopentenílico caracterizado pelos sinais em δ 3,22 (2H, d, $J = 6,0$ Hz) e δ 5,22 (1H, tl, 6,0 Hz) referentes a H-1'' e H-2'', respectivamente, além dos sinais em δ 1,66 (6H, sl) atribuído aos grupos metílicos H-4'' e H-5''. Foi também observado a presença de uma segunda unidade isoprênica caracterizada pelos sinais em δ 1,72 (2H, m), δ 2,05 (2H, m) e δ 5,03 (1H, tl, 6,0) referentes a H-1', H-2' e H-3', respectivamente. Os grupos metílicos dessa unidade foram confirmados a partir dos sinais em δ 1,50 (3H, sl) e δ 1,60 (3H, sl), atribuídos a H-5' e H-6', respectivamente.

Através do espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença do sinal em δ 172,1 típico da carbonila de ácido carboxílico, presente em C-6. Esse espectro ainda confirmou a presença das unidades isoprênicas, sendo que os sinais em δ 41,8; 22,7; 123,8; 131,8; 17,5 e 25,6 foram atribuídos respectivamente a C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6' e os sinais em δ 28,1; 121,9; 132,6; 25,7 e 17,8 foram atribuídos a C-1'', C-2'', C-3'', C-4'' e C-5'', respectivamente. O núcleo 2*H*-cromeno foi evidenciado pelos sinais em δ 79,9; 129,4; 122,5; 120,1; 126,7; 120,7; 131,8; 128,9 e 155,9 atribuídos a C-2, C-3, C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7 e C-8a, respectivamente. A estrutura proposta foi corroborada pelos espectros de massas de alta resolução obtido com ionização por eletrospray, no modo positivo. O composto **5** apresentou um pico correspondente ao íon molécula protonada m/z 341,2116 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e do aduto com sódio m/z 363,1937.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C estão de acordo com aqueles descritos na literatura (LAGO et al., 2004) e são apresentados na tabela 5 (pág. 94).

Tabela 5 - Dados de RNM de ^1H e de ^{13}C para **5** em CDCl_3

No.	$^{13}\text{C}^a$	5	$^1\text{H}^b$, multipl., J (Hz)
2	79,9		–
3	129,4		5,51 d 10,0
4	122,5		6,31 d 10,0
4a	120,1		–
5	126,7		7,52 d 2,0
6	120,7		–
7	131,8		7,67 d 2,0
8	128,9		–
8a	155,9		–
9	27,1		1,34 s (3H)
1'	41,8		1,72 m (2H)
2'	22,7		2,05 m (2H)
3'	123,8		5,03 tl 6,0
4'	131,8		–
5'	17,5		1,50 sl (3H)
6'	25,6		1,60 sl (3H)
1''	28,1		3,22 d 6,0
2''	121,9		5,22 tl 6,0
3''	132,6		–
4''	25,7		1,66 sl (3H)
5''	17,8		1,66 sl (3H)
C=O	172,1		–

^a125 MHz ^b500 MHz. Deslocamentos químicos em ppm.

Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5

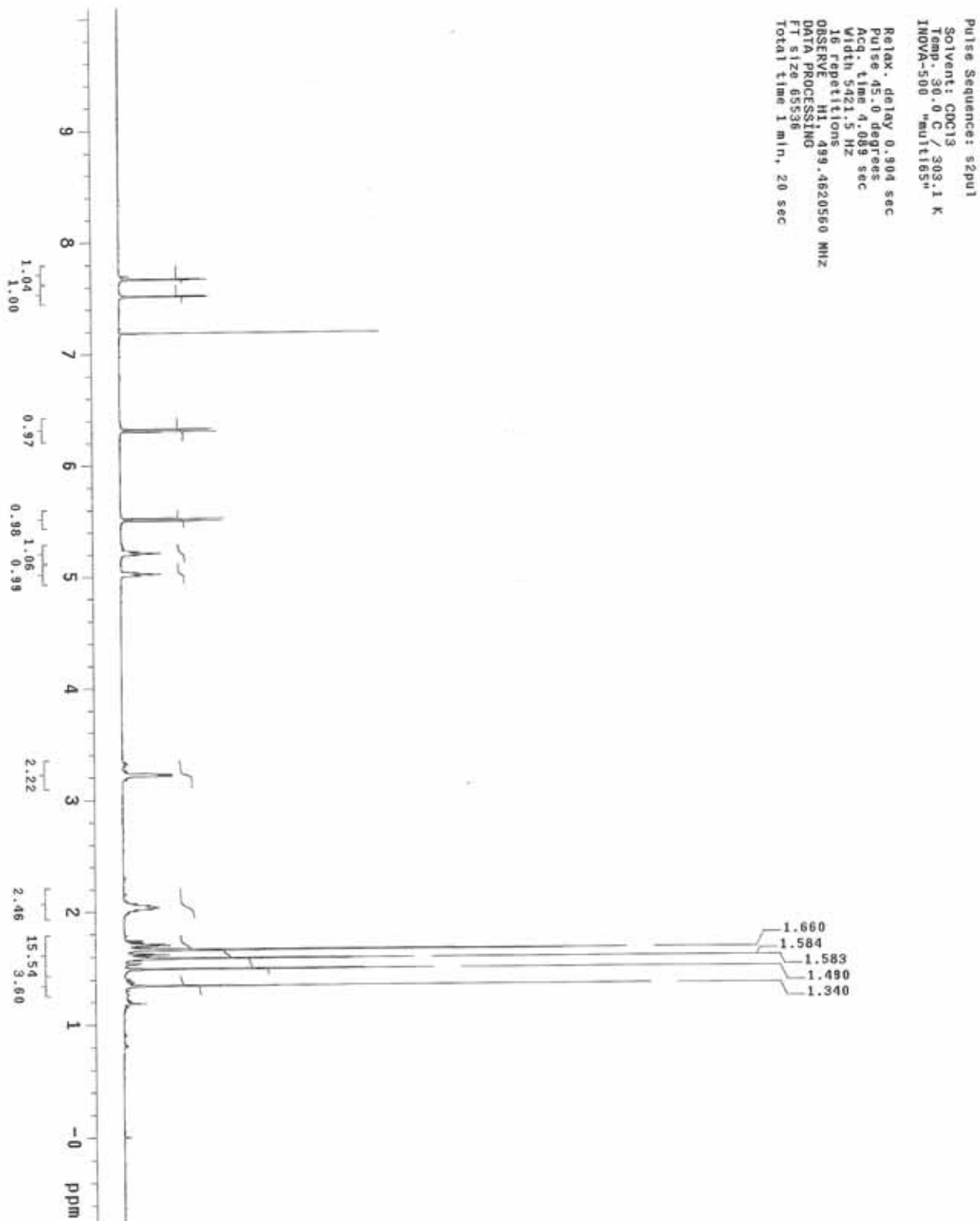


Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 5

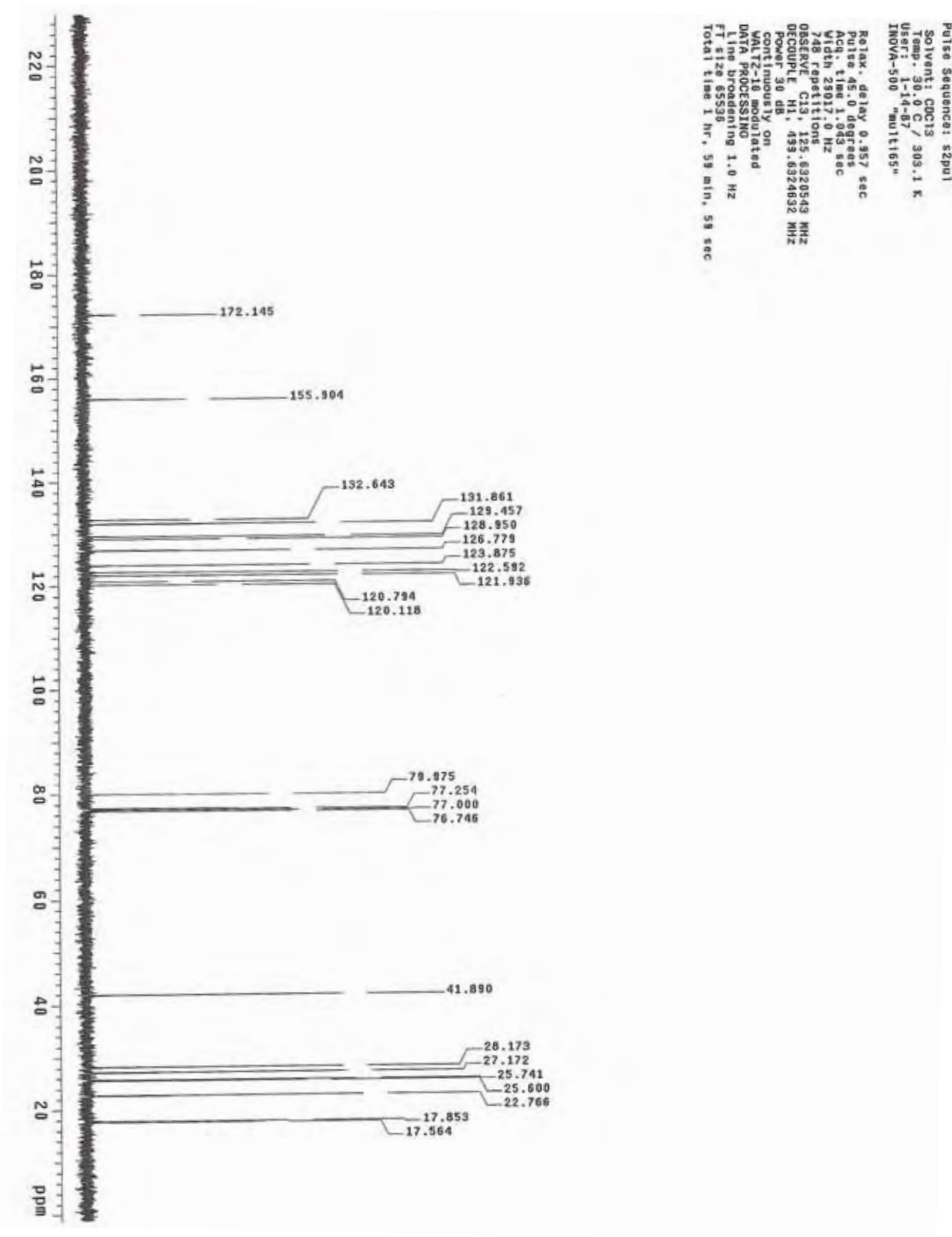


Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5.1

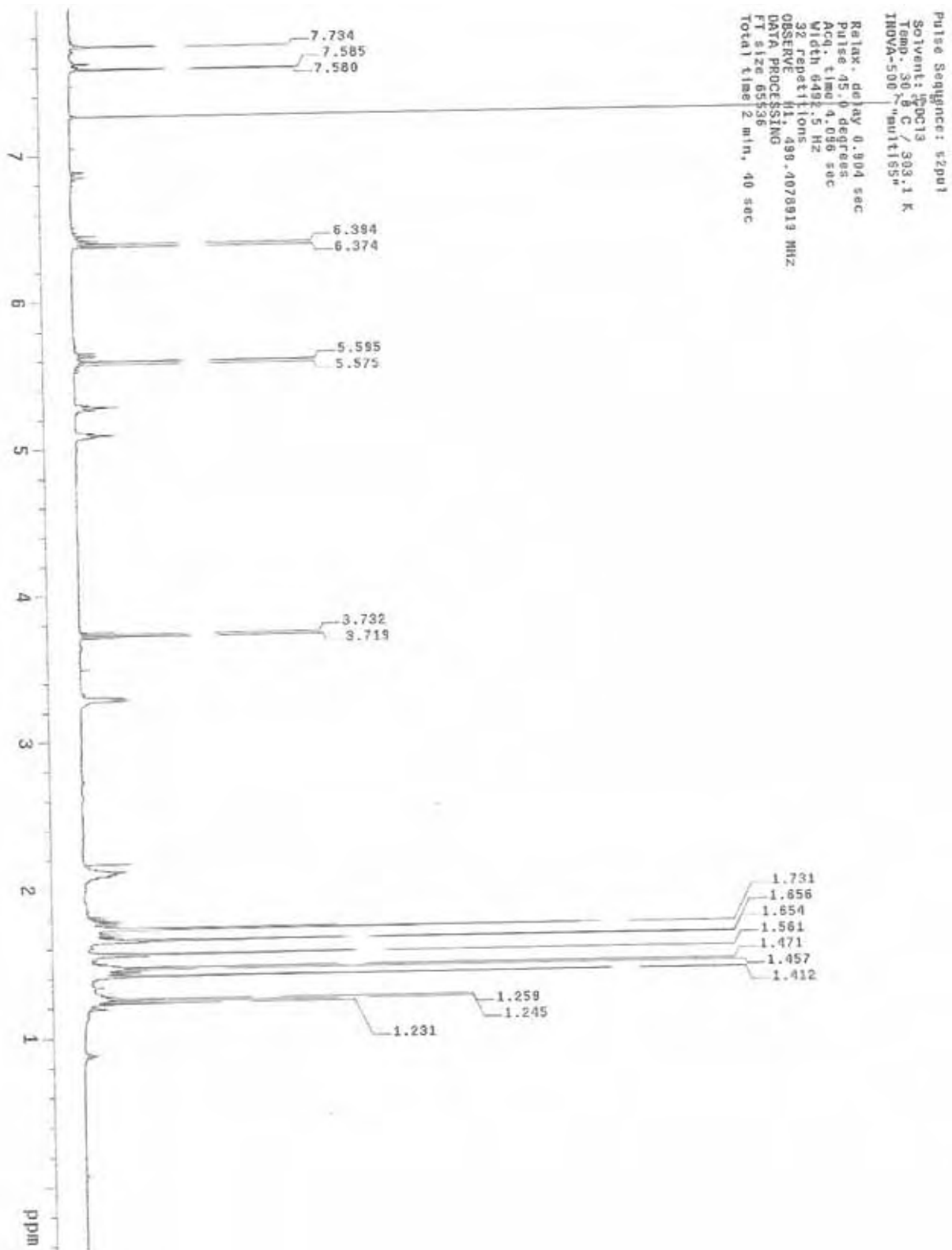


Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 5.2

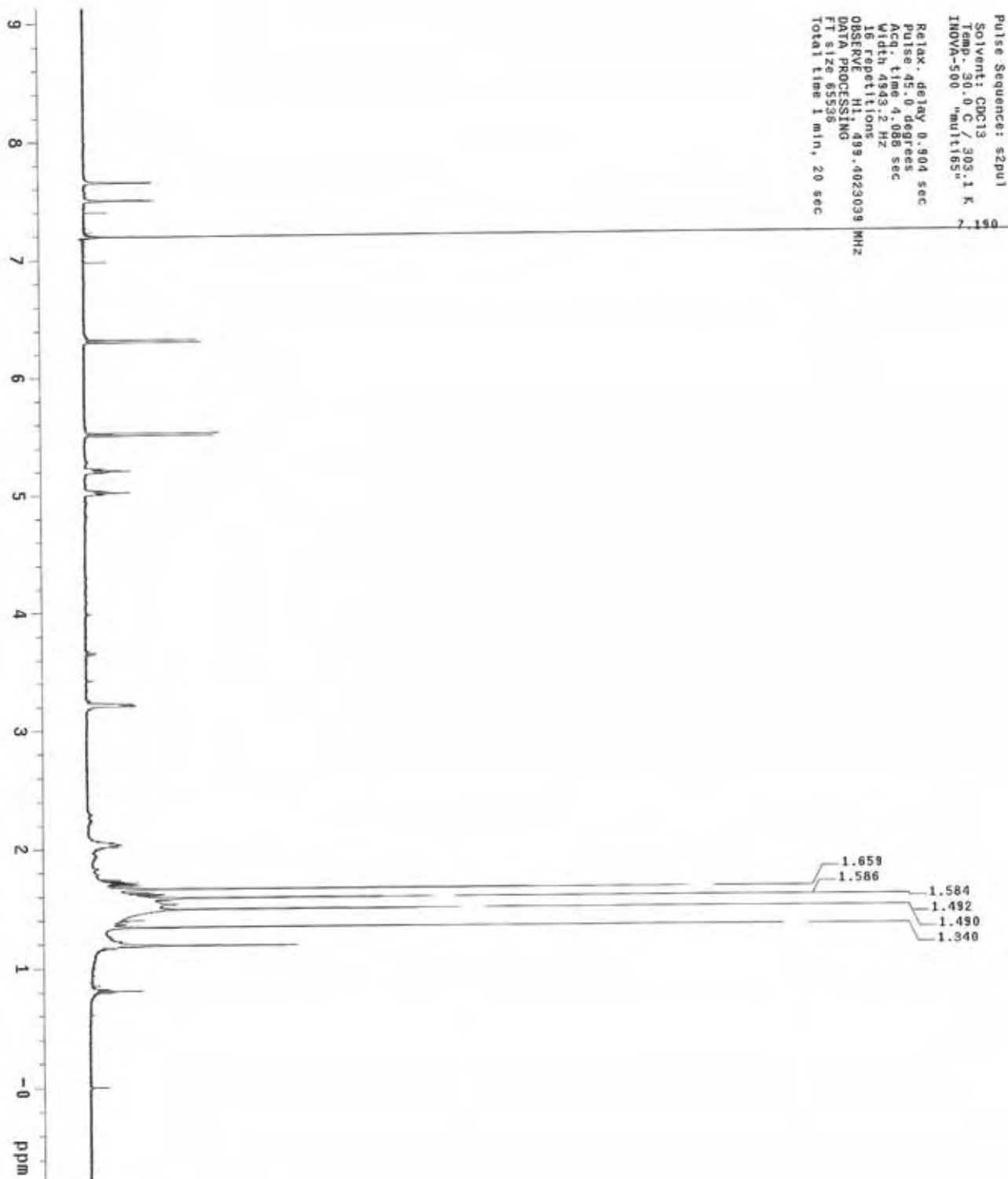
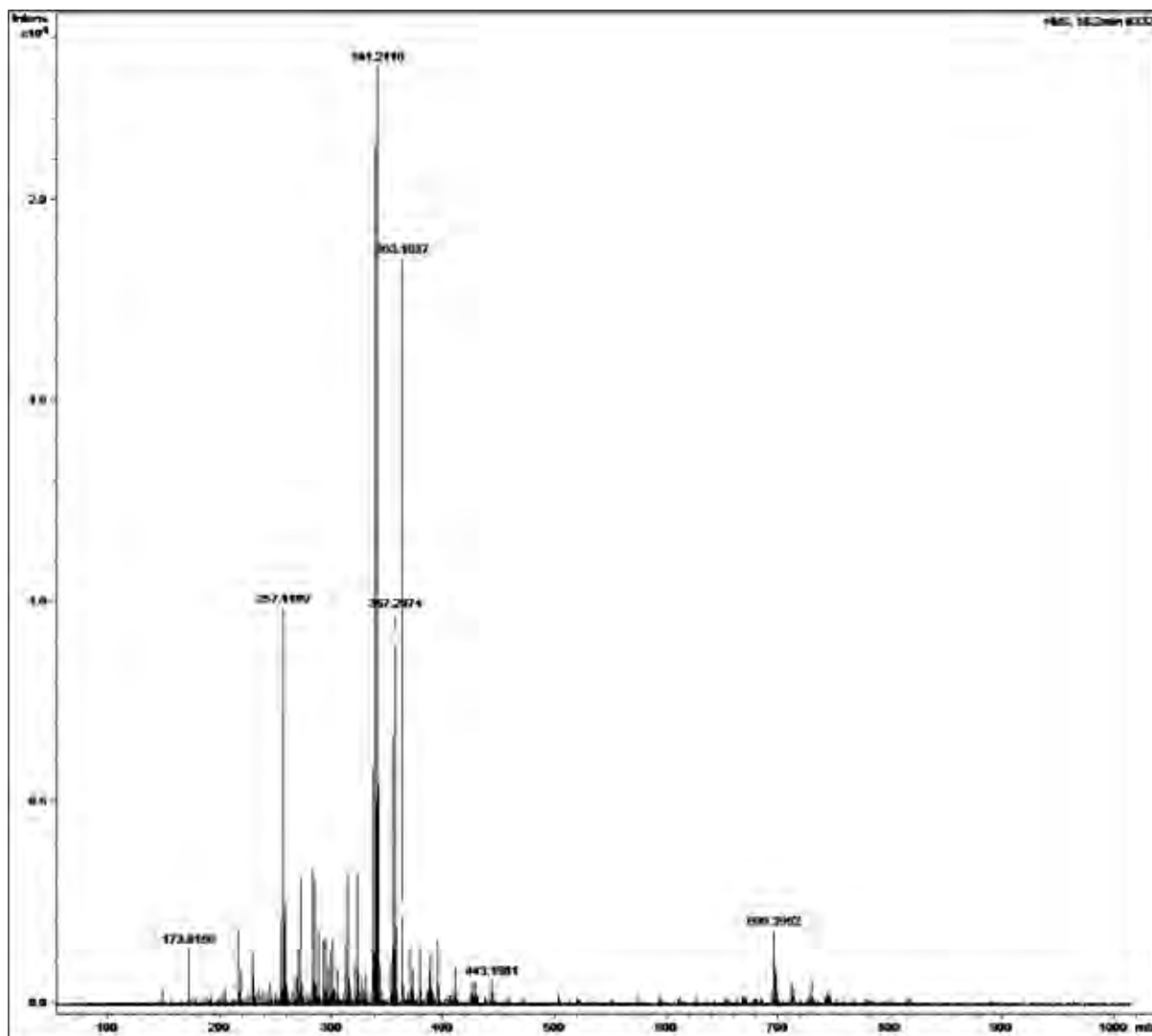


Figura 65 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de **5** no modo positivo

1.5.2 Determinação da configuração absoluta dos compostos isolados

Por meio da utilização de técnicas de RMN mono- e bidimensionais, espectrometria de massas, espectroscopia UV, bem como cromatografia utilizando colunas quirais, foi possível a purificação e a determinação/identificação estrutural de 12 substâncias, incluindo enantiômeros e diastereoisômeros. Embora, para o caso dos compostos **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, ter sido possível a determinação da configuração relativa da parte terpênica, a configuração absoluta de todas as substâncias isoladas permaneceu indeterminada. Para tanto, no próximo capítulo será abordada a utilização de técnicas de espectroscopia quiróptica, principalmente dicroísmo circular vibracional e eletrônico, associados a cálculos mecânico-quânticos, para a determinação da configuração absoluta de todos os carbonos estereogênicos presentes nas moléculas em questão.

1.5.3 Análise do óleo essencial de *Peperomia obtusifolia*

Como para as substâncias **1.1-1.4** e **2.1-2.2** foram propostas as estruturas de cromanos esterificados com os monoterpenos borneol e fenchol, respectivamente, foi realizada a extração do óleo essencial das folhas de *P. obtusifolia* a fim de confirmar a presença desses terpenóides na matriz vegetal.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela análise dos espectros de massas obtidos, dos tempos de retenção e dos índices de retenção em CG-EM. Os dados cromatográficos e espectrométricos obtidos foram comparados com aqueles publicados por ADAMS (1995), além de dados da biblioteca Wiley para CG-EM.

Através da análise dos dados espectrométricos foi possível identificar a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, dentre eles, os monoterpenos borneol e fenchol, ambos na forma de acetato. Essa informação corroborou a presença de compostos esterificados com os monoterpenos em questão na espécie *P. obtusifolia*. Os compostos identificados no óleo essencial são apresentados na tabela 6 (pág. 101). Apesar da grande porcentagem de compostos não identificados, a análise foi bastante

proveitosa, uma vez que possibilitou a identificação dos monoterpenos de interesse. É importante ressaltar que esses resultados se encontram em desacordo com dados publicados recentemente a respeito da composição do óleo essencial dessa mesma espécie (MORANDIM-GIANETTI et al., 2010). No referido trabalho, não foi identificada a presença de monoterpenóides em *Peperomia obtusifolia*. No entanto, é consenso que a composição quali e quantitativa do óleo essencial pode ser influenciada por fatores como diferentes técnicas de extração, além de condições geográficas, climáticas e sazonais (PÉRES et al., 2009).

Tabela 6 - Constituintes do óleo essencial de *Peperomia obtusifolia*

t_R (min)	Substância	Quantidade (% área)	IR calculado	IR Literatura
5,83	α -pineno	17,54	931	939
6,19	α -fenchano	0,36	943	951
6,25	canfeno	2,39	945	953
7,07	β -pineno	3,89	973	980
7,43	β -mirceno	20,47	991	991
8,30	terpineno	0,21	1014	1018
8,57	<i>p</i> -cimeno	0,12	1021	1026
8,77	limoneno	4,21	1027	1031
8,93	<i>cis</i> -ocimeno	0,33	1034	1040
9,35	<i>trans</i> - β -ocimeno	2,51	1045	1050
9,80	γ -terpineno	0,38	1054	1062
10,87	terpinoleno	1,01	1082	1088
11,44	linalool	0,10	1099	1098
16,57	acetato de fenchol	0,14	1214	1220
19,58	acetato de borneol	0,82	1280	1285
23,64	α -copaeno	0,31	1369	1376
25,58	<i>trans</i> -cariofileno	1,44	1411	1418
27,11	α -humuleno	0,39	1447	1454
27,30	aloaromadendreno	0,63	1451	1461
28,22	germacreno	0,75	1473	1480
28,84	α -muuruleno	0,29	1492	1499
29,58	γ -cadineno	0,35	1505	1513
30,73	α -calacoreno	0,22	1533	1542
31,61	δ -nerolidol	0,20	1558	1564
32,42	óxido de cariofileno	0,18	1572	1581
33,05	guaiol	1,54	1590	1595
Não identificados	–	39,22	–	–

CAPÍTULO 2

Determinação da configuração absoluta dos benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Quiralidade e configuração absoluta

Historicamente, é atribuído ao cientista francês Louis Pasteur (1822-1895) a descoberta da chamada quiralidade molecular. Apesar do fenômeno de rotação óptica ter sido descoberto pelo físico francês François Arago (1786-1853) em 1811, quando observou que cristais de quartzo desviavam a luz plano polarizada, o que foi expandido anos mais tarde por Jean-Baptiste Biot (1774-1862) ao observar o mesmo fenômeno para moléculas em fase líquida, gasosa e em solução, foi Louis Pasteur o primeiro a sugerir a correlação entre rotação óptica e estrutura molecular (GAL, 2008).

A contribuição mais importante de Pasteur para o campo da estereoquímica foi a descoberta de que o sal de sódio e amônio de ácido paratartárico, ou (\pm)-ácido tartárico, cristalizava nas condições utilizadas como um conglomerado, ou seja, uma mistura mecânica de dois tipos de cristais, onde cada um deles apresentava exclusivamente um dos enantiômeros. Pasteur chegou a essa conclusão em 1848, após laboriosa observação que o permitiu identificar faces hemiédricas opostas entre os dois tipos de cristais do referido sal, os quais eram quirais e enantiomórficos, ou seja, imagens especulares não superponíveis. Pasteur separou os cristais manualmente e demonstrou que esses, quando solubilizados, desviavam a luz plano polarizada com a mesma intensidade, porém em direções opostas (GAL, 2008).

Louis Pasteur compreendeu que a causa da rotação óptica em estado não cristalino devia-se a quiralidade inerente às moléculas de ácido tartárico levo- e dextrorotatórias, o que ele denominou dissemetria. Essa conclusão foi o primeiro indício experimental da importância da natureza tridimensional das moléculas e, merecidamente, considerado como o início da estereoquímica. Esse feito é ainda mais impressionante se considerarmos que, nessa época, pouco se sabia a respeito da estrutura química e ligações atômicas (ELIEL; WILEN, 1994). Por exemplo, a quadrivalência do carbono foi primeiramente proposta em 1858 e especulações a respeito da natureza tetraédrica do carbono saturado surgiram apenas na década de 1860. Atribui-se ainda a Pasteur duas técnicas de resolução enantiomérica, uma por

meio de complexos diastereoisoméricos e outra utilizando o fungo *Penicillium glaucum* (MASON, 2000).

Apesar de amplamente difundida, a etimologia da palavra “quiral” é considerada confusa. O primeiro a utilizar tal terminologia foi Sir William Thomson (mais tarde conhecido como Lord Kelvin) de forma oral em 1893 e de maneira escrita em 1894, não em 1884, como anteriormente se acreditava (BENTLEY, 2010). Em seus trabalhos científicos anteriores à definição formal do termo quiral, Kelvin já utilizava o prefixo “cheir”, derivado do grego “χειρο”, a forma combinada de “χειρ”, o que significa mão, já que essa era a analogia mais comumente utilizada para exemplificar a dissemetria. É interessante ressaltar que Kelvin, sem explicação, decidiu por abolir a letra “e” da palavra “cheiral” o que resultou na forma atualmente utilizada “chiral”, no inglês, cujo termo correspondente em português é quiral.

Em sua definição pessoal, Kelvin descreve como quiral toda figura geométrica ou conjunto de pontos que apresentam quiralidade, a qual, por sua vez, representa o fato da imagem de um dado objeto, quando refletida em um espelho plano, não coincidir com o objeto em questão. Atualmente, a “International Union for Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) (MOSS, 1996) considera quiralidade como a propriedade geométrica de um objeto rígido (ou arranjo espacial de pontos ou átomos) não ser superponível com sua imagem especular. Esse objeto ainda não pode apresentar elementos de simetria como plano de simetria, centro de inversão ou eixos de rotação-reflexão.

Embora a definição fornecida acima seja amplamente aceita, existem pesquisadores que acreditam que a quiralidade é uma característica inerente à matéria, ou seja, que todos os objetos, em seus diferentes níveis hierárquicos (partículas subatômicas, átomos, moléculas, macromoléculas, agregados supramoleculares, células, organismos, galáxias e o universo) são quirais. Essa teoria se baseia na observação de que todas as partículas fundamentais conhecidas possuem lateralidade intrínseca, podendo existir na forma de dois antípodos, sendo um deles constituído de antimatéria (enantiômeros verdadeiros) (DAVANKOV, 2006).

Como o princípio de paridade não se conserva em interações nucleares fracas (LEE; YANG, 1956), a perpetuação das partículas quirais mais estáveis pode ter se

traduzido na quiralidade das moléculas que incorporam tais partículas. Assim, mesmo moléculas simétricas, como o metano, apresentariam rotação óptica em algum comprimento de onda específico. A amplificação de tal característica pode ser uma das causas da intrigante questão da homoquiralidade biológica, ou seja, a preferência e disseminação de L-aminoácidos e D-açúcares em moléculas de importância biológica. A origem da homoquiralidade tem sido extensamente discutida e pode envolver, entre outros aspectos, autocatálise (SOAI et al., 1995), ação de luz solar circularmente polarizada (MacDERMOTT, 1986), ou ainda influência extraterrestre, como o meteorito de Murchinson (BADA, 1995).

Baseado no fato de que a maioria dos aminoácidos são quirais, é perfeitamente compreensível a enantiosseletividade das proteínas com função catalítica, conhecidas como enzimas. Além de função catalítica, certas proteínas desempenham os papéis de receptores e transportadores celulares, os quais são igualmente sensíveis às características estereoquímicas. Assim sendo, diversas moléculas que constituem alimentos, fragrâncias e medicamentos podem apresentar propriedades diferentes nos sistemas vivos. Dessa forma, a discriminação estereoquímica é considerada como o maior refinamento na comunicação química na natureza (LEAL et al., 1995).

Um clássico exemplo do que foi exposto no parágrafo anterior é o caso do monoterpeno limoneno, o qual é constituído por dois enantiômeros, sendo que o composto com estereoquímica *S* é responsável pelo odor de limão, enquanto o *R* é responsável pelo odor de laranja (CLAYDEN et al., 2001). No caso dos medicamentos, inúmeros são os exemplos de distintas atividades farmacológicas apresentadas por pares enantioméricos: desde o clássico exemplo da talidomida, na qual, o isômero dextrógiro é sedativo e o isômero levógiro é teratogênico, até o caso do anestésico cetamina, cujo isômero dextrógiro apresenta atividade anestésica e o levógiro causa agitação (KASPRZYK-HORDERN, 2010).

Assim, desde a sugestão por van't Hoff e LeBel, em 1874, que moléculas individuais possuem estrutura tridimensional, a qual pode levar à dissemetria, a exata orientação dos átomos no espaço, ou seja, a configuração absoluta, tem sido um intrigante problema a ser solucionado (ALLENMARK; GAWRONSKI, 2008). A determinação da configuração absoluta de moléculas quirais, em especial compostos

orgânicos isolados de fontes naturais, configura-se como uma das etapas mais desafiadoras, no entanto inevitável, tanto para estudos de elucidação estrutural quanto para a investigação das atividades biológicas dos mesmos (PESCITELLI et al., 2009).

De fato, a estereoquímica (configuração) absoluta de sistemas quirais é crucial para o entendimento das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, principalmente no que tange as ciências farmacêuticas (SADLEJ; DOBROWOLSKI; RODE, 2010). Assim, a fim de comercializar fármacos com melhores perfis de segurança e potência, a indústria farmacêutica tem se voltado à fabricação de medicamentos cujos princípios ativos quirais estejam na forma de enantiômeros puros, ao invés de racematos, transformando a determinação da configuração absoluta em uma parte essencial e fundamental no desenvolvimento de fármacos (STEPHENS; DEVLIN; PAN, 2008)

Diversos métodos para determinação da configuração absoluta de compostos quirais têm sido desenvolvidos ao longo dos anos. Esses podem ser divididos em dois grandes grupos: métodos relativos e absolutos. Métodos relativos são aqueles baseados na existência de uma referência, que pode consistir no próprio composto (caso previamente conhecido e caracterizado), em um composto quimicamente relacionado cuja configuração absoluta seja conhecida, ou em uma porção molecular com configuração conhecida, a qual pode ser ligada à amostra a fim de gerar um derivado a ser caracterizado posteriormente (PESCITELLI et al., 2009).

Como exemplos de métodos relativos podemos citar a medida do poder rotatório óptico (RO) de uma amostra enantiomericamente pura ou enriquecida, bem como a correlação estereoquímica, a qual envolve a transformação da molécula em questão, por uma série de reações bem estabelecidas, em uma molécula quiral com rotação óptica e configuração absoluta conhecidas. Além desses, a técnica de RMN, que é intrinsecamente incapaz de diferenciar enantiômeros, pode ser utilizada desde que agentes de solvatação ou de derivatização quirais sejam utilizados. Assim, a análise do espectro de RMN considerando o posicionamento relativo entre os diferentes elementos de quiralidade presentes, comumente afetados pelos efeitos anisotrópicos causados pelo solvente ou reagente, permite o assinalamento da configuração absoluta da amostra original (SECO; QUIÑOÁ; RIGUERA, 2004).

A cristalografia de raios-X também é considerada como um método relativo para determinar a configuração absoluta quando, devido à ausência de efeitos de espalhamento anômalos, faz-se necessária a introdução na amostra de uma porção molecular de configuração absoluta conhecida, a chamada referência quirál interna (FLACK; BERNARDINELLI, 2008). No entanto, quando compostos cristalinos que exibem espalhamento ressonante dos raios-X são analisados, principalmente aqueles com átomos pesados incorporados em suas moléculas (ex. halogênios, fósforo, etc.), a referida técnica é considerada como um dos mais confiáveis métodos absolutos para determinação da configuração absoluta. Os métodos absolutos são, portanto, aqueles que independem da presença de qualquer composto de referência.

Dentre os métodos absolutos, merecem destaque os métodos quirópticos, tais como dispersão rotatória óptica (DRO), dicroísmo circular eletrônico (DCE) e vibracional (DCV) além de atividade óptica Raman. Esses métodos dependem da interação diferencial de um composto opticamente ativo com radiação eletromagnética circularmente polarizada para esquerda e direita. A utilização de tais métodos tem recentemente vivenciado um renascimento, o que se deve principalmente ao advento de cálculos mecânico-quânticos *ab initio* precisos para predição de espectros teóricos, disponíveis em softwares comerciais (POLAVARAPU, 2008). A utilização de espectroscopia quiróptica é menos laboriosa, demorada e dispendiosa que os métodos por raios-X, RMN e síntese orgânica estereocontrolada, além de não ser destrutiva e permitir a análise de amostras diretamente em solução (SADLEJ; DOBROWOLSKI; RODE, 2010).

2.1.2 Dicroísmo circular eletrônico

O fenômeno de dicroísmo circular (DC) consiste na interação diferencial de uma molécula quirál, não racêmica, com radiação eletromagnética circularmente polarizada para a esquerda e direita. Esse fenômeno é intrinsecamente relacionado com a quiralidade, uma vez que os feixes de luz são imagens especulares uns dos outros e a interação de tal radiação com um composto quirál representa uma manifestação da

discriminação diastereoisomérica (BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007). Assim, pode-se definir dicroísmo circular como

$$DC = A^e - A^d \quad (1)$$

onde A^e e A^d representam absorção de luz circularmente polarizada para esquerda e direita, respectivamente. Em analogia à Lei de Lambert-Beer, o DC pode ser definido em termos de absorvidade molar

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon^e - \varepsilon^d = \frac{DC}{c \cdot b} \quad (2)$$

a qual é independente da concentração c (mol/L) e do caminho óptico b em cm.

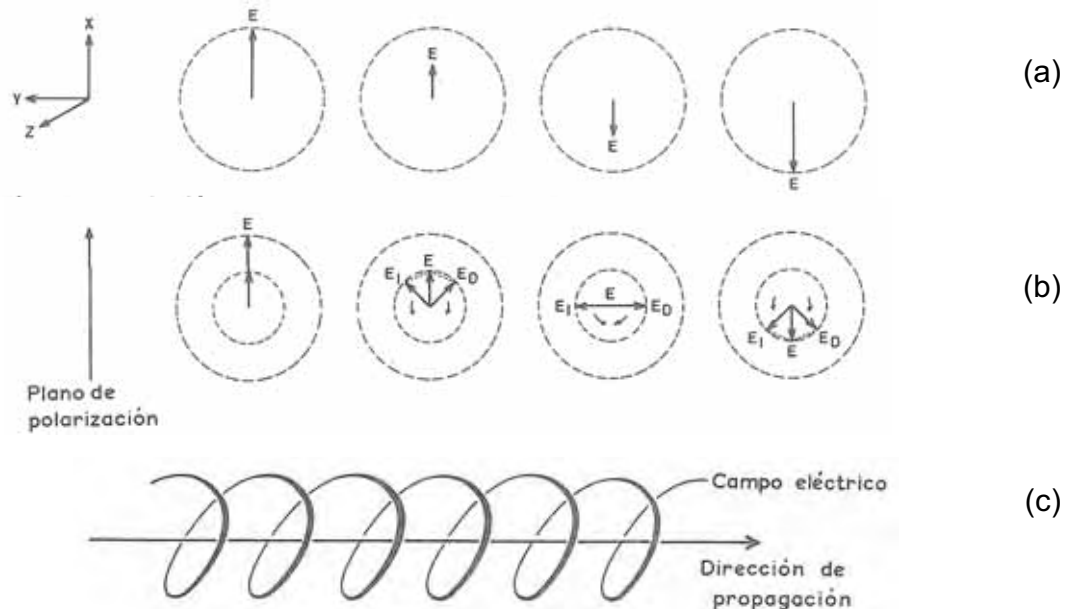
Historicamente, o desenvolvimento do DC está intimamente ligado à outras formas de espectroscopia quiróptica, como RO e DRO. Em 1809, Malus descobriu que imagens vistas através de cristais de calcita (espato-da-islândia ou CaCO_3) se tornavam duplicadas. Esse fenômeno de dupla refração foi creditado à birrefringência linear, onde os índices de refração ao longo dos eixos do cristal anisotrópico eram diferentes. Um feixe de luz depois de passar através de um cristal de calcita emergia como dois feixes, com vetores elétricos ortogonais entre si. O bloqueio de um desses feixes originou um elemento óptico conhecido como polarizador. Assim, a luz polarizada dessa forma não atravessaria um segundo polarizador posicionado a 90° em relação ao plano original de polarização (BRITTAIN, 1994).

Entre 1812 e 1815, Biot observou que certos materiais, os quais poderiam ser cristais de quartzo ou ainda soluções de compostos orgânicos (cânfora, açúcares, etc.), quando posicionados entre esses dois polarizadores, permitiam que luz fosse transmitida pelo segundo polarizador. Essa observação o levou a concluir que o plano inicial de polarização da luz havia sido desviado por influência do meio “opticamente ativo” localizado entre os dois polarizadores. O mesmo pesquisador, em 1838, propôs a relação entre o ângulo de rotação (α) e a concentração da amostra em um dado caminho óptico, o que define o poder rotatório específico $[\alpha]$ como uma propriedade

intrínseca de uma molécula opticamente ativa (CRABBÉ, 1974). Esses avanços foram de suma importância para o desenvolvimento do primeiro polarímetro.

O desvio do plano de polarização da luz incidente só pôde ser explicado após a proposição feita por Fresnel, em 1824, de que a luz linearmente polarizada, cujo vetor campo elétrico oscila ao longo de um único eixo, é resultado da superposição, em fase, de duas componentes circularmente polarizadas, uma para a esquerda e outra para direita. Nessas componentes, o vetor campo elétrico gira, em sentido horário ou anti-horário, ao redor do eixo de propagação da onda (Figura 66, pág. 108). Assim a RO se origina pela diferença dos índices de refração do meio assimétrico para as componentes circularmente polarizadas para a direita e esquerda, ou seja, pela birrefringência circular (BRITAIN, 1994).

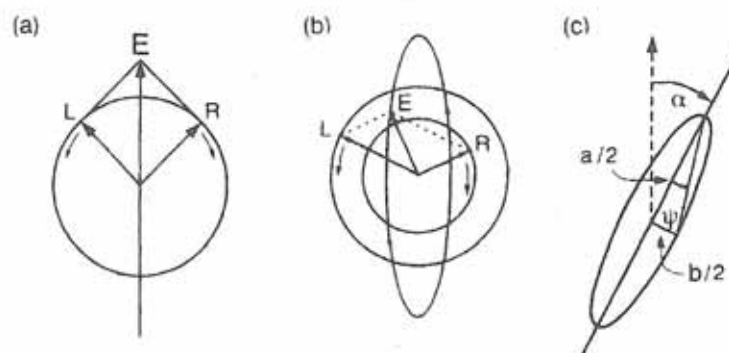
Figura - 66 Oscilação do campo elétrico E em função do tempo para ondas linear e circularmente polarizadas. (a) Luz linearmente polarizada, (b) Decomposição da luz linearmente polarizada em componentes circularmente polarizadas para esquerda e direita, (c) Luz circularmente polarizada para direita. Fonte: CRABBÉ, 1974



Em continuidade às descobertas descritas anteriormente, Biot também constatou que a RO de soluções de ácido tartárico era função do comprimento de onda utilizado na determinação. Essa dependência da RO em relação ao comprimento de onda é chamada dispersão rotatória óptica (DRO). Quando medido em uma região onde a amostra não absorve luz, um espectro de DRO consiste em uma curva plana de dispersão, a qual pode ser positiva ou negativa, com intensidade inversamente proporcional ao comprimento de onda utilizado. No entanto, quando esse espectro é medido em uma região onde a amostra assimétrica absorve radiação eletromagnética, a curva de DRO apresenta dispersão anômala, com picos e vales, a qual foi posteriormente chamada de efeito Cotton (CRABBÉ, 1974).

De maneira semelhante ao fenômeno de RO e de DRO fora da zona de absorção, onde as componentes circularmente polarizadas para esquerda e direita se propagam com velocidades diferentes, o DC, primeiramente observado por Haidinger em 1847 e descrito por Aimé Cotton em 1896, é resultado da absorção diferencial de uma dessas componentes circularmente polarizadas. Em decorrência da absorção diferencial, uma das componentes se torna menos intensa e o vetor campo elétrico resultante passa a descrever uma elipse, com seu formato definido pelo ângulo ψ , conhecido como elipsidade (Figura 67, pág. 110). Por fim, como um meio assimétrico real apresenta tanto DC quanto birrefringência circular, o maior eixo da elipse encontra-se comumente desviado pelo ângulo α (WOODY, 2000).

Figura 67 - (a) Luz plano polarizada decomposta em duas componentes circularmente polarizadas, (b) Luz circularmente polarizada para a direita absorvida de maneira diferencial por um meio que apresenta dicroísmo circular, o que gera luz elipticamente polarizada (vetor campo elétrico E descreve uma elipse), (c) Luz elipticamente polarizada desviada pelo ângulo α ao atravessar meio que apresenta birrefringência circular. Os dois semi-eixos da elipse formam um triângulo cujo ângulo oposto ao semi-eixo menor é chamado ψ (elipsidade) Fonte: WOODY, 2000



Ainda para exemplificar a interligação entre as formas de espectroscopia quirótica, uma medida positiva de DC ou de elipsidade está associada a uma curva anômala de DRO também positiva. Assim, todos esses três fenômenos (DRO anômalo, DC e elipsidade) são chamados de efeito Cotton (EC), em homenagem ao físico francês Cotton. Baseado no exposto, os primeiros instrumentos para medir DC foram desenvolvidos a fim de detectar absorção diferencial (ΔA) ou elipsidade (ψ em radianos ou θ em mdeg), no entanto, os instrumentos modernos são calibrados predominantemente em termos de absorção diferencial (WOODY, 2000). Por razões históricas, alguns instrumentos modernos ainda fornecem resultados de DCE em unidades de mdeg. Esses valores podem ser facilmente convertidos em valores de absorbância diferencial ou elipsidade molar $[\theta]$ pela utilização das equações (3) e (4), respectivamente.

$$\psi = 33 \Delta A \quad (3)$$

$$[\theta] = 3300 \Delta \epsilon \quad (4)$$

A instrumentação básica para medidas de DCE se configura em um espectropolarímetro convencional sendo que, entre o monocromador e a cela da amostra, é introduzido um elemento capaz de gerar luz circularmente polarizada para a esquerda e direita, geralmente um modulador fotoelástico (MFE) (Figura 68, pág. 111). Esse modulador é composto por um cristal isotrópico, o qual se torna anisotrópico pela aplicação de estresse externo, nesse caso, por efeito piezoelétrico. Em instrumentos modernos, utiliza-se cristal de quartzo que oscila em uma frequência de aproximadamente 50 KHz (BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007). A radiação incidente linearmente (verticalmente) polarizada, ao atravessar o modulador fotoelástico, sofre uma defasagem de $\frac{1}{4}$ de onda ($90^\circ = \pi / 2$) entre as duas componentes em fase projetadas nos eixos rápido e lento do modulador ($\pm 45^\circ$). Assim, a recombinação dessas gera luz circularmente polarizada (Figura 69, pág. 112).

Figura 68 - Esquema básico de um espectrômetro de DC. **S** fonte de luz, **M** monocromador (seletor de λ), **L** polarizador linear, **P** modulador fotoelástico, **D** detector, **LI** amplificador do sinal, **PC** computador para processamento dos dados Fonte: BOBBITT, 1994

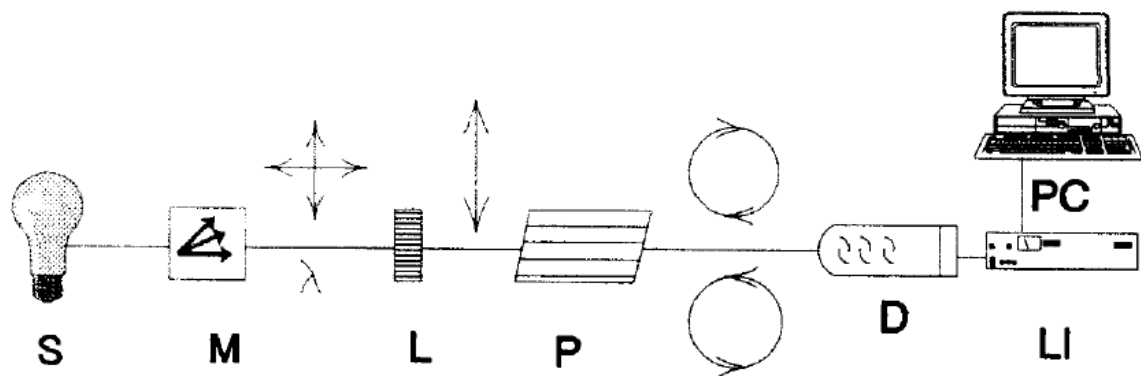
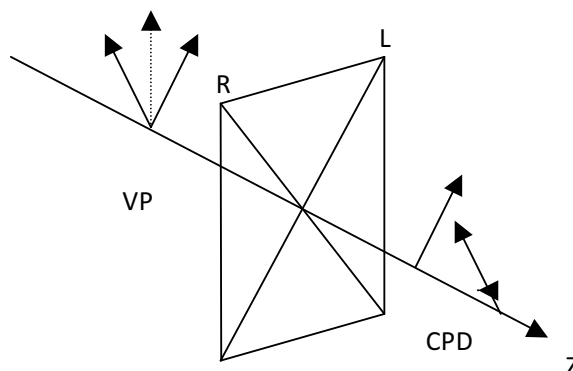


Figura 69 - Ilustração da ação de um MFE com eixo lento (L) a $+45^\circ$ em relação a luz incidente verticalmente polarizada (VP) e ao observador posicionado na saída do feixe de luz. A radiação VP é resolvida em duas componentes linearmente polarizadas em fase. Após a passagem pelo elemento óptico, a componente a $+45^\circ$ é retardada em um quarto de onda em relação a -45° , resultando em luz circularmente polarizada para a direita (CPD) Fonte: NAFIE, 2011



No processo de interação de radiação UV com uma dada molécula, caso a energia do fóton incidente seja igual a energia necessária para a transição da referida molécula para um estado de maior energia, ou “excitado”, esse fóton pode ser absorvido. Durante essa transição ou “movimento”, cria-se, por um curto período de tempo, um momento de transição elétrico entre um estado e outro, o qual é representado pelo vetor μ_{oa} , onde “o” representa o estado fundamental e “a” o estado excitado. Em termos teóricos, a absorvância (A) experimental de uma dada banda é proporcional a um fator chamado força dipolar (D), o qual é o quadrado do momento de transição elétrico e pode ser facilmente calculado por métodos mecânico-quânticos.

De maneira análoga à absorção ordinária de radiação UV, no fenômeno de DCE, a radiação eletromagnética também é absorvida, no entanto, de maneira circularmente polarizada. Assim, a transição entre um estado de menor energia para um estado excitado ocorre através de uma rota circular. De acordo com a lei de Biot, elétrons em movimento circular geram um campo magnético e, portanto, espera-se que durante essa excitação seja criado também um momento de transição magnético, representado pelo vetor m_{oa} . Pela combinação dos momentos de transição elétrico e magnético surge o fator chamado força rotacional (R), o qual representa a intensidade

e o sinal de uma transição de DC e também pode ser calculado por métodos mecânico-quânticos. As expressões para a força dipolar e rotacional são apresentadas nas equações (5) e (6), respectivamente.

$$D_{oa} = \mu_{oa}^2 \quad (5)$$

$$R_{oa} = \mu_{oa} m_{oa} \cos(\mu, m) \quad (6)$$

Da equação (6) podemos concluir que a ausência de momento de transição elétrico ou magnético, para uma dada transição eletrônica, gerará R nulo. No entanto, a presença de ambos, porém arranjados de maneira perpendicular ($\cos 90^\circ = 0$), também gerará força rotacional nula e, conseqüentemente, DC nulo. Essa é a condição existente para algumas transições eletrônicas permitidas em moléculas aquirais (NICU; BAERENDS, 2009).

Por fim, diante de todo conhecimento acumulado em relação ao fenômeno de DC e da sensibilidade do mesmo às características estereoquímicas das moléculas, não é surpresa o fato do DCE ser amplamente utilizado para determinação tanto da configuração absoluta de compostos orgânicos, quanto da estrutura secundária de macromoléculas e de peptídeos. Com enfoque na determinação de configuração absoluta, a análise de uma extensa gama de compostos permitiu o desenvolvimento de diversas regras empíricas muito utilizadas para interpretação dos espectros de DCE. Dentre essas, destacam-se a regra do octante (LIGHTNER, 2000) para compostos carbonílicos, a regra de setores do cromóforo benzeno (SMITH, 2000) e as regras de helicidade para dienos (GAWRONSKI, 2000) e benzopiranos (ANTUS et al., 2001). Considerada como uma regra não empírica e muito confiável, merece destaque o método de “exciton chirality” (BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007), o qual se origina do acoplamento espacial entre dois cromóforos com transições eletrônicas similares e dispostos de maneira quiral. Esse acoplamento gera uma curva de DCE bisignada que reflete o senso de quiralidade da molécula em questão.

A despeito da frequente utilização das regras mencionadas acima, as mesmas frequentemente apresentam exceções (FREEDMAN et al., 2003; KWIT et al., 2008) e, por se tratar de espectroscopia no UV, faz-se necessário a presença de cromóforos adequados, o que limita a utilização do DCE em produtos naturais. Além disso, a simulação de estados excitados em transições eletrônicas por métodos mecânico-quânticos é computacionalmente muito custosa. Assim sendo, no decorrer desse trabalho, serão apresentados exemplos de aplicação de DCE na determinação da configuração absoluta de produtos naturais, exceções às regras empíricas, bem como um método alternativo, de aplicação mais abrangente e simulação mais simples, o DCV, a ser descrito na próxima seção.

2.1.3 Dicroísmo circular vibracional

Diante da aplicabilidade da técnica de DC em transições eletrônicas, em 1970, alguns cientistas imaginaram se havia a possibilidade de medir DC e DRO, originados de transições vibracionais, na região do infravermelho (IV) no espectro eletromagnético. Apesar das primeiras tentativas para observação de DRO nessa região terem falhado, em 1973, um instrumento, inicialmente desenvolvido para medida de DC em regiões do IV próximo (acima de 3000 cm^{-1}), foi modificado permitindo o acesso às regiões de número de onda menores, o que culminou na primeira medida de DC vibracional (DCV) em fase líquida (STEPHENS, DEVLIN, PAN, 2008). O primeiro relato experimental de DCV de uma molécula orgânica foi apresentado em 1974 para o (*R*)-(-)- e (*S*)-(+)-2,2,2-trifluor-1-feniletanol, para estiramentos C-H do carbono assimétrico presente. Nesse mesmo trabalho foram ainda apresentados cálculos das forças rotacionais (*R*) de cada modo vibracional (HOLZWARTH et al., 1974).

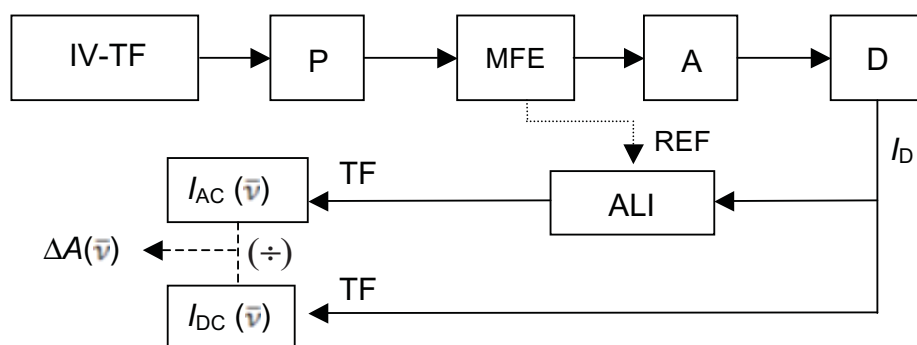
Outros relatos de DCV para uma série de micromoléculas e polímeros, abrangendo uma região maior do espectro eletromagnético ($2700\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$) e com melhor razão sinal/ruído, foram descritos aproximadamente um ano e meio mais tarde (NAFIE; CHENG; STEPHENS, 1975; NAFIE; KEIDERLING; STEPHENS, 1976). Nesses trabalhos foram observados sinais de DCV relacionados a estiramentos O-H e N-H, além dos estiramentos C-H anteriormente descritos. Os principais avanços

instrumentais que permitiram tais medidas envolveram a introdução de um detector de InSb, de um modulador fotoelástico de ZnSe, além da inclusão de um segundo modulador de ZnSe após a cela de amostra, para reduzir possíveis artefatos nos sinais de DCV. Essa última alteração viria a ter um impacto muito significativo, anos mais tarde, para o desenvolvimento da última geração de espectrômetros de DCV.

O primeiro instrumento comercial dedicado à medidas de DCV só chegou ao mercado em 1997, com o lançamento do Chiral/RTM pela Bomem/BioTools. Esse se baseou em um instrumento descrito em 1979 (NAFIE; DIEM; VIDRINE, 1979), o qual permitia a medida simultânea dos espectros IV e DCV, em uma ampla região do espectro eletromagnético, graças às vantagens introduzidas pelo advento da espectroscopia no IV com transformada de Fourier (IV-TF). Atualmente, BioTools, Varian, Jasco, Thermo e Bruker também oferecem instrumentos ou acessórios para DCV-TF. Um esquema dos componentes básicos necessários para a aquisição de espectros de DC vibracional é apresentado na figura 70 (pág. 116).

Os espectrômetros de DCV apresentam a chamada dupla modulação, a qual é obtida pela inserção de um polarizador e uma fonte de alta frequência para modulação de polarização do feixe do IV antes da cela de amostra. Para a região do IV médio (800-2000 cm⁻¹), a mais comumente utilizada, os MFE de ZnSe operando em uma frequência de 37 KHz geram os melhores resultados (NAFIE; DUKOR; FREEDMAN, 2002). A modulação é dupla, uma vez que no detector chegam dois interferogramas, um na frequência do MFE, contendo o espectro “bruto” de DCV da amostra (I_{AC}), e outro na frequência de Fourier (100-1000 Hz), contendo o espectro ordinário no IV (I_{DC}). O processamento posterior do interferograma de DCV por um amplificador “lock-in” permite que a alta frequência seja demodulada em uma frequência normal de Fourier, que após transformação matemática, gera os espectros de IV e DCV, simultaneamente. Se a razão entre as intensidades de IV e DCV for calculada, o espectro final de DCV em $\Delta A(\bar{\nu})$ é obtido.

Figura 70 - Diagrama de blocos de um espectrômetro de DCV-TF. Fonte representada pelo espectrômetro **TF-IV**, **P** polarizador, **MFE** modulador fotoelástico, **A** amostra, **D** detector, **ALI** amplificador "lock-in", **REF** referência, **TF** transformada de Fourier. I_D representa o interferograma total no detector, I_{AC} o interferograma de DCV e I_{DC} o de IV



O DCV é uma das duas principais formas de atividade óptica vibracional, sendo a segunda representada pela atividade óptica Raman. Nos últimos anos, maior atenção tem sido dedicada ao DCV para a determinação da configuração absoluta de compostos quirais, quando comparado à atividade óptica Raman. Isso se deve, principalmente, aos maiores avanços instrumentais e à facilidade de predição dos espectros teóricos (NAFIE, 2008). O DCV é definido como a absorção diferencial, por parte de uma molécula quiral, de radiação IV circularmente polarizada para esquerda e direita (equações 7 e 8). É a extensão do DCE para as regiões do IV e IV próximo no espectro eletromagnético, regiões essas onde ocorrem transições vibracionais no estado eletrônico fundamental das moléculas (FREEDMAN et al., 2003).

$$\Delta A(\bar{\nu}) = A^e(\bar{\nu}) - A^d(\bar{\nu}) \quad (7)$$

$$\Delta \varepsilon(\bar{\nu}) = \varepsilon^e(\bar{\nu}) - \varepsilon^d(\bar{\nu}) \quad (8)$$

Em termos teóricos, a absorção de radiação no IV por uma dada molécula também é proporcional à força dipolar (D), definida na sessão anterior. Na aproximação harmônica, esse fator relaciona-se com a mudança no momento de transição dipolo elétrico (μ) da molécula durante a movimentação nuclear, a qual se origina na transição de um fóton do estado vibracional fundamental para o primeiro estado vibracional excitado. De maneira análoga ao DCE, o fenômeno de DCV também é proporcional ao produto escalar dos vetores momento de transição elétrico e magnético, ou seja, a força rotacional (R), a qual é nula em moléculas aquirais. Dessa forma, o DCV é devido tanto à oscilação linear quanto angular de cargas durante a movimentação vibracional. Ambos os fatores D e R são facilmente calculados por métodos mecânico-quânticos que necessitam ir além da aproximação de Born-Oppenheimer para incluir a correlação entre as velocidades nucleares e eletrônicas, o que se tornou possível principalmente com o desenvolvimento do método de perturbação do campo magnético por Stephens (FREEDMAN et al., 2003; STEPHENS; DEVLIN; PAN, 2008).

O DCV combina a estereo sensibilidade inerente a todas as formas de atividade óptica, onde moléculas que são imagens especulares apresentam espectros com mesma intensidade, porém com sinais opostos, com a riqueza de informação estrutural específica da espectroscopia no IV, com destaque à região conhecida como “fingerprint” ($1300-900\text{ cm}^{-1}$). Essa sensibilidade estrutural deve-se ao grande número de transições vibracionais representando todos os graus internos de liberdade de uma dada molécula ($3N-6$, onde N é o número de átomos), o que possibilita o assinalamento inequívoco mesmo em moléculas policêntricas. Contrário ao DCE, não existe a necessidade da presença de cromóforos já que toda transição vibracional representa um “cromóforo” no IV e, praticamente, todas as moléculas apresentam diversas transições vibracionais nessa região. No entanto, a razão anisotrópica $g = \Delta A/A$ é cerca de 10-100 vezes menor que a obtida para DCE, o que resulta na necessidade de maior quantidade de amostra (conc. 0,01 – 0,1 M, para absorbância A entre 0,1 e 1,0) e maior tempo de aquisição.

A determinação da configuração absoluta de compostos orgânicos utilizando DCV inclui inicialmente o cálculo dos espectros, tanto no IV quanto de DCV, de um dos enantiômeros possíveis, arbitrariamente escolhido, por métodos *ab initio* ou da teoria

do funcional de densidade (TFD), sendo que essa última rendeu o prêmio Nobel em Química aos pesquisadores Walter Kohn e John Pople, em 1998. Diferentes níveis de teoria são possíveis, sendo que a melhor metodologia deve ser escolhida considerando características intrínsecas a cada uma das moléculas avaliadas. No caso de moléculas flexíveis, onde mais de um conformero contribui para a população final em uma dada condição experimental, uma cuidadosa busca conformacional deve ser realizada e o espectro final gerado deve considerar a contribuição de cada conformero, segundo a distribuição de Boltzmann (STEPHENS; DEVLIN; PAN, 2008).

Após os cálculos, os espectros experimentais obtidos na região de IV médio (1800-900 cm^{-1}) são comparados com os espectro preditos e, caso as bandas majoritárias (efeitos Cotton) presentes estejam de acordo com as calculadas, em relação a magnitude e sinal, a configuração absoluta escolhida para os cálculos corresponde àquela da amostra desconhecida. Se, no entanto, uma mesma magnitude com sinais opostos for encontrada, a configuração absoluta é oposta àquela calculada (NAFIE, 2008). Como o DCV configura-se na superposição linear dos espectros de conformeros isolados, não só a determinação da configuração absoluta é possível, mas também da composição quali e quantitativa dos conformeros em solução (BÜRGI; VARGAS; BAIKER, 2002).

Diante da potencialidade dos métodos quirópticos, principalmente DC, para a determinação da configuração absoluta de compostos orgânicos (FREEDMAN et al., 2003; BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007), incluindo diversos produtos naturais (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005; NAFIE, 2008), nesse trabalho buscou-se a sedimentação do conhecimento em ambas as formas de DC, eletrônico e vibracional, associadas a cálculos mecânico-quânticos *ab initio*, a fim de obter informações sobre a estereoquímica absoluta de benzopiranos quirais isolados das espécies *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). Essas informações são imprescindíveis para inequívoca elucidação estrutural, permitindo melhor compreensão da atividade biológica e rotas biossintéticas associadas a esses compostos.

2.2 OBJETIVOS

- Determinação da configuração absoluta, bem como dos confômeros em solução, dos benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* utilizando dicroísmo circular vibracional, dicroísmo circular eletrônico e cálculos mecânico-quânticos;
- Sedimentação do conhecimento em métodos quirópticos, associados a cálculos mecânico-quânticos, e sua aplicabilidade na solução de problemas estereoquímicos em produtos naturais.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Técnicas espectroscópicas

As medidas da rotação específica da luz polarizada por moléculas quirais foram realizadas em polarímetro Perkin Elmer 241, equipado com lâmpada de Na operando a 589 nm (linha D). Os espectros de DCE foram obtidos em detector Jasco modelo CD-2095 Plus, tanto por injeção direta quanto por aprisionamento da amostra após eluição da coluna cromatográfica, utilizando uma válvula divisora de fluxo. Foi utilizada cela de amostra de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm e volume de 44 μL . Os espectros foram obtidos como a média de três aquisições e as intensidades são apresentadas em valores de elipsidade (mdeg). A linha de base dos espectros de DCE de cada amostra foi corrigida por subtração do espectro obtido para o solvente. Os espectros foram plotados utilizando o software Origin Pro 8 (Origin Lab).

Os espectros no IV e de DCV foram obtidos em espectrômetro DCV-TF Chiral/IR (BioTools, Inc.) equipado com dois MFEs, utilizando resolução de 4 cm^{-1} e tempo de aquisição variável. O retardo dos dois MFEs foi otimizado em 1400 cm^{-1} . Um filtro óptico foi utilizado para permitir que apenas a região de 800-2000 cm^{-1} atingisse o detector. As medidas foram realizadas em CDCl_3 utilizando cela de BaF_2 com caminho óptico de 100 μm e volume de 100 μL . Os desvios da linha de base foram eliminados pela subtração dos espectros de DCV de um enantiômero e seu antípodo, quando presente, seguido de divisão por dois; ou por subtração do espectro obtido para o solvente, em condições idênticas às aquelas utilizadas na amostra de interesse. Os dados experimentais foram processados utilizando o software Grams AI 9.0 (Thermo) e os espectros plotados com o software Origin Pro 8 (Origin Lab).

2.3.2 Métodos computacionais

Todos os cálculos TFD e TFDTD foram realizados a 298 K, em fase gasosa, utilizando os softwares Gaussian 03 ou 09 (Gaussian, Inc.). Eventualmente, alguns cálculos contaram com a inclusão de modo solvente. Para tanto, foi utilizada a

ferramenta SCRF/PCM (solvente de interesse). Os cálculos foram realizados para configurações absolutas arbitrariamente escolhidas e, quando necessário, para os diastereoisômeros possíveis. Os espectros finais dos estereoisômeros com configuração contrária às arbitrariamente escolhidas para os cálculos foram obtidos pela multiplicação dos últimos por (-1).

Inicialmente, uma representação computacional das moléculas de interesse, com configuração definida, foi criada por meio de software gráfico. Sobre essas, realizaram-se otimizações geométricas e buscas conformacionais no nível de teoria de mecânica molecular, empregando os campos de força MM+ e MMFF, incorporados nos softwares Hyperchem 7 (Hypercube) e Spartan 08 (Wavefunction, Inc.), respectivamente. Os confôrmeros que apresentaram menor energia foram selecionados e otimizados geometricamente utilizando métodos TFD, geralmente no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). A confirmação desses confôrmeros de menor energia como mínimos reais foi obtida a partir da análise vibracional (número de frequências imaginárias). Vale ressaltar que o cálculo da distribuição de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia considera a energia livre de Gibbs obtida durante a análise vibracional.

No caso das simulações de espectros no IV e de DCV para os confôrmeros selecionados, empregou-se o mesmo nível de teoria utilizado durante a otimização geométrica. As forças rotacionais e dipolares geradas pelo software Gaussian foram convertidas em valores de absorvidade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e plotadas como a soma de bandas Lorentzianas com 6 cm^{-1} de largura a meia altura. Os números de onda calculados foram multiplicados pelos fatores 0,97 ou 0,98, dependendo da função de base escolhida, e, o espectro final, o qual consiste da soma dos espectros dos confôrmeros segundo distribuição de Boltzmann, foi plotado utilizando o software Origin.

Para simulações dos espectros de DCE foram considerados os mesmos confôrmeros de menor energia obtidos na etapa de otimização geométrica, no entanto, utilizou-se TFDTD para calcular as energias de excitação (em nm) e as forças rotacionais R , na forma de velocidade dipolar (R_{vel} unidades cgs: $10^{-40} \text{ erg esu cm Gauss}^{-1}$), no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p). As forças rotacionais calculadas

para as primeiras transições eletrônicas singleto → singleto foram simuladas em uma curva de DCE utilizando função Gaussiana. As frequências de excitação calculadas foram utilizadas sem nenhum escalonamento adicional.

Para as análises estereoquímicas por DCV, o nível de confiança de cada assinalamento foi obtido através do software CompareVOA (BioTools, Inc.), o qual oferece comparação quantitativa direta entre os espectros experimentais e calculados, como uma medida do grau de correlação entre eles. Esse software ainda calcula o índice de similaridade enantiomérica (ISE) e a posição de um dado assinalamento em relação a uma base de dados interna.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de **4**, isolados de *Peperomia obtusifolia*

Na escala temporal de desenvolvimento desse trabalho, o cromano **4**, o qual também está presente como subunidade em todos os ésteres com monoterpenos identificados em *P. obtusifolia*, foi o primeiro composto a ter a configuração absoluta determinada por meio de métodos quiróticos. Assim, a discussão a respeito da estereoquímica absoluta dos benzopiranos isolados nesse projeto será iniciada por **4**. Além disso, os resultados obtidos para o composto em questão foram decisivos para a escolha das estratégias empregadas nos outros metabólitos secundários de interesse.

2.4.1.1 Medidas experimentais

Os enantiômeros de **4**, denominados **4.1** e **4.2**, foram inicialmente analisados por DCE, cujos espectros foram interpretados com base na regra empírica de helicidade do cromofóro cromano (SNATZKE; HO, 1971; ANTUS et al., 2001). As medidas experimentais foram realizadas por injeção direta, em CHCl₃, utilizando 1,0 mg/mL de cada enantiômero e cela de amostra com caminho óptico de 1,0 cm. A linha de base dos espectros experimentais foi corrigida pela subtração do espectro de DCE obtido para o solvente utilizado.

Os enantiômeros de **4** foram também avaliados por DCV e cálculos TFD/TFTTD, a fim de confirmar o assinalamento prévio por DCE. Para tanto, 5 mg de cada enantiômero foi dissolvido em 100 μ L de CDCl₃ e os dados coletados por 11 h, com aquisição de 11 blocos de 1 h cada (55 scans/min). A linha de base dos espectros foi corrigida pela subtração dos espectros de DCV de um enantiômero e do seu antípodo, seguido de divisão por 2.

2.4.1.2 Métodos computacionais

Para a predição dos espectros, tanto de DCV quanto de DCE, a configuração (*R*)-C-2 foi escolhida. Devido a flexibilidade da molécula em questão, os primeiros passos de busca conformacional e otimização geométrica foram realizados para um fragmento da molécula **4** (Figura 71, pág. 127). As buscas conformacionais foram realizadas no nível de teoria de mecânica molecular empregando os campos de força MM+ e MMFF, incorporados nos softwares Hyperchem e Spartan, respectivamente. Para a molécula fragmento, os confôrmeros que apresentaram energia relativa (*E* rel) de até 6 kcal/mol em relação ao confôrmero de menor energia foram selecionados e otimizados geometricamente no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). Dos 54 confôrmeros calculados, 11, os quais apresentaram distribuição de Boltzmann $\geq 2\%$, foram selecionados para construção da molécula completa **4**. A fim de obter melhor correlação entre os espectros calculados e experimentais, a partir desse ponto, todos os cálculos foram realizados considerando **4** como um aduto com ácido fórmico. Após a adição das unidades isoprênicas, foi realizada uma nova busca conformacional no nível de teoria de mecânica molecular, no entanto, os núcleos pré-otimizados não foram sondados. Como resultado, 48 confôrmeros (*E* rel ≤ 3 kcal/mol) foram identificados e tiveram suas geometrias otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). A partir de 8 confôrmeros encontrados com *E* rel $\leq 1,4$ kcal/mol, os quatro com menor energia, que corresponderam a mais de 80% da distribuição de Boltzmann total, foram considerados para os cálculos dos espectros no IV e de DCV, no mesmo nível de teoria. Os números de onda obtidos a partir dos cálculos foram multiplicados pelo fator 0,97. Para esse composto, não foram selecionadas torções na hidroxila fenólica, uma vez que dados experimentais adicionais (RMN de ^1H , δ 11,5, s, 1H) revelaram que a mesma encontra-se quelada ao grupo carbonila posicionado em *orto*.

A comparação entre os espectros experimentais e preditos foi inicialmente realizada de maneira visual, seguida da confirmação do assinalamento proposto por meio do uso do algoritmo de índice de confiança (DEBIE et al., 2011) incorporado no software CompareVOA.

Para os cálculos dos espectros de DCE, os mesmos quatro confôrmeros de menor energia considerados para os cálculos de DCV, sem simulação de aduto com ácido fórmico, foram utilizados. Cálculos TFDTD foram empregados para calcular as

energias de excitação (em nm) e as forças rotacionais R , na forma de velocidade dipolar (R_{vel} unidades cgs: 10^{-40} erg esu cm Gauss $^{-1}$), no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p). As forças rotacionais calculadas para as primeiras 20 transições eletrônicas singleto \rightarrow singleto foram simuladas em uma curva de DCE utilizando função Gaussiana com 10 nm de largura da banda a meia altura.

A eficiência do emprego de B3LYP/6-31G(d) para otimização geométrica e cálculos dos espectros no IV e DCV, bem como de B3LYP/6-311++G(2d,2p) para simulações dos espectros de DCE foi previamente demonstrada (FREDMANN et al., 2003; AUTSCHBACH, 2009).

2.4.2 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de **3, isolados de *Peperomia obtusifolia***

2.4.2.1 Medidas experimentais

Os enantiômeros de **3**, denominados **3.1** e **3.2**, foram inicialmente analisados por DCE, cujos espectros foram comparados aos obtidos para seu análogo estrutural **4**, previamente assinalado. As medidas experimentais foram realizadas por aprisionamento dos picos ao eluirm da coluna cromatográfica, em *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v), utilizando 1,0 mg/mL de cada enantiômero, volume de injeção de 20 μ L e cela de amostra com caminho óptico de 1,0 cm. A linha de base dos espectros experimentais foi corrigida pela subtração do espectro de DCE obtido para o solvente utilizado.

Os enantiômeros de **3** foram também avaliados por DCV e cálculos TFD/TFDTD, a fim de confirmar o assinalamento prévio por DCE. Para tanto, 5 mg de cada enantiômero foi dissolvido em 100 μ L de CDCl_3 e os dados coletados por 11 h, com aquisição de 11 blocos de 1 h cada (55 scans/min). A linha de base dos espectros foi corrigida pela subtração dos espectros de DCV de um enantiômero e do seu antípodo, seguido de divisão por 2.

2.4.2.2 Métodos computacionais

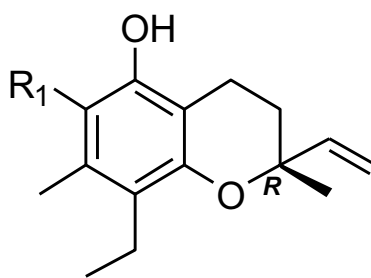
Para a predição dos espectros, tanto de DCV quanto de DCE, a configuração (*R*)-C-2 foi escolhida para **3**. Devido a flexibilidade da molécula em questão, os primeiros passos de busca conformacional e otimização geométrica também foram realizados para uma molécula fragmento (Figura 71, pág. 127). As buscas conformacionais foram realizadas no nível de teoria de mecânica molecular empregando os campos de força MM+ e MMFF. Para a molécula fragmento, os confômeros que apresentaram E_{rel} de até 6 kcal/mol em relação ao confômero de menor energia foram selecionados e otimizados geometricamente no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). Dos 44 confômeros calculados, 24, os quais apresentaram distribuição de Boltzmann $\geq 2\%$, foram selecionados para construção da molécula completa **3**. Após a adição das unidades isoprênicas, foi realizada uma nova busca conformacional no nível de teoria de mecânica molecular, no entanto, os núcleos pré-otimizados não foram sondados. Como resultado, 53 confômeros ($E_{rel} \leq 3$ kcal/mol) foram identificados e tiveram suas geometrias otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). A partir de 10 confômeros encontrados com $E_{rel} \leq 1,4$ kcal/mol, os quatro com menor energia, que corresponderam a mais de 75% da distribuição de Boltzmann total, foram considerados para os cálculos dos espectros no IV e de DCV, no mesmo nível de teoria. Os números de onda obtidos a partir dos cálculos foram multiplicados pelo fator 0,97.

A comparação entre os espectros experimentais e preditos foi inicialmente realizada de maneira visual, seguida da confirmação do assinalamento proposto por meio do uso do algoritmo de índice de confiança incorporado no software CompareVOA.

Para os cálculos dos espectros de DCE, os mesmos quatro confômeros de menor energia considerados para os cálculos de DCV foram utilizados. Cálculos TFDTD foram empregados para calcular as energias de excitação (em nm) e as forças rotacionais R , na forma de velocidade dipolar (R_{vel} unidades cgs: 10^{-40} erg esu cm Gauss⁻¹), no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p). As forças rotacionais calculadas para as primeiras 20 transições eletrônicas singleto \rightarrow singleto foram simuladas em

uma curva de DCE utilizando função Gaussiana com 10 nm de largura da banda a meia altura.

Figura 71 - Fragmentos utilizados nas etapas iniciais de busca conformacional e otimização geométrica de **3** e **4**



Frag 3- $R_1 = H$

Frag 4- $R_1 = COOH$

2.4.3 Determinação da configuração absoluta de 1.1-1.4 e 2.1-2.2, isolados de *Peperomia obtusifolia*

2.4.3.1 Medidas experimentais

Todos os ésteres de cromano com monoterpenos isolados das partes aéreas de *P. obtusifolia* tiveram a configuração absoluta, em seus quatro centros estereogênicos, determinada por DCV e cálculos TFD. Durante a separação desses estereoisômeros em coluna quiral, os espectros de DCE também foram obtidos por aprisionamento dos picos ao eluirm do cromatógrafo, no entanto, esses espectros não foram suficientes para o assinalamento da configuração absoluta da porção monoterpênica devido a ausência de cromóforo UV-Vis. As medidas experimentais de DCV foram realizadas com 6-10 mg de cada amostra em 100 μ L $CDCl_3$, com aquisição de 11 blocos de 1 h cada (55 scans/min). Todos os espectros experimentais foram subtraídos dos espectros obtidos para o solvente $CDCl_3$, em condições idênticas às descritas para as amostras de interesse, a fim de corrigir a linha de base do espectro de DCV.

2.4.3.2 Métodos computacionais

Como uma extensiva busca conformacional foi realizada para (*R*)-**4**, o qual está presente como subunidade em todos os ésteres com monoterpenos isolados de *P. obtusifolia*, os quatro confôrmeros de menor energia otimizados previamente foram utilizados na construção do modelo computacional dos ésteres **1** e **2**. Além disso, como as análises por RMN dos ésteres isolados **1.1-1.4** e **2.1-2.2** revelaram o H-2''' na posição exo dos núcleos bornila e fenchila, apenas as configurações 1'''*R*,2'''*S*,4'''*R* e 1'''*S*,2'''*R*,4'''*S* foram consideradas para a série **1** e 1'''*R*,2'''*R*,4'''*S* e 1'''*S*,2'''*S*,4'''*R* para a série **2**.

Após a adição dos monoterpenos borneol e fenchol aos núcleos pré-otimizados do cromano **4**, foi realizada busca conformacional no nível de teoria de mecânica molecular empregando os campos de força MM+ e MMFF. Para cada configuração apenas quatro confôrmeros significativos foram identificados, com $E_{rel} \leq 6,0$ kcal/mol. Esses confôrmeros, os quais corresponderam a mais de 90% da distribuição de Boltzmann total, foram então otimizados geometricamente e tiveram suas frequências no IV e DCV calculadas em dois níveis de teoria diferentes, B3LYP/6-31G(d) e B3PW91/TZVP. A fim de melhorar a correlação entre os espectros calculados e experimentais, em alguns cálculos, os confôrmeros de menor energia de (*S*)-C-2 foram empregados. Os números de onda obtidos a partir dos cálculos empregando B3LYP/6-31G(d) foram multiplicados pelo fator 0,97 e aqueles a partir de B3PW91/TZVP pelo fator 0,98 (LOMBARDI; NAFIE, 2009).

A comparação entre os espectros experimentais e preditos foi inicialmente realizada de maneira visual, seguida da confirmação do assinalamento proposto por meio do uso do algoritmo de índice de confiança incorporado no software CompareVOA.

2.4.4 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de **5**, isolados de *Piper gaudichaudianum*

2.4.4.1 Medidas experimentais

Os enantiômeros de **5**, denominados **5.1** e **5.2**, foram inicialmente analisados por DCE, cujos espectros foram comparados aos descritos na literatura (LAGO et al., 2004) bem como aos calculados utilizando TFDTD. As medidas experimentais foram realizadas por aprisionamento dos picos ao eluirm da coluna cromatográfica, em *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v), utilizando 1,0 mg/mL de cada enantiômero, volume de injeção de 20 μ L e cela de amostra com caminho óptico de 1,0 cm. A linha de base dos espectros experimentais foi corrigida pela subtração do espectro de DCE obtido para o solvente utilizado.

Os enantiômeros de **5** foram também avaliados por DCV e cálculos TFD, a fim de confirmar o assinalamento prévio por DCE. Para tanto, 1,5 mg de cada enantiômero foi dissolvido em 100 μ L de CDCl_3 e os dados coletados por 11 h, com aquisição de 11 blocos de 1 h cada (55 scans/min). A linha de base dos espectros foi corrigida pela subtração dos espectros de DCV de um enantiômero e do seu antípodo, seguido de divisão por 2.

2.4.4.2 Métodos computacionais

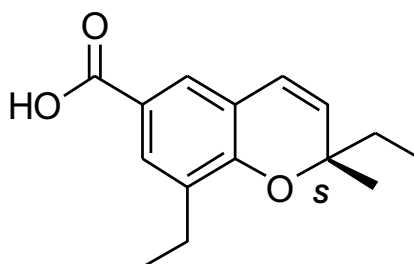
Para a predição dos espectros, tanto de DCE quanto de DCV, a configuração (S)-C-2 foi escolhida, já que corresponde à configuração previamente descrita para (+)-**5** (LAGO et al., 2004). Devido a flexibilidade da molécula em questão, os primeiros passos de busca conformacional e otimização geométrica também foram realizados para uma molécula fragmento (Figura 72, pág. 130). As buscas conformacionais foram realizadas no nível de teoria de mecânica molecular empregando os campos de força MM+ e MMFF. Para o fragmento do composto **5**, foram encontrados 32 confôrmeros com E rel de até 6 kcal/mol em relação ao confôrmero de menor energia, os quais foram otimizados geometricamente no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). Desses 32 confôrmeros, 13, os quais apresentaram distribuição de Boltzmann $\geq 2\%$, foram selecionados para criação computacional de **5**. Após a adição das unidades isoprênicas, uma nova busca conformacional foi realizada, no entanto, as porções pré-

otimizadas não foram sondadas. Como resultado, 70 confôrmeros ($E_{\text{rel}} \leq 3$ kcal/mol) foram identificados e suas geometrias otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). Dentre os 19 confôrmeros com $E_{\text{rel}} \leq 1.0$ kcal/mol, os oito com menor energia foram considerados para a simulação dos espectros de DCE.

A TFDTD foi empregada para calcular as energias de excitação (em nm) e as forças rotacionais R , na forma de velocidade dipolar (R_{vel} unidades cgs: 10^{-40} erg esu cm Gauss $^{-1}$), no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p). As forças rotacionais calculadas para as primeiras 14 transições eletrônicas singleto \rightarrow singleto foram simuladas em uma curva de DCE utilizando função Gaussiana com 15 nm de largura da banda a meia altura.

Os espectros no IV e de DCV foram calculados no nível de teoria B3LYP/6-31G(d), considerando os mesmos oito confôrmeros de menor energia obtidos para o DCE, no entanto, simulados como adutos com ácido fórmico. Os números de onda calculados foram multiplicados pelo fator 0,97.

Figura 72 - Fragmento utilizado nas etapas iniciais de busca conformacional e otimização geométrica de **5**



2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de 3 e 4, isolados de *Peperomia obtusifolia*

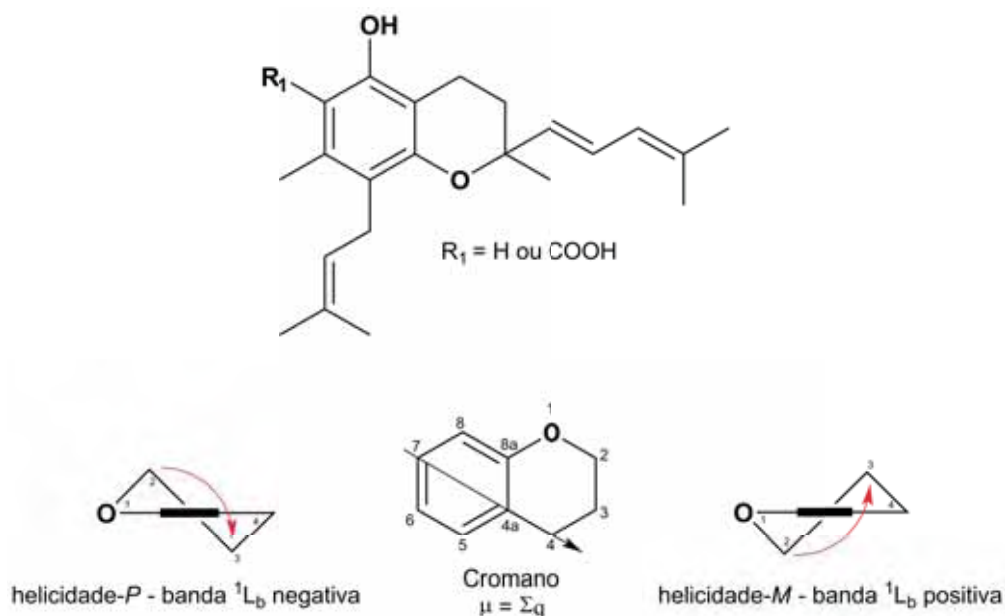
Os enantiômeros do cromano **4**, **4.1** $\{[\alpha]_D^{25} = -6 (c 0,3; CHCl_3)\}$ e **4.2** $\{[\alpha]_D^{25} = +6 (c 0,3; CHCl_3)\}$, tiveram seus espectros de DCE inicialmente interpretados com base na regra empírica de helicidade do cromóforo cromano. O referido cromóforo pertence à classe do cromóforo benzeno com uma segunda esfera quiral, de acordo com a nomenclatura proposta por Snatzke e Ho (1971). Dessa forma, o cromóforo benzeno (primeira esfera), o qual é aquiral, seria perturbado pela assimetria do anel heterocíclico fundido ao mesmo (segunda esfera) e pelos substituintes do último (terceira esfera), o que geraria os EC observados. De grande importância para assinalamento da configuração absoluta de moléculas contendo esse sistema, destaca-se a banda 1L_b em torno de 280 nm, uma vez que essa é menos propícia à sobreposições do que a banda 1L_a entre 200-240 nm. Caso a relação entre a helicidade do anel não aromático e o sinal do EC em torno de 280 nm seja conhecida, a conformação do anel heterocíclico pode ser deduzida. Como a configuração relativa pode ser obtida por meio de experimentos de RMN, a combinação dessas duas técnicas fornece a configuração absoluta de uma dada molécula (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005).

A regra de helicidade do cromóforo benzeno foi inicialmente desenvolvida para tetralinas e tetraidroisoquinolinas quirais (SNATZKE; HO, 1971) e expandida para isocromanos e 1,4-benzodioxanos. Essa regra determina que, no caso de não haver substituintes pseudodaxiais no carbono benzílico e o anel aromático não ser substituído, a helicidade-*P* (ângulo diédrico C-8a, O, C-2, C-3 positivo) do anel heterocíclico gera efeito Cotton positivo na região da banda 1L_b enquanto que helicidade-*M* (ângulo diédrico C-8a, O, C-2, C-3 negativo) gera efeito Cotton negativo para a mesma banda (Figura 73, pág. 132) (ANTUS et al., 2001).

No caso do cromóforo cromano, a substituição de uma unidade metilênica pelo oxigênio do anel 3,4-diidro-2*H*-pirano introduz um grupo com intenso momento

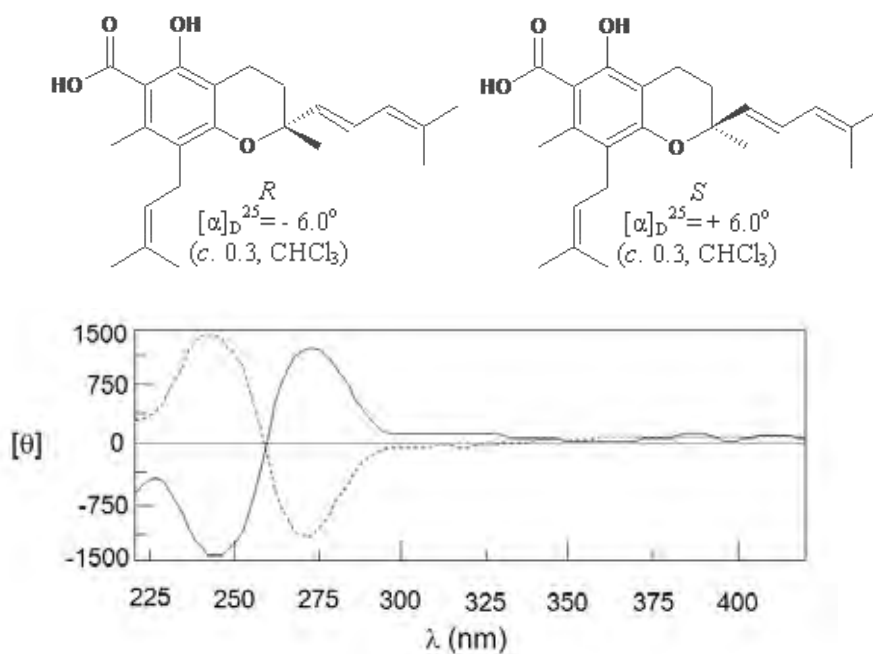
espectroscópico ($q = 21$). Assim, o vetor momento de transição elétrica da molécula (μ), o qual é resultante da soma dos momentos espectroscópicos de cada transição individual, é desviado em aproximadamente 30° . Esse desvio leva à inversão da regra de helicidade descrita acima, ou seja, helicidade *P* geraria efeito Cotton negativo para banda 1L_b , enquanto que helicidade *M* geraria efeito Cotton positivo (Figura 73, pág. 132) (ANTUS et al., 2001).

Figura 73 - Regra de helicidade ou sinal da contribuição da segunda esfera quiral para a banda 1L_b em cromanos. A seta representa o vetor momento de transição elétrico



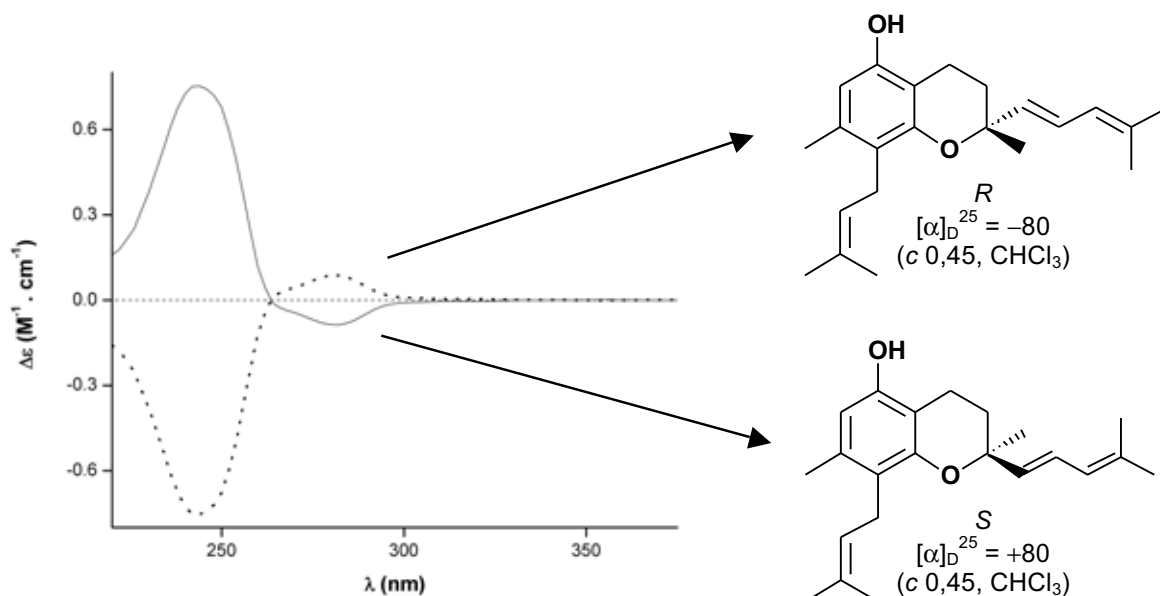
Assim, devido ao fato da helicidade da meia cadeia formada pela porção heterocíclica do cromóforo cromano ser governada pela distribuição dos substituintes no referido anel e os substituintes mais volumosos ocuparem preferencialmente a posição equatorial, a configuração absoluta de (-)-**4.1** foi assinalada como *R*, baseada na helicidade-*M* assumida para o anel cromano em combinação com EC positivo observado entre 260-290 nm. Consequentemente, (+)-**4.2** foi assinalado como *S* (BATISTA et al., 2009) (Figura 74, pág. 133).

Figura 74 - Espectro experimental de DCE para os enantiômeros de **4**, assinalados como (-)-*R* (linha contínua) e (+)-*S* (linha tracejada)



Como a molécula **3** possui o mesmo cromóforo presente em **4**, ou seja, o núcleo cromano, seus enantiômeros (-)-**3.1** e (+)-**3.2** também foram assinalados como *R* e *S*, respectivamente, pela interpretação dos dados experimentais de DCE com base na regra empírica descrita anteriormente (Figura 75, pág. 134).

Figura 75 - Espectro experimental de DCE para os enantiômeros de **3**, assinalados como (-)-*R* (linha tracejada) e (+)-*S* (linha contínua)



No entanto, a análise dessas moléculas por DCV, associado a cálculos mecânico-quânticos, revelou uma possível exceção à regra de helicidade do cromóforo cromano e permitiu o reassinalamento da configuração absoluta inicialmente proposta pelo uso de DCE. As etapas de busca conformacional e otimização geométrica identificaram a presença de quatro confôrmeros de menor energia para os cromanos **3** e **4**. É importante destacar, que desses quatro confôrmeros de menor energia, os três primeiros, para ambos os compostos, apresentaram o substituinte mais volumoso ligado a C-2 na posição axial e não equatorial, como assumido *a priori* e amplamente divulgado na literatura.

A comparação entre os espectros experimentais e calculados [B3LYP/6-31G(d)], no IV e de DCV, para **3** e **4** (Figura 76, pág. 135) confirmaram a configuração dos enantiômeros dextrorrotatórios como (*R*)-C-2 e não *S*, como previamente determinado. Além disso, a presença dos fundamentais 77, 88 e 89 no espectro de **3** e do fundamental 94 no espectro de **4**, os quais são praticamente inexistentes para os confôrmeros com a unidade isopentadienílica na posição equatorial, confirma o substituinte mais volumoso em C-2 predominantemente na posição axial (Figuras 77 e

78, pág. 136). O reassinalamento da configuração absoluta de (+)-**3** e (+)-**4** foi corroborado pelo algoritmo de índice de confiança incorporado no software CompareVOA, sendo que para **3** obteve-se valor de ISE = 76,6 e Índice de Confiança de 100% e, para **4**, ISE = 82,2 e Índice de Confiança também de 100%.

Figura 76 - Esquerda: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV para (-)-**3.1** (Preto) e (+)-**3.2** (Vermelho) com o calculado [B3LYP/6-31G(d)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confôrmeros de menor energia obtidos para (*R*)-**3**. Direita: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV para (-)-**4.1** (Preto) e (+)-**4.2** (Vermelho) com o calculado [B3LYP/6-31G(d)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confôrmeros de menor energia obtidos para (*R*)-**4**. Os números representam fundamentais selecionados

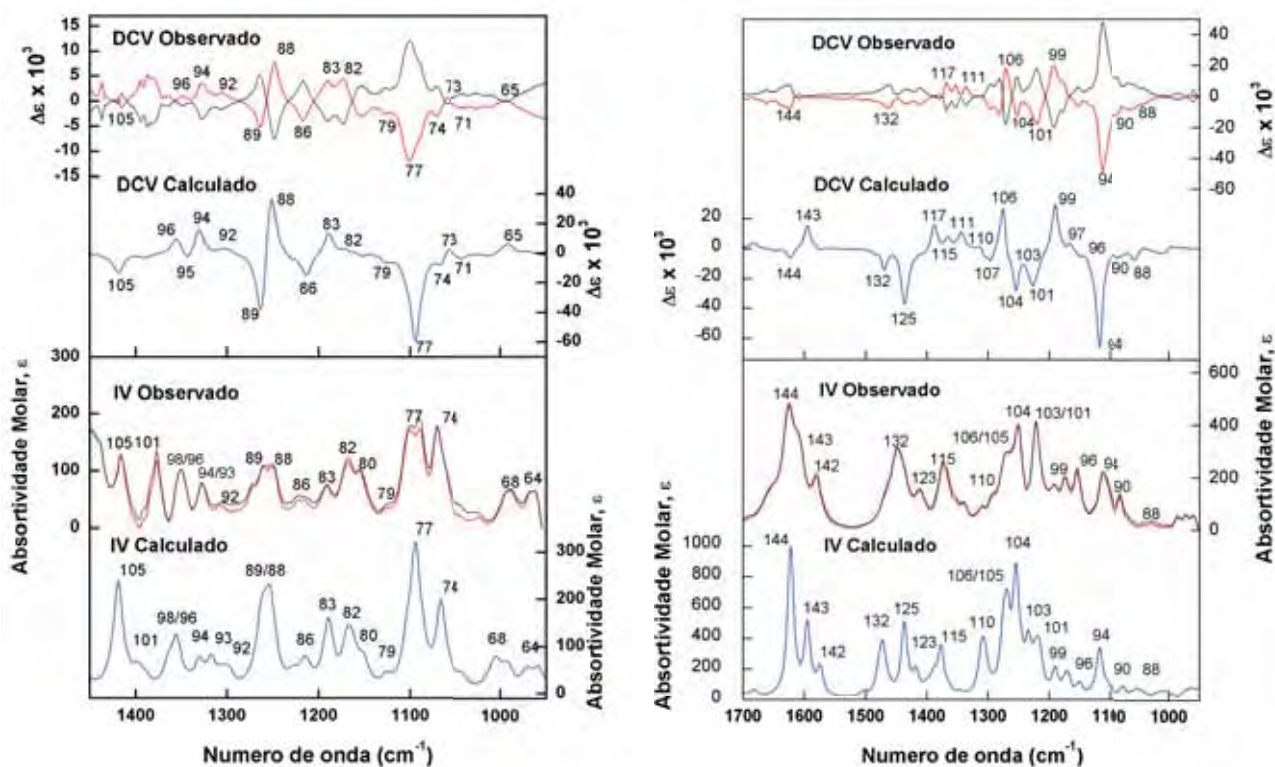


Figura 77 - Espectro de DCV calculado [B3LYP/6-31G(d)], estruturas otimizadas e energia relativa dos confôrmeros de menor energia de (*R*)-**3**

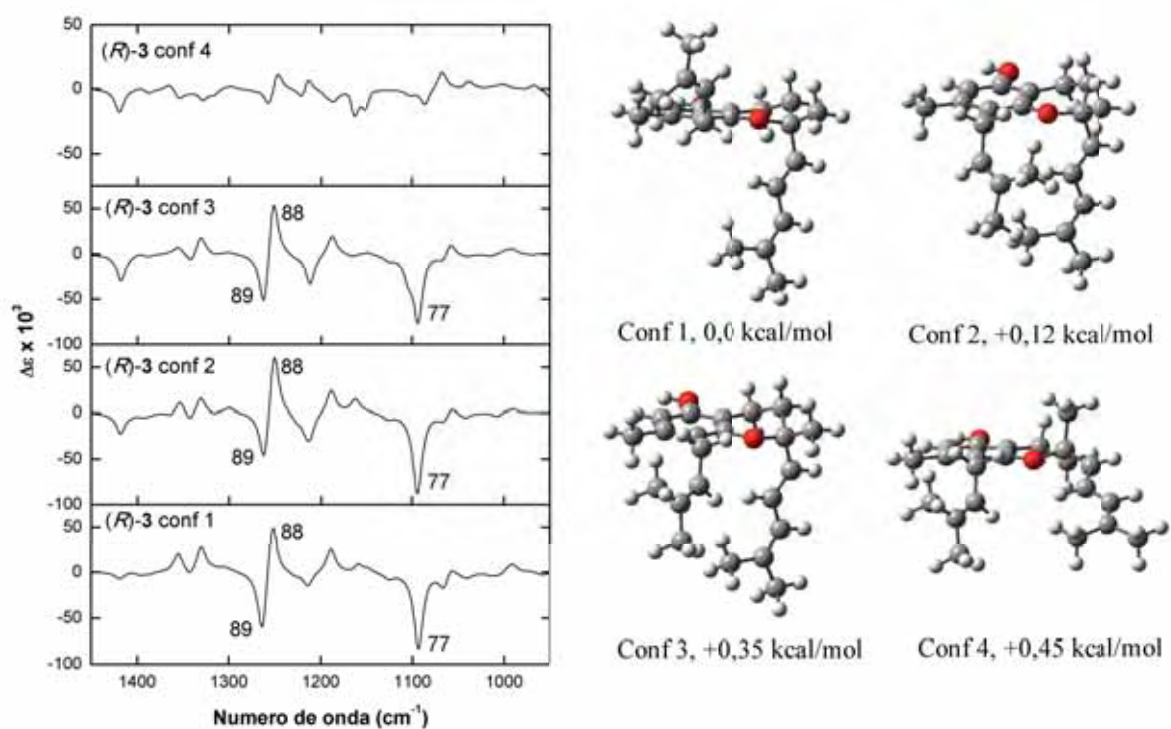
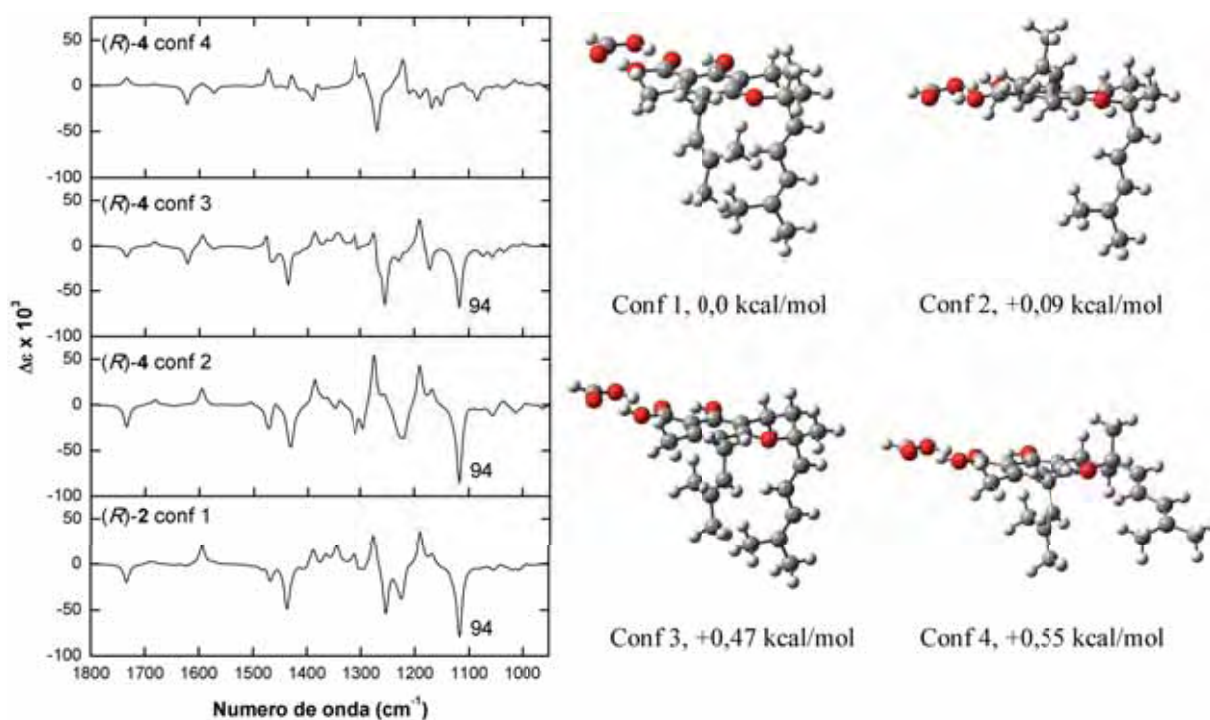


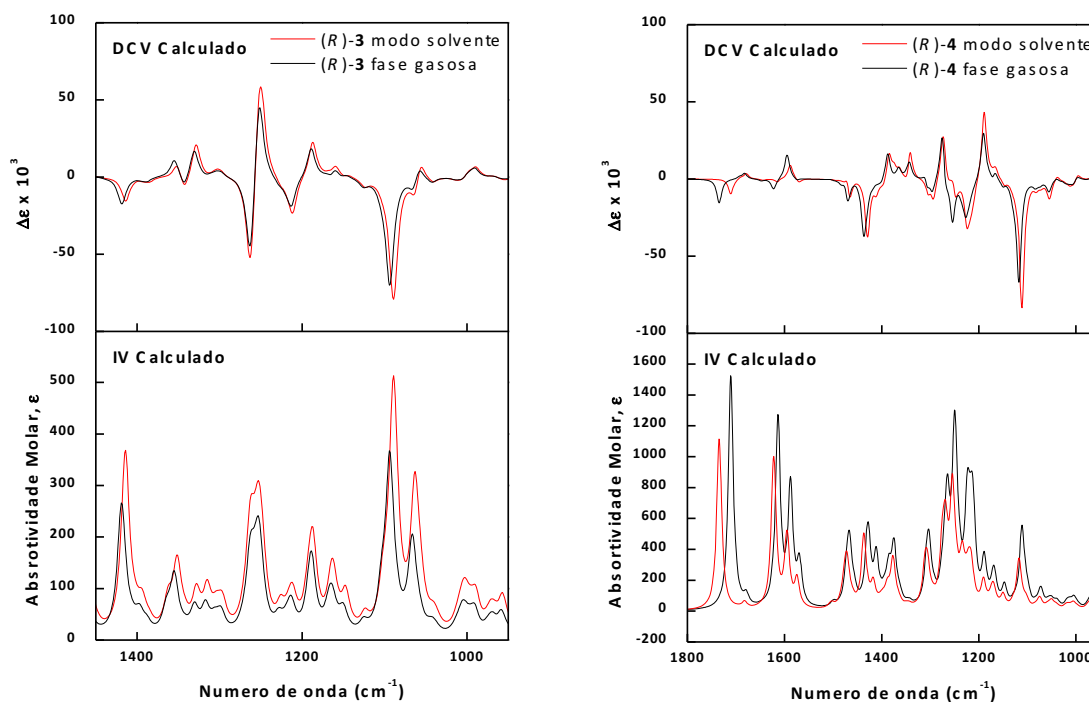
Figura 78 - Espectro de DCV calculado [B3LYP/6-31G(d)], estruturas otimizadas e energia relativa dos confôrmeros de menor energia de (*R*)-**4**



Duas características empregadas nos cálculos de simulação dos espectros de DCV merecem destaque: a ausência da inclusão de modo solvente para as medidas experimentais em CDCl_3 e a simulação de (*R*)-**4** como um aduto com ácido fórmico.

Já é descrito na literatura que, em medidas de DCV utilizando solventes com baixa constante dielétrica, os cálculos em fase gasosa de otimização geométrica e de frequências de DCV são suficientes (FREEDMAN et al., 2003). A fim de confirmar tal proposição, foram também realizados cálculos de predição dos espectros de DCV para (*R*)-**3** e (*R*)-**4**, utilizando o modo solvente SCRF/PCM (CHCl_3), os quais foram comparados àqueles obtidos em fase gasosa. Os resultados confirmam que não há melhorias significativas nos espectros com a inclusão do modo solvente, possibilitando assim a economia de poder computacional no caso de medidas em solventes apolares (Figura 79, pág. 137). Pequenas diferenças observadas entre os dois espectros deve-se, possivelmente, às alterações na distribuição de Boltzmann geradas por mudanças nos parâmetros computacionais.

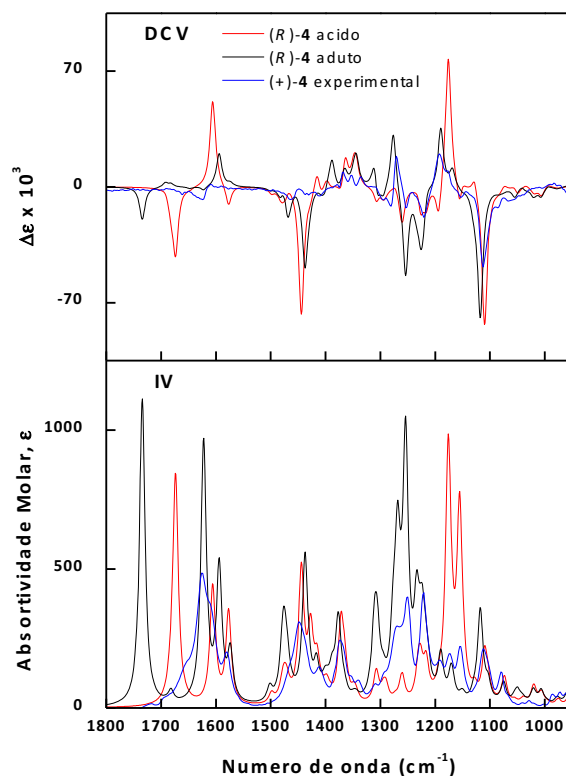
Figura 79 - Espectros de DCV calculados [B3LYP/6-31G(d)] para (*R*)-**3** e (*R*)-**4**, com e sem a inclusão de modo solvente CHCl_3



É consenso que, em soluções concentradas em solventes apolares, moléculas com o grupo funcional ácido carboxílico tendem a formar dímeros intermoleculares, sendo esse fenômeno comum na espectroscopia no IV (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Assim sendo, a simulação de dímeros pode contribuir para uma melhor correlação entre os espectros experimentais e calculados, tanto no IV quanto de DCV (FREEDMAN et al., 2006). Com base no exposto, todos os cálculos realizados nesse trabalho para moléculas contendo essa característica estrutural foram realizados considerando adutos com ácido fórmico. No entanto, para demonstrar a vantagem da simulação de adutos de ácido carboxílico, foram também realizados cálculos dos espectros no IV e DCV para os mesmos confôrmeros de menor energia obtidos para (*R*)-**4**, no entanto, com a função ácido carboxílico livre.

Os resultados demonstram claramente que a simulação considerando adutos com ácido fórmico fornece melhores resultados ao serem comparados aos dados experimentais, tanto em relação ao perfil das bandas quanto às frequências de absorção (Figura 80, pág. 139). A única banda em desacordo com os dados experimentais, o fundamental 125 (Figura 76, pág. 135), é originada justamente pelo estiramento C=O do ácido fórmico utilizado na simulação do aduto. É ainda interessante destacar que o fato dos enantiômeros do cromano **4**, o qual é mais polar que seu análogo **3**, terem menor tempo de retenção em cromatografia em fase normal quando comparados aos enantiômeros do último, corrobora a formação de dímeros em soluções apolares (BATISTA et al., 2010).

Figura 80 - Comparação entre os espectros de DCV calculados [B3LYP/6-31G(d)] para (*R*)-**4**, com e sem a inclusão de aduto com ácido fórmico, e experimental para (+)-**4**



Uma vez que os dados referentes à estereoquímica absoluta de **3** e **4** obtidos por DCV foram opostos àqueles gerados por DCE, nessa etapa, os espectros de DCE para os confôrmeros de menor energia identificados para **3** e **4** foram simulados a fim de compreender melhor os fatores que levaram ao assinalamento prévio incorreto da configuração absoluta dos compostos em questão (BATISTA et al., 2009). Para tais simulações, os mesmos quatro confôrmeros utilizados para os cálculos de DCV foram considerados para os cálculos de DCE empregando TFDTD [B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d)]. Entretanto, para evitar a presença de transições eletrônicas adicionais oriundas da carbonila do ácido fórmico, o composto **4** foi considerado sem o artifício da simulação de adutos. A comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCE confirmaram o assinalamento por DCV, ou seja, os enantiômeros (+)-**3.2** e (+)-**4.2** possuem configuração *R* no centro estereogênico C-2 (Figuras 81 e 82, pág. 140).

Figura 81 - Esquerda: espectros experimentais de DCE para (-)-(S)-**3.1** (linha tracejada) e (+)-(R)-**3.2** (linha contínua). Direita: espectros de DCE calculados [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confômeros de menor energia obtidos para (R)-**3** (vermelho), bem como dos confômeros individuais: conf1 (azul), conf2 (amarelo), conf3 (verde) e conf4 (marrom). As barras representam forças rotacionais para o espectro de DCE médio

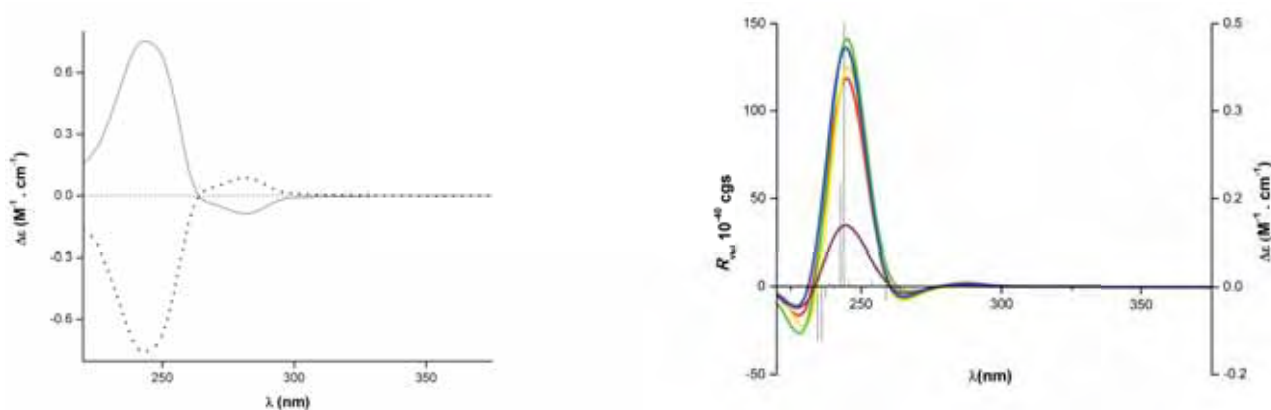
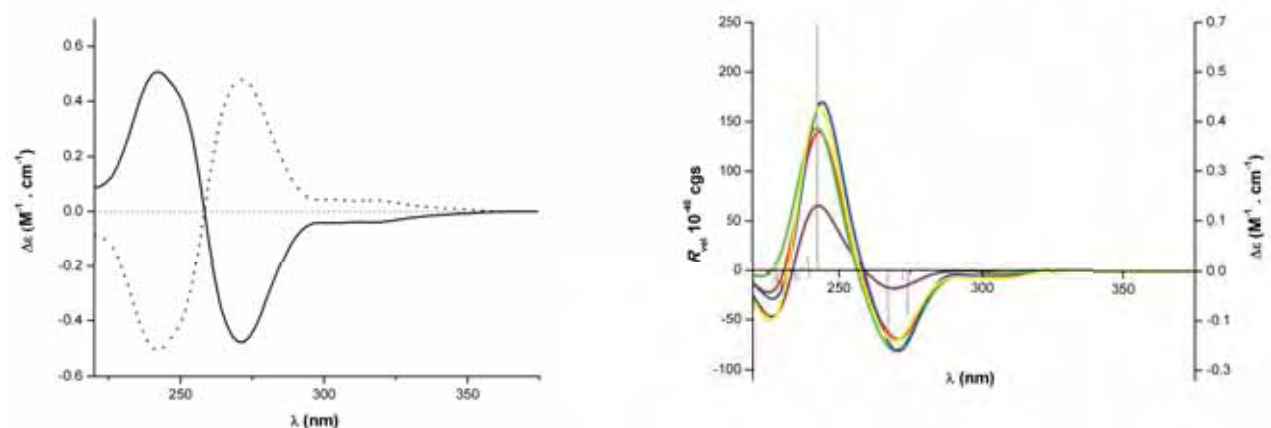


Figura 82 - Esquerda: espectros experimentais de DCE para (-)-(S)-**4.1** (linha tracejada) e (+)-(R)-**4.2** (linha contínua). Direita: espectros de DCE calculados [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] para média, segundo distribuição de Boltzmann, dos quatro confômeros de menor energia obtidos para (R)-**4** (vermelho), bem como dos confômeros individuais: conf1 (verde), conf2 (azul), conf3 (amarelo) e conf4 (marrom). As barras representam forças rotacionais para os espectro de DCE médio



Conforme discutido anteriormente, a helicidade da meia cadeira formada pelo anel heterocíclico fundido ao anel benzeno é o fator que governa a interpretação do espectro de DCE com base na regra empírica da helicidade do cromóforo cromano. A helicidade, por sua vez, é controlada pelo posicionamento dos substituintes no referido anel e, a mudança na conformação da meia cadeira a fim de acomodar o substituinte mais volumoso na posição equatorial, resulta em alteração da helicidade. A partir do conhecimento de que os confôrmeros de menor energia possuem o grupo isopentadienílico na posição axial é possível determinar a helicidade do anel heterocíclico para a configuração (*R*)-C-2, como helicidade-*P* (ângulo diédrico C-8a, O, C-2, C-3 positivo), a qual deve gerar efeito Cotton negativo para a banda 1L_b (260-290 nm).

De acordo com os dados apresentados nas figuras 81 e 82 (pág. 140) pode-se observar que, de fato, temos EC negativo para a referida banda tanto em **3** quanto em **4**. Portanto, caso os cálculos de busca conformacional e otimização geométrica tivessem sido empregados na primeira vez que a configuração absoluta de **4** foi determinada (BATISTA et al., 2009), os confôrmeros com a correta helicidade seriam identificados e, assim, a estereoquímica absoluta seria determinada de forma inequívoca pela utilização da regra empírica acima descrita.

No entanto, uma análise mais cuidadosa dos espectros de DCE obtidos para os confôrmeros de **3** e **4** revelam uma possível exceção à regra de helicidade do cromóforo cromano. Em particular, o confôrmero **4** (Figuras 77 e 78, pág. 136) identificado para ambos os cromanos, o qual apresenta o substituinte volumoso na posição equatorial gerou espectro de DCE com banda 1L_b negativa (linha marrom figuras 81 e 82, pág. 140). Como o confôrmero em questão possui helicidade-*M* (ângulo diédrico C-8a, O, C-2, C-3 negativo) a regra empírica determina que EC gerado deveria ser positivo. Assim, caso essas moléculas possuíssem os confôrmeros de menor energia com o substituinte mais volumoso na posição equatorial, como mais comumente encontrado na literatura, a referida regra não poderia ser utilizada.

Desde o desenvolvimento da regra de helicidade do cromóforo cromano, moléculas com diferentes substituintes no anel aromático foram analisadas. Antus et al. (2001) reportaram que grupos metoxila ou hidroxila nas posições C-2, C-3, C-5 e/ou C-

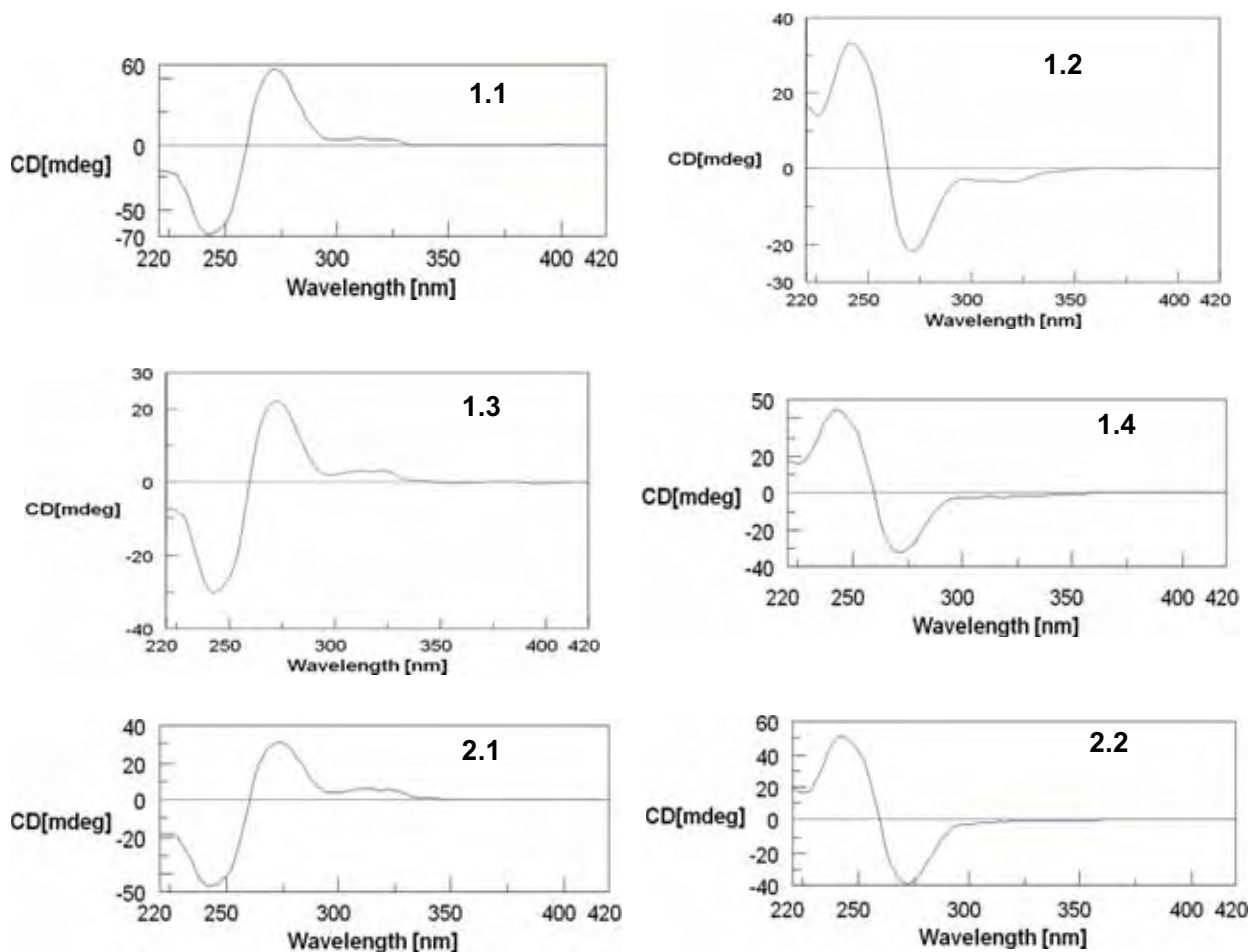
7 não colocariam restrição à utilização da regra, permitindo que essa fosse utilizada para produtos naturais, os quais, frequentemente, apresentam substituintes nessas posições. No entanto, não havia relatos prévios de moléculas com grupamento ácido carboxílico na posição C-6 analisadas por essa regra empírica. Dessa forma, a presença de tal grupamento poderia ser considerada como a responsável pela exceção na regra empírica de helicidade, o que não se confirma, já que o mesmo comportamento foi observado para o cromano **3**, o qual é desprovido de função ácido carboxílico.

Por fim, a análise dos espectros de DCE em comparação com simulações mecânico-quânticas revelaram uma possível exceção à uma regra empírica amplamente utilizada, além do fato que para os cromanos em questão o sinal da transição 1L_b de DCE em torno de 260-290 nm é mais influenciado pela configuração absoluta em C-2 do que pela helicidade do anel heterocíclico fundido ao anel benzeno. Esses resultados reforçam as vantagens da técnica de DCV em relação ao DCE, uma vez que a forma vibracional do DC parece não sofrer exceções, além de sondar de forma equivalente as diferentes fontes de quiralidade de uma dada molécula, ou seja, centros estereogênicos e helicidade.

2.5.2 Determinação da configuração absoluta de 1.1-1.4 e 2.1-2.2, isolados de *Peperomia obtusifolia*

Embora a porção monoterpênica dos ésteres **1.1-1.4** e **2.1-2.2** seja inacessível à técnica de DCE devido a inexistência de cromóforos UV-Vis, o centro estereogênico C-2 pôde ser analisado pela referida técnica, por apresentar sistema cromofórico idêntico ao presente no cromano **4**. Assim, a partir dos espectros de DCE obtidos para **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, em comparação com os dados teóricos e experimentais apresentados para **4**, foi possível o assinalamento da configuração absoluta em C-2 para todos os ésteres de cromanos com monoterpenos. Os espectros de DCE são apresentados na figura 83 (pág. 143).

Figura 83 - Espectros experimentais de DCE para os ésteres de cromanos com monoterpenos **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, isolados de *Peperomia obtusifolia*



A partir dos resultados apresentados na figura 83, comparados com aqueles reportados na figura 82 (pág. 140), é possível concluir que os compostos **1.1**, **1.3** e **2.1**, os quais apresentam EC positivo para a banda 1L_b (260-290 nm), possuem configuração absoluta S em C-2. O inverso também é verdadeiro para os compostos **1.2**, **1.4** e **2.2**, cujo EC negativo para a mesma banda confere configuração R ao centro estereogênico em questão.

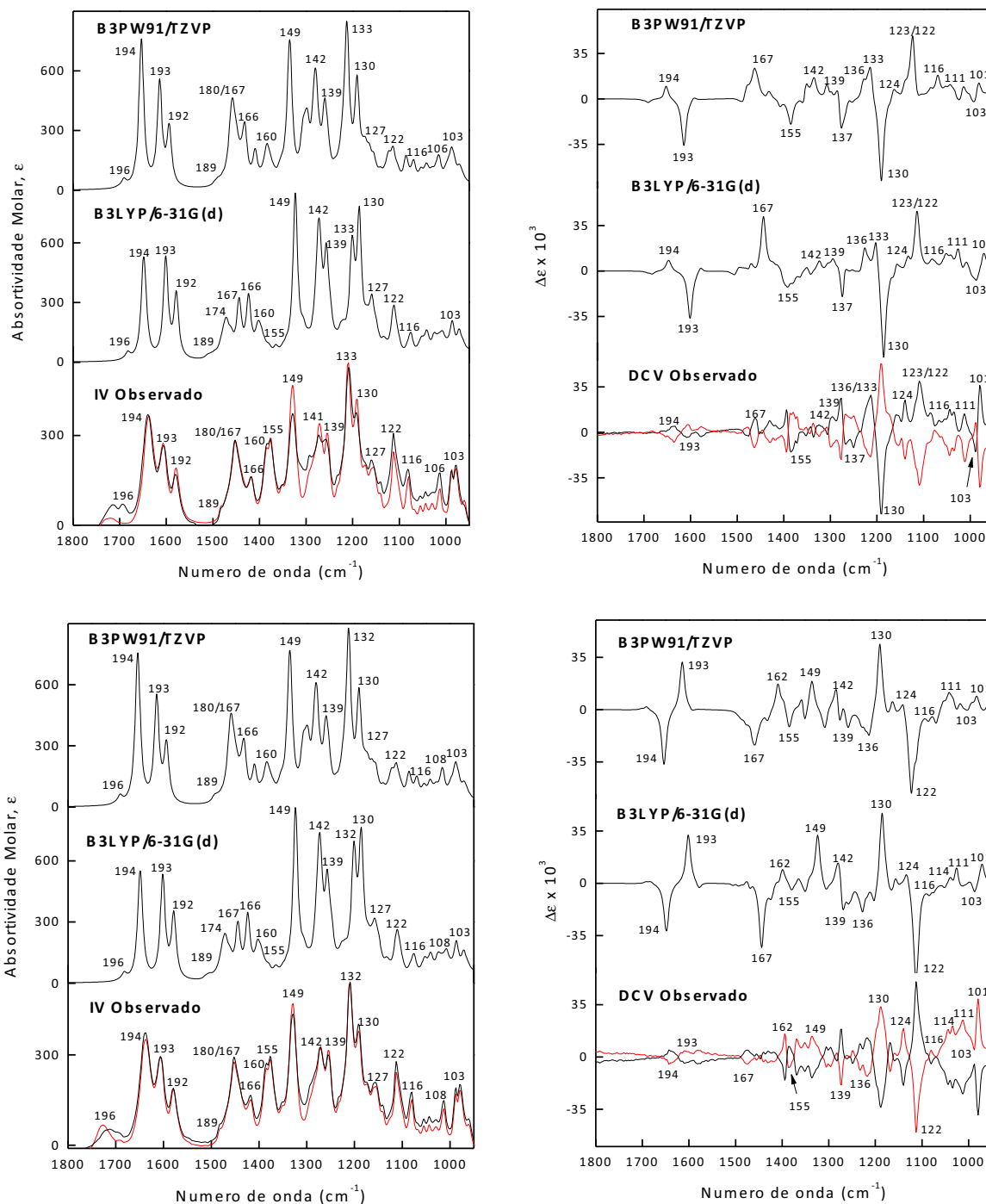
A configuração absoluta dos 4 centros estereogênicos presentes nos ésteres descritos acima só foi definitivamente determinada pela comparação dos espectros experimentais de DCV, para cada estereoisômero, com os resultados dos cálculos

TFD. Como discutido na seção **2.4.3.2**, os mesmos confôrmeros de menor energia indentificados para **4** foram empregados como subunidades nas etapas de busca conformacional, otimização geométrica e cálculos das frequências no IV e de DCV para os ésteres com monoterpenos. Duas combinações de funcionais híbridos e funções de bases foram empregados nos cálculos, incluindo B3LYP/6-31G(d), o mais comumente utilizado para DCV (FREEDMAN et al., 2003; NAFIE, 2008), embora considerado algumas vezes como menos preciso (KUPPENS; BULTINCK; LANGENAEKER, 2004; STEPHENS; DEVLIN; PAN, 2008), além de B3PW91/TZVP, o qual utiliza função de base com qualidade tripla zeta de valência, aumentado por funções de polarização. Esse último nível de teoria, em geral, fornece melhores resultados, pelo menos para moléculas pequenas (LOMBARDI; NAFIE, 2009).

Os espectros experimentais e calculados, no IV e de DCV, para todos os estereoisômeros de **1** são apresentados na figura 84 (pág. 145). A partir desses resultados é possível observar uma boa correlação entre os dados experimentais de (-)-**1.1** com aqueles calculados para a configuração $2S,1'''S, 2'''R,4'''S$, utilizando os dois níveis de teoria. Observa-se também que o espectro experimental de (+)-**1.4** é completamente oposto àquele de (-)-**1.1**, o que permitiu assinalá-lo como o enantiômero do último, ou seja, $2R,1'''R, 2'''S,4'''R$. Para os compostos descritos acima, os resultados gerados pelo software CompareVOA foram: ISE = 70,4 para B3LYP/6-31G(d) e ISE = 72,2 para B3PW91/TZVP, ambos com Índice de Confiança de 100%.

Ainda na figura 84, verifica-se que os espectros experimentais de (+)-**1.2** estão de acordo com os calculados para $2R,1'''S, 2'''R,4'''S$. Além disso, o espectro de DCV de (+)-**1.2** é imagem especular do espectro experimental obtido para (-)-**1.3**, o qual teve sua configuração absoluta determinada como $2S,1'''R, 2'''S,4'''R$. Para esses assinalamentos, os resultados gerados pelo software CompareVOA foram: ISE = 66,7 para B3LYP/6-31G(d) e ISE = 70,5 para B3PW91/TZVP, ambos com Índice de Confiança de 100%.

Figura 84 - Superior: espectros experimentais, no IV e de DCV, para (-)-1.1 (preto) e (+)-1.4 (vermelho) e calculados para derivado de borneol com configuração 2*S*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S*. Inferior: espectros experimentais para (+)-1.2 (vermelho) e (-)-1.3 (preto) e calculados para 2*R*,1'''*S*,2'''*R*,4'''*S*. Os números representam fundamentais



Os espectros experimentais e calculados, no IV e de DCV, para os estereoisômeros de **2** são apresentados na figura 85 (pág. 147). A partir desses resultados é possível observar uma ótima correlação entre os dados experimentais de (-)-**2.1** com aqueles calculados para a configuração $2S,1'''R, 2'''R,4'''S$, utilizando os dois níveis de teoria. O composto (+)-**2.2** apresentou a mesma configuração para a porção monoterpênica (região entre $950-1250\text{ cm}^{-1}$), porém inversão no centro C-2, o que permitiu o assinalamento de (+)-**2.2** como $2R,1'''R, 2'''R,4'''S$. Para o composto **2.1**, os resultados gerados pelo software CompareVOA foram: ISE = 70,4 para B3LYP/6-31G(d) e ISE = 75,4 para B3PW91/TZVP, com Índice de Confiança de 100%. Já para **2.2**, ISE = 64,3 para B3LYP/6-31G(d) e ISE = 68,7 para B3PW91/TZVP, também com Índice de Confiança de 100%.

Para todos os compostos avaliados, os cálculos realizados com nível de teoria mais elevado (B3PW91/TZVP) geraram, de fato, resultados melhores, o que se refletiu em maiores valores do índice de similaridade enantiomérica (ISE). Entretanto, a utilização de B3LYP/6-31G(d) provou-se suficiente para um assinalamento não ambíguo, já que o Índice de Confiança foi de 100% para todos os assinalamentos. Adicionalmente, devido ao fato do poder computacional demandado nos cálculos ser diretamente proporcional ao tamanho da função de base utilizada, os cálculos com B3PW91/TZVP foram cerca de sete vezes mais longos que aqueles com B3LYP/6-31G(d). Por fim, os confôrmeros de menor energia identificados utilizando ambas as combinações de funcionais híbridos e funções de base não apresentaram diferenças significativas (Figuras 86 e 87, págs. 148 e 149), o que corrobora o uso de B3LYP/6-31G(d) para a simulação de espectro de DCV de moléculas de porte médio a grande.

Em se tratando dos espectros de DCV para os estereoisômeros de **1** e **2**, fica evidente a presença de certas transições vibracionais que podem ser correlacionadas com a estereoquímica da porção monoterpênica e do núcleo cromano, independentemente. Em particular, os fundamentais 101, 103, 111 e 116 são devidos a vibrações da porção terpênica, enquanto 122/123 e 130, os quais sempre apresentam sinais opostos um ao outro, são um marcador preciso da configuração de C-2. Uma combinação negativa e positiva, da região de menor para maior frequência, determina a configuração *R*. O oposto corresponde à configuração *S*.

Figura 85 - Superior: espectros experimentais, no IV e de DCV, para (-)-**2.1** e calculados para derivado de fenchol com configuração $2S,1''R,2''R,4''S$. Inferior: espectros experimentais para (+)-**2.2** e calculados para $2R,1''R,2''R,4''S$. Os números representam fundamentais

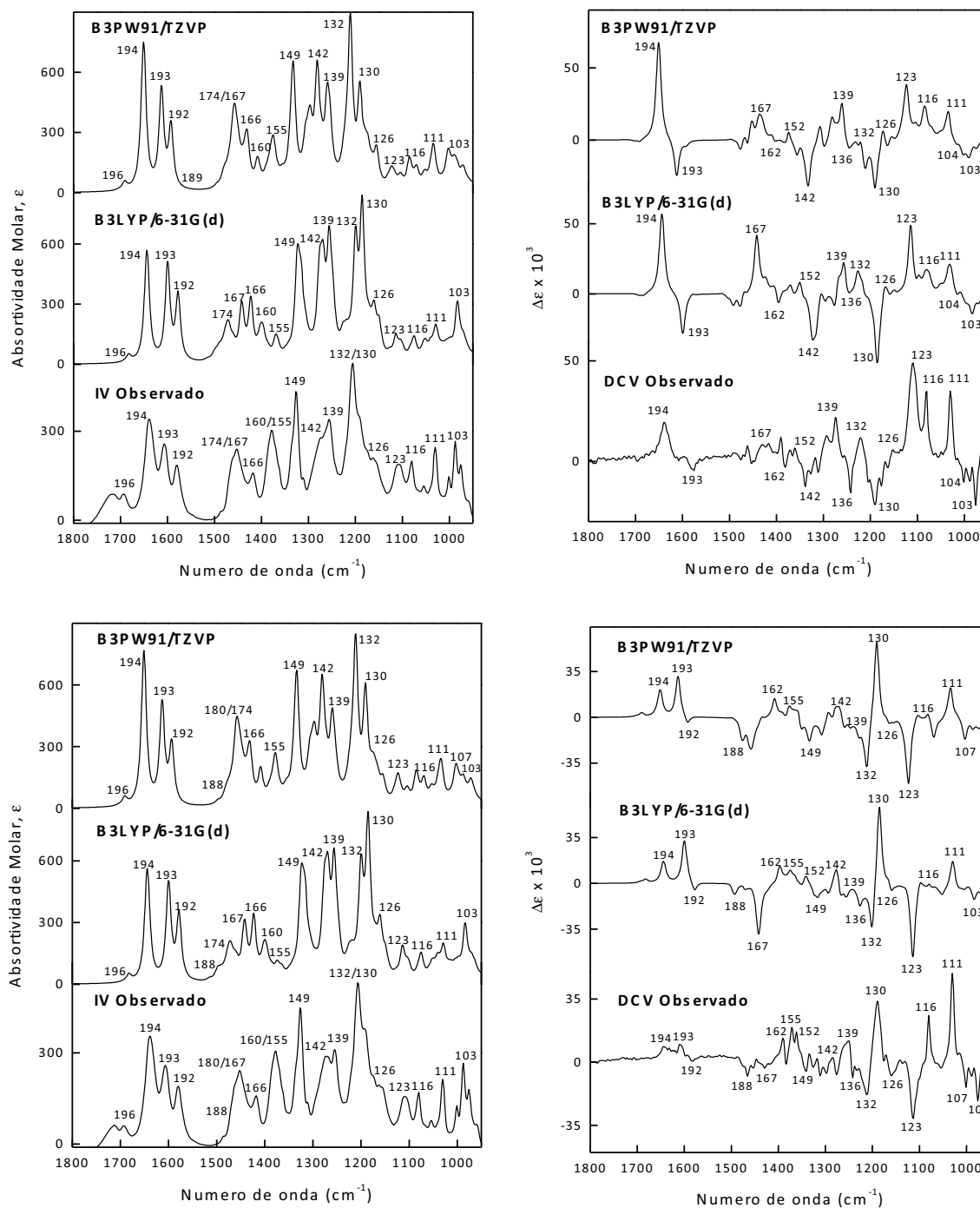


Figura 86 - Superposição de estruturas otimizadas e energias relativas dos quatro confôrmeros de menor energia identificados para derivados de borneol com configurações 2*S*,1'''*S*, 2'''*R*,4'''*S* (acima) e 2*R*,1'''*S*, 2'''*R*,4'''*S* (abaixo), utilizando tanto B3LYP/6-31G(d) quanto B3PW91/TZVP

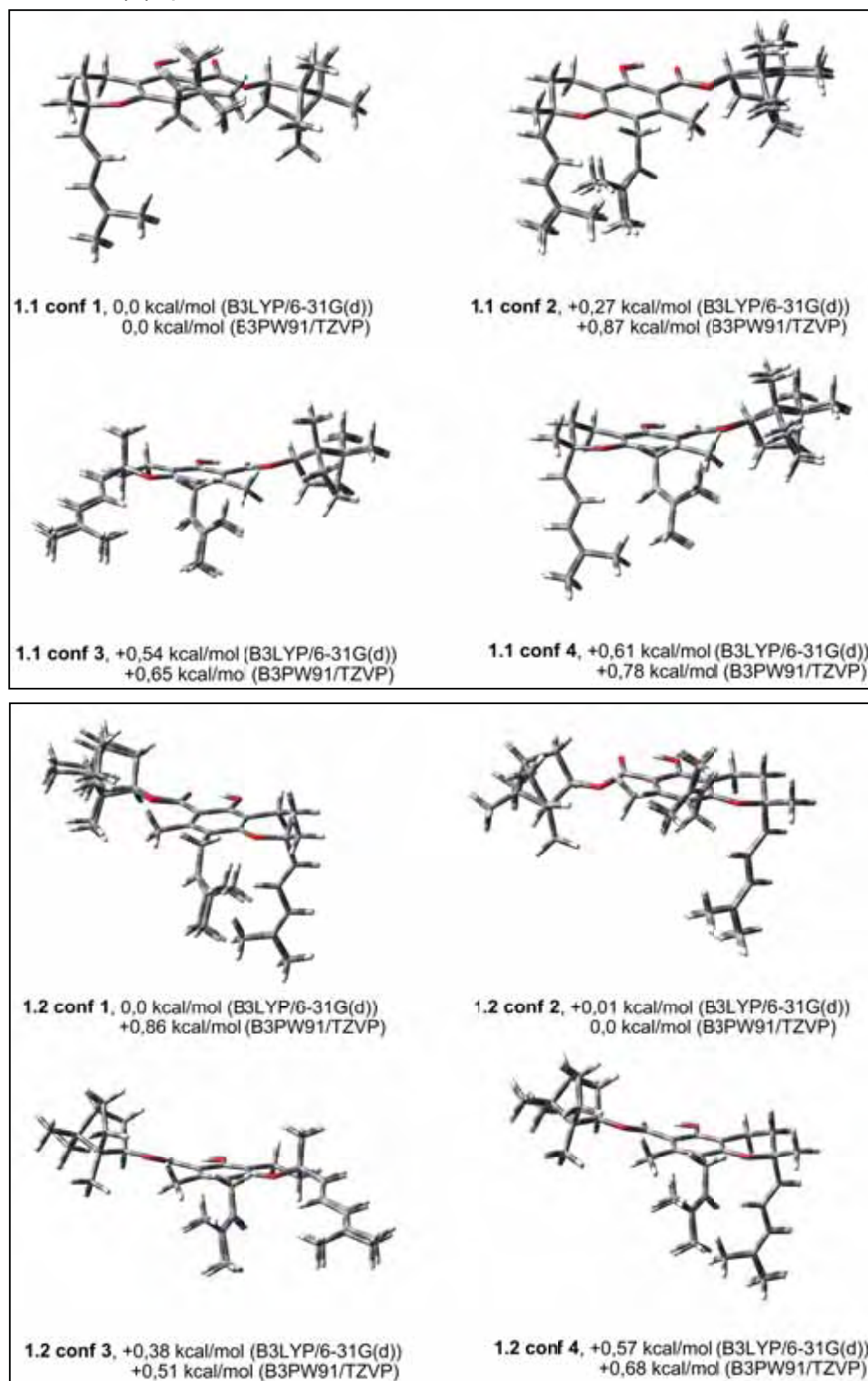
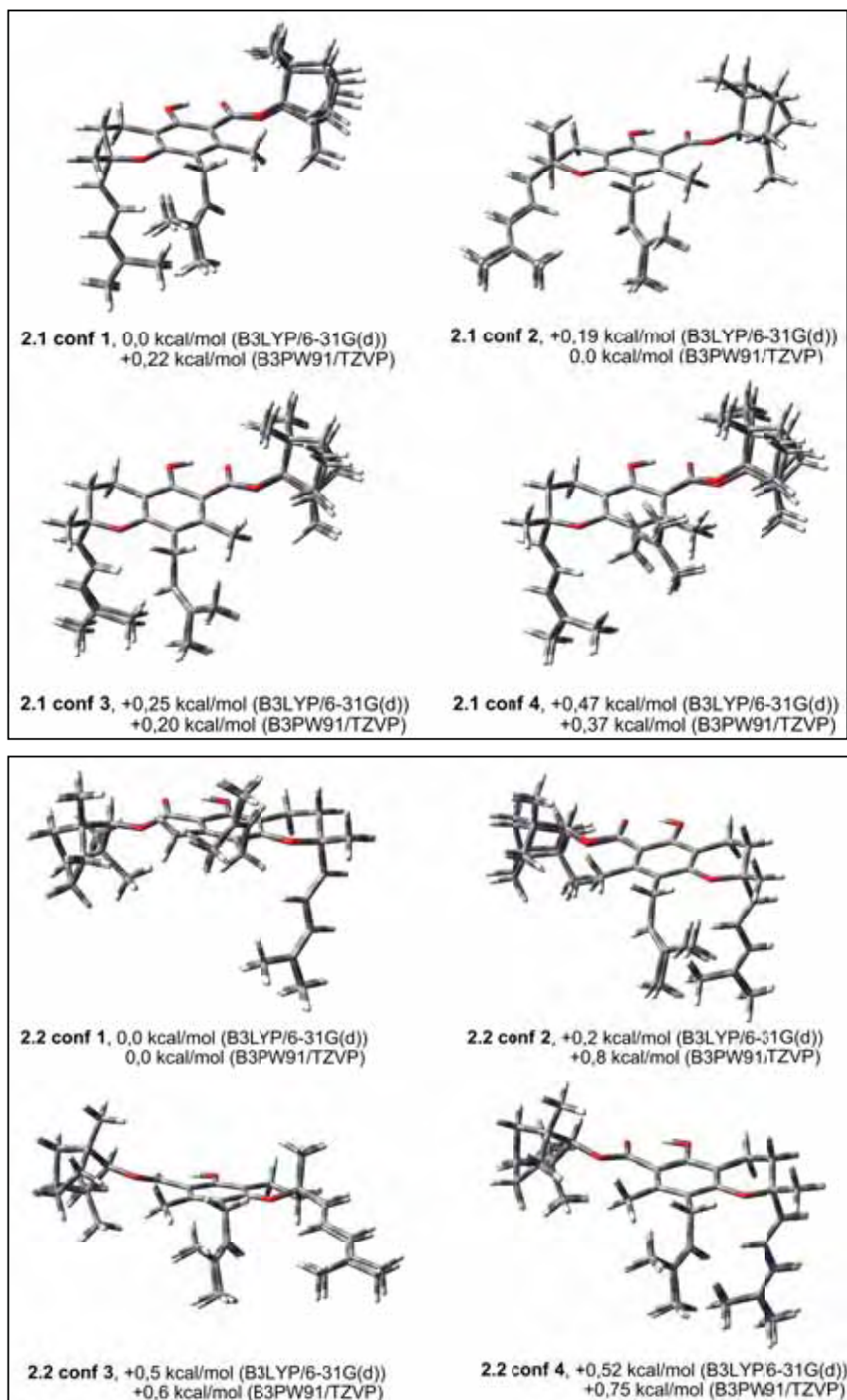


Figura 87 - Superposição de estruturas otimizadas e energias relativas dos quatro confôrmeros de menor energia identificados para derivados de fenchol com configurações 2*S*,1'''*R*, 2'''*R*,4'''*S* (acima) e 2*R*,1'''*R*, 2'''*R*,4'''*S* (abaixo), utilizando tanto B3LYP/6-31G(d) quanto B3PW91/TZVP



A fim de corroborar os assinalamentos propostos, uma nova abordagem foi utilizada para as moléculas com relação diastereoisoméricas, tais como os pares **1.1-1.2** e **2.1-2.2**, os quais possuem os monoterpenos borneol e fenchol, respectivamente, com a mesma configuração absoluta, ligados a cada um dos enantiômeros do cromano **4** (Figura 88, pág. 151). Para tanto, seus espectros experimentais foram somados e divididos por 2, além de subtraídos e divididos pelo mesmo fator 2 (CICHEWICZ et al., 2005). Ao se calcular a média simples, os núcleos cromano com sinais opostos são eliminados, restando apenas o espectro referente ao monoterpeno presente em ambos os compostos. Por outro lado, ao subtrair e dividir por 2, as porções com configuração idênticas são eliminadas e uma das configurações opostas prevalece. Essas mesmas operações foram realizadas para os espectros calculados para as configurações $2S,1''S,2''R,4''S$ e $2R,1''S,2''R,4''S$ dos derivados de borneol e configurações $2S,1''R,2''R,4''S$ e $2R,1''R,2''R,4''S$ dos derivados de fenchol.

Os espectros são apresentados na figura 89 (pág. 152) e confirmam o assinalamento da configuração absoluta de cada centro estereogênico, além da presença de marcadores específicos no espectro de DCV para a estereoquímica de cada porção da molécula separadamente. Os resultados demonstram configuração *R* em C-2 para **1.2** e **2.2**, além de $1''S,2''R,4''S$ e $1''R,2''R,4''S$ para os monoterpenos borneol e fenchol, respectivamente, em cada um dos pares analisados. Assim, caso moléculas análogas sejam isoladas no futuro, pode ser possível o assinalamento de sua configuração absoluta por DCV, mesmo sem o auxílio de cálculos mecânico-quânticos.

Os dados discutidos nessa etapa evidenciaram a potencialidade do DCV para determinar a configuração absoluta de moléculas policêntricas, em solução e sem derivatizações. Vale ressaltar que as moléculas em questão são oleosas, o que impossibilita a obtenção de cristais e, conseqüentemente, a análise por difração de raios-X. Além disso, as mesmas possuem apenas uma hidroxila, a qual é fenólica e fortemente quelada com a carbonila presente na posição *orto*, o que impede a utilização de métodos por RMN e, como já discutido anteriormente, a ausência de cromóforos no UV-Vis descartou a utilização de DCE para investigação da porção monoterpênica. Por fim, como os pares diastereoisoméricos **1.1** e **1.2**, **1.3** e **1.4**, bem

como **2.1** e **2.2**, os quais diferem apenas na configuração em C-2, apresentaram espectros mono- e bidimensionais de RMN praticamente indistinguíveis, uma análise preliminar baseada apenas na rotação óptica específica, sem o auxílio do DCV, poderia ter levado à conclusão errônea de que se tratava de enantiômeros (BATISTA et al., 2011a).

Figura 88 - Estrutura dos seis novos ésteres isoméricos de cromanos com monoterpenos isolados de *Peperomia obtusifolia*

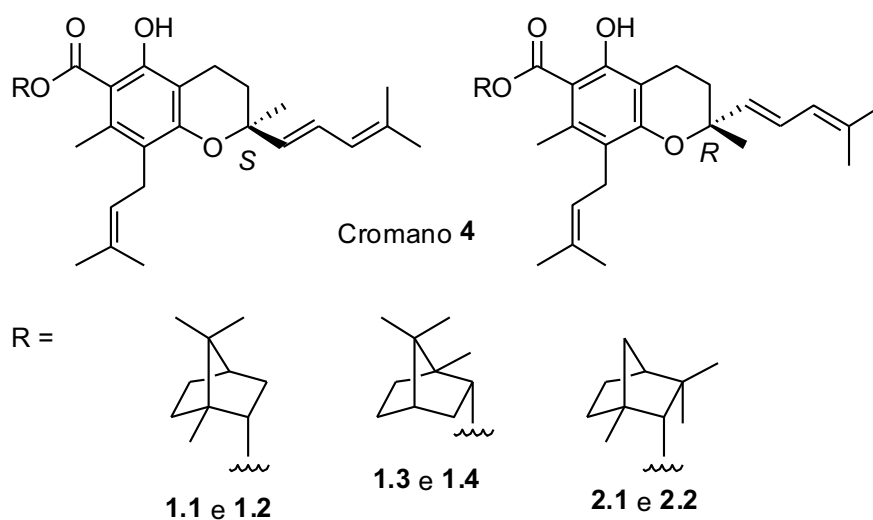
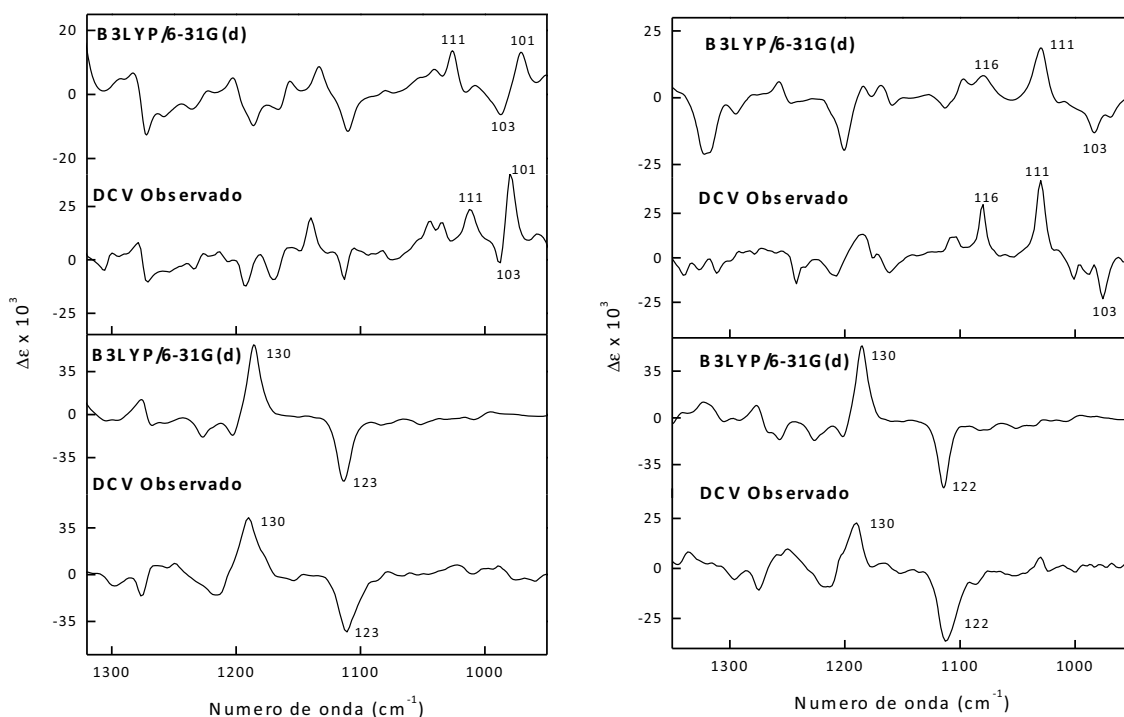


Figura 89 - Esquerda inferior: diferença dos espectros de DCV observado $[(1.2-1.1)/2]$ e calculado $[(2R,1''S,2''R,4''S - 2S,1''S,2''R,4''S)/2]$ para derivados de borneol. Esquerda superior: média simples dos espectros de DCV observado $[(1.1+1.2)/2]$ e calculado $[(2S,1''S,2''R,4''S + 2R,1''S,2''R,4''S)/2]$ para derivados de borneol. Direita inferior: diferença dos espectros de DCV observado $[(2.2-2.1)/2]$ e calculado $[(2R,1''R,2''R,4''S - 2S,1''R,2''R,4''S)/2]$ para derivados de fenchol. Direita superior: média simples dos espectros de DCV observado $[(2.1+2.2)/2]$ e calculado $[(2S,1''R,2''R,4''S + 2R,1''R,2''R,4''S)/2]$ para derivados de fenchol



2.5.3 Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros de **5**, isolados de *Piper gaudichaudianum*

No primeiro relato do composto **5**, obtido a partir de *Piper gaudichaudianum* (LAGO et al., 2004), o mesmo teve a configuração absoluta do centro estereogênico em C-2 assinalada com base na comparação do espectro experimental de DCE com aquele descrito para o sargatriol, um cremenol isolado da alga *Sargassum tortile* (KIKUCHI et al., 1983). Apesar do sargatriol possuir dois carbonos estereogênicos adicionais em sua cadeia lateral, os autores descrevem a curva de DCE obtida para **5**,

como completamente oposta àquela observada para o sargatriol, incluindo um EC positivo em 260-280, permitindo assim o assinalamento de **5** como (+)-*S*.

No entanto, conforme discutido anteriormente, a interpretação de espectros de DCE utilizando regras empíricas, bem como comparações com espectros obtidos para moléculas similares pode não ser precisa, uma vez que regras empíricas frequentemente apresentam exceções e alterações estruturais, incluindo a presença de centros assimétricos adicionais ou mesmo substituintes diferentes ligados ao cromóforo envolvido na transição eletrônica de interesse, podem resultar em características quirópticas muito distintas (FREEDMAN et al., 2003; BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007; BATISTA et al., 2010). Dessa forma, o isolamento dos enantiômeros de **5** se constituiu em uma oportunidade interessante para assinalar a configuração absoluta de ambos empregando DCE e DCV, associados a cálculos mecânico-quânticos e, assim, verificar o assinalamento previamente descrito.

A busca conformacional seguida de otimização geométrica no nível de teoria B3LYP/6-31G(d) revelou a presença de oito confôrmeros de menor energia e, nesse caso, todos com o grupo prenila volumoso substituído em C-2 ocupando a posição *pseudo-equatorial* (Figura 90, pág. 154). O espectro de DCE teórico [(B3LYP/6-311++G(2d,2p)] obtido para a média desses oito confôrmeros, considerando a distribuição de Boltzmann, bem como o espectro experimental obtido para (+)-**5.1**, foram similares, porém não totalmente opostos ao descrito para o sargatriol. Vale ressaltar que o EC entre 260-280 nm (banda 1L_b), tanto calculado quanto experimental, foi negativo para a helicidade-*M* do anel cromeno.

Esses resultados podem constituir outra exceção a chamada “regra inversa” de Crabbé para helicidade do cromóforo estireno, a qual, de maneira análoga à regra para o cromóforo cromano, determina que helicidade-*M* do anel cromeno (ângulo diédrico C-8a, O, C-2, C-3 negativo) gera EC positivo para a banda 1L_b , enquanto helicidade-*P* gera EC negativo para a mesma banda (KWIT et al., 2008). Por fim, a comparação do espectro experimental de DCE para (+)-**5.1** com aqueles calculados para (*S*)-**5** confirmou a configuração absoluta de (+)-**5.1** como *S* e, conseqüentemente, (-)-**5.2** como *R* (Figura 91, pág. 155) (BATISTA et al., 2011b), o que está de acordo com os dados previamente descritos na literatura (LAGO et al., 2004).

Figura 90 - Estrutura e energia relativa dos oito confôrmeros de menor energia de (S)-5 utilizados na simulação [B3LYP/6-311++G(2d,2p)] do espectro de DCE

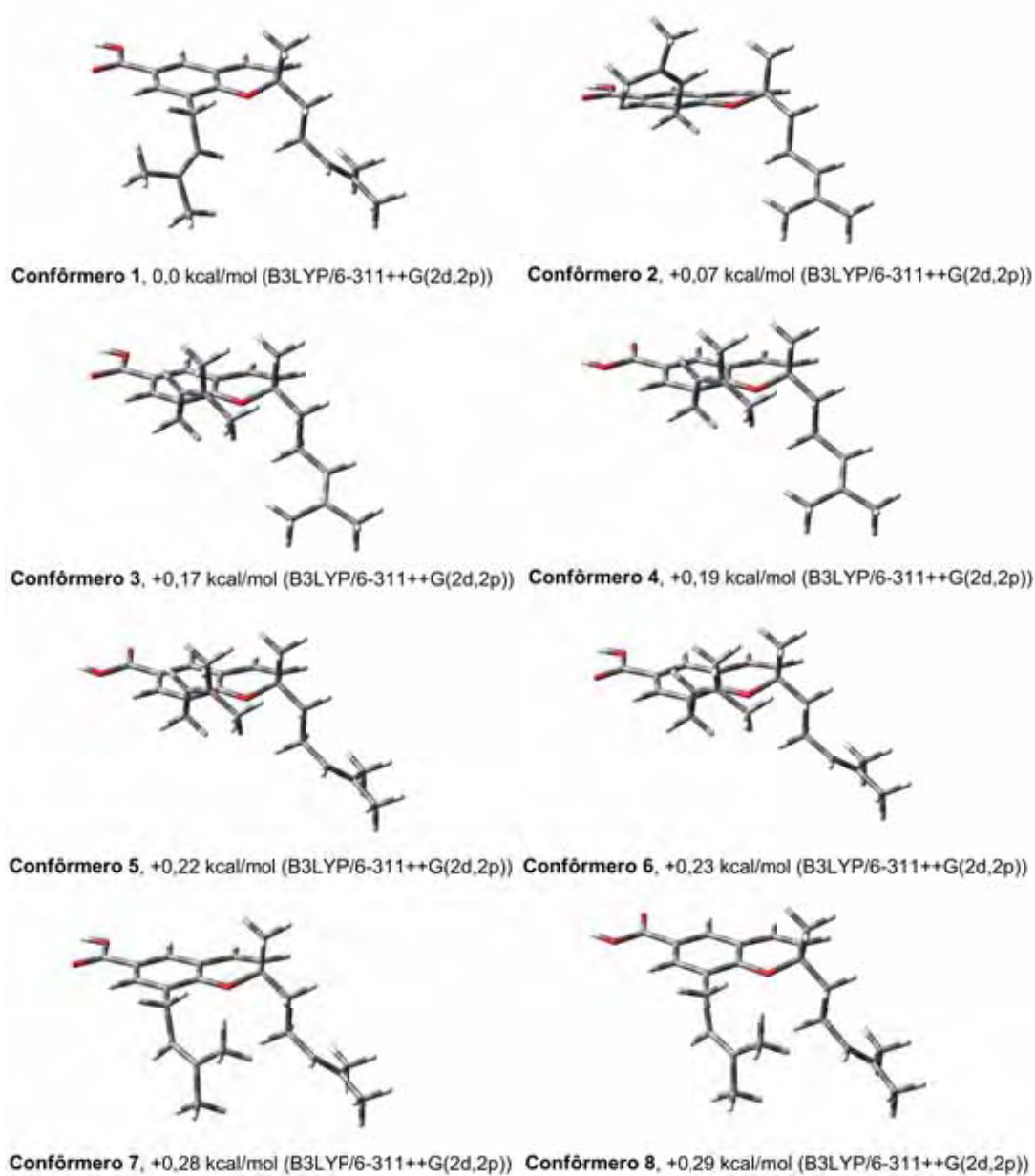
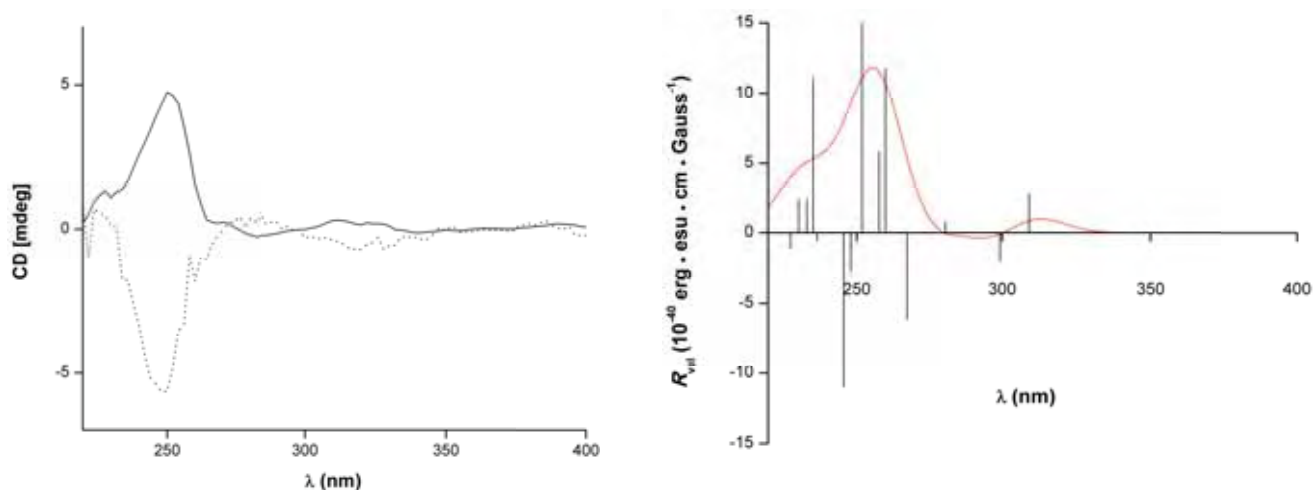


Figura 91 - Esquerda: espectros experimentais obtidos para (+)-**5.1** (linha sólida) e (-)-**5.2** (linha tracejada). Direita: espectro teórico de DCE para (S)-**5**, calculado para a média dos oito conformêros de menor energia, segundo distribuição de Boltzmann, no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d). As barras representam as forças rotacionais calculadas para o espectro de DCE médio



A fim de confirmar a configuração absoluta assinalada por DCE, foram realizados cálculos e medidas dos espectros de DCV para os enantiômeros de **5**. Apesar da quantidade de amostra ser diminuta (1,5 mg de cada enantiômero), foi possível observar bandas de DCV acima do nível de ruído (1190 cm^{-1} - estiramento C-O e deformações angulares C-H; 1250 cm^{-1} - deformações angulares C-H envolvendo a maior parte da molécula; 1310 cm^{-1} - estiramentos C-C e deformações angulares C-H), as quais, quando comparadas ao espectro teórico, confirmaram a configuração absoluta de (+)-**5.1** como S (Figura 92, pág. 156). Além disso, devido ao grande número de conformêros gerados em resposta à flexibilidade dos substituintes prenila em C-8 e C-9, nessa etapa, foram simulados espectros de DCV para a molécula fragmento (Figura 72, pág 130), a fim de investigar se esse conteria informações estruturais suficientes para um assinalamento não ambíguo. De fato, as bandas de DCV em 1190 , 1250 e 1310 cm^{-1} para a molécula fragmento são marcadores para a configuração (S)-C-2 (Figura 92, pág 156). Essa abordagem permitiu grande economia de poder computacional.

Vale ressaltar que para todos os cálculos de espectros no IV e de DCV, a molécula fragmento bem como a molécula completa **5** foram consideradas como adutos com ácido fórmico (Figuras 93 e 94, págs 157 e 158), de maneira análoga ao realizado para o cromano **4**.

Figura 92 - Esquerda: comparação dos espectros experimentais no IV e de DCV de (+)-**5** com aqueles calculados [(B3LYP/6-31G(d))] para a média, segundo distribuição de Boltzmann, dos oito confôrmeros de menor energia obtidos para (S)-**5**. Os números representam fundamentais selecionados. Direita: comparação dos espectros teóricos no IV e de DCV obtidos para (S)-**5** fragmento com aqueles da molécula completa (S)-**5**. Os números representam frequências vibracionais selecionadas

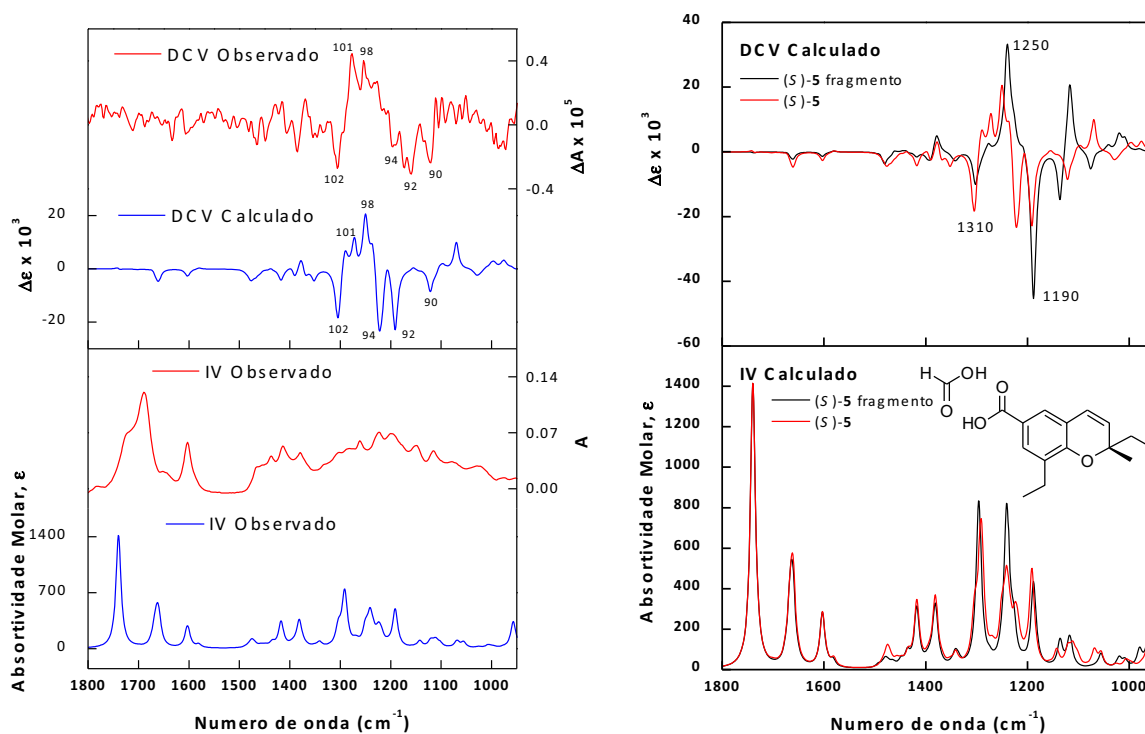


Figura 93 - Estrutura e energia relativa dos quatro confôrmeros de menor energia de (S)-5 fragmento aduto

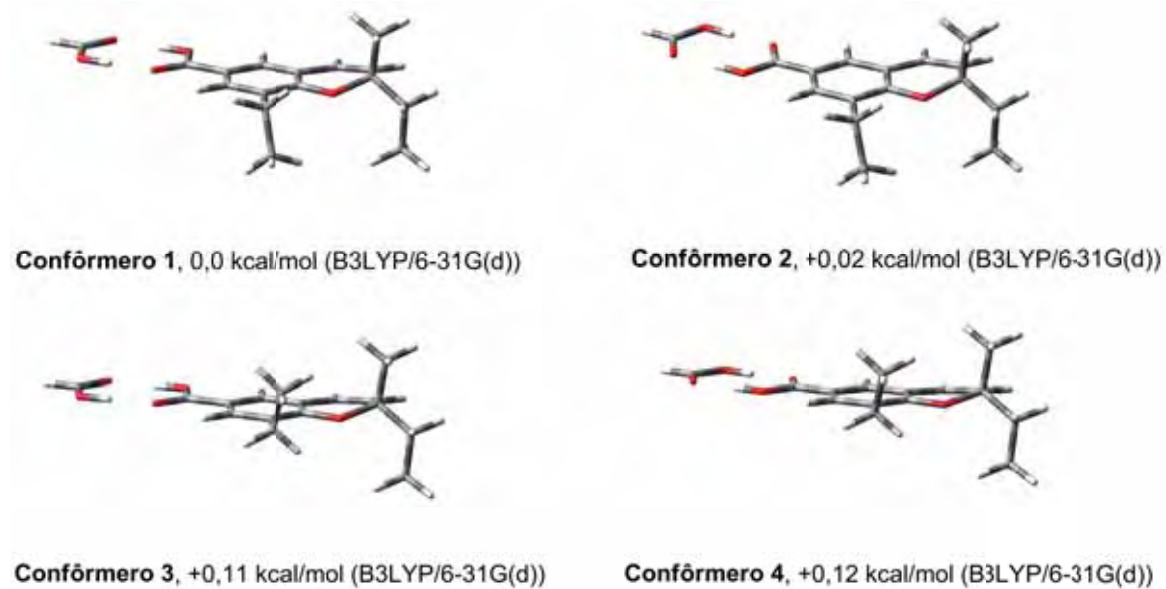
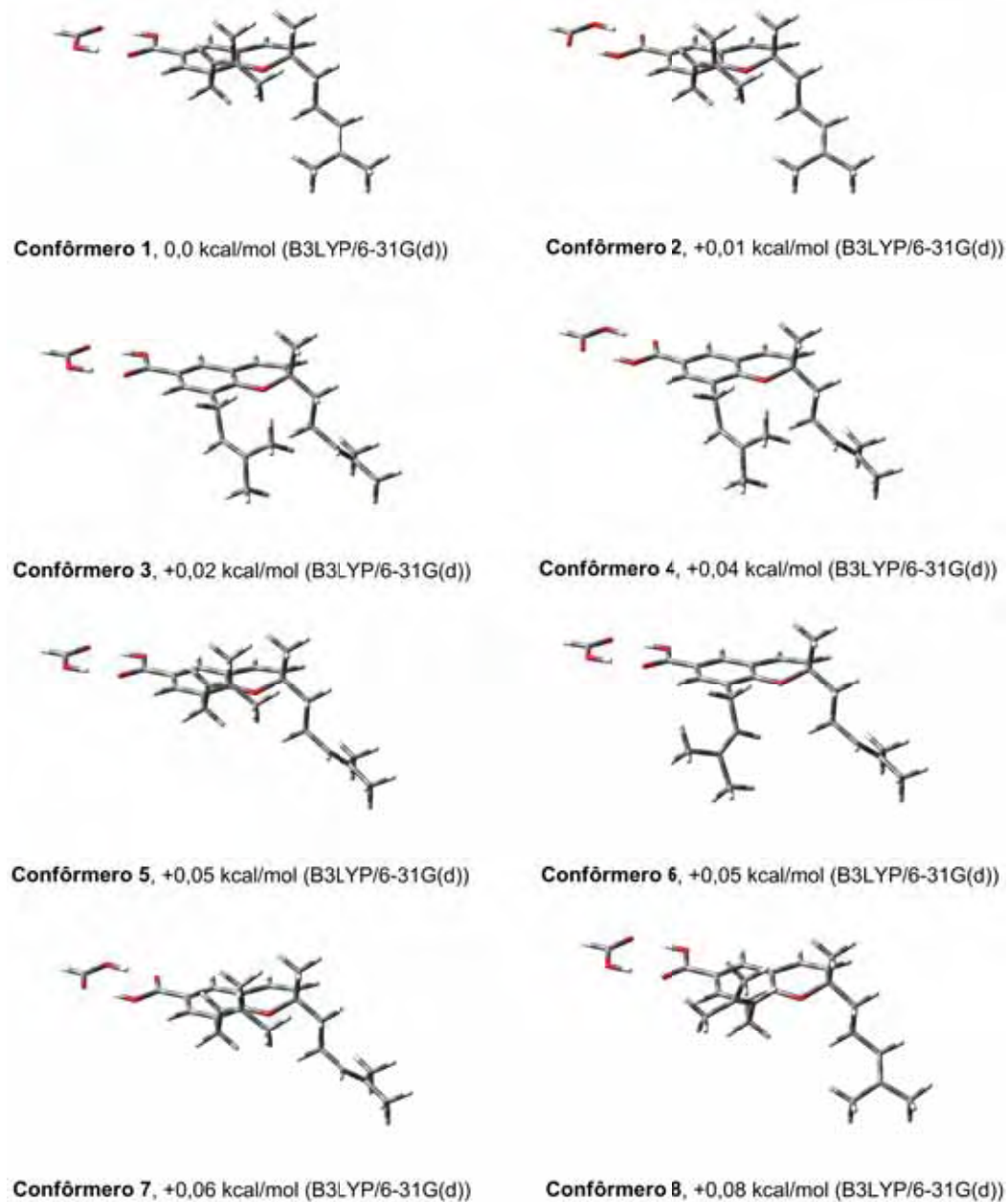


Figura 94 - Estrutura e energia relativa dos oito confôrmeros de menor energia de (S)-5 aduto utilizados na simulação [B3LYP/6-31G(d)] do espectro de DCV



CAPÍTULO 3

Implicações biológicas e biossintéticas

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é endêmica no continente americano, principalmente na América Latina, região onde foi inicialmente detectada, afetando aproximadamente 10 milhões de pessoas, com cerca de 25 milhões sob risco de infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). No ano de 2008, estima-se que essa enfermidade causou cerca de 10.000 mortes. Apesar de principalmente confinada à América Latina, nos últimos anos tem-se observado um aumento no número de casos registrados nos Estados Unidos, Canadá, em diversos países europeus, além de alguns países na costa oeste do Oceano Pacífico.

Historicamente, essa doença foi nomeada em homenagem ao médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que descobriu a enfermidade em 1909. O agente etiológico é o parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida) (HOARE; WALLACE, 1966), cujo ciclo de vida envolve obrigatoriamente a passagem por um hospedeiro vertebrado (mamíferos, inclusive o homem) e invertebrado hematófago (insetos triatomíneos, principalmente dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*), numa série de estágios. A forma tripomastigota ingerida pelo inseto diferencia-se na forma proliferativa epimastigota, que alcançando a porção final do intestino transforma-se na forma tripomastigota metacíclica. Essa última forma, após invadir as células do hospedeiro vertebrado, diferencia-se em amastigotas, as quais, após uma série de ciclos reprodutivos, transformam-se novamente em tripomastigotas, forma responsável pela disseminação da infecção. A transmissão da doença ocorre principalmente pelas fezes do vetor (80 a 90%), por transfusão sanguínea (5 a 20%), pela rota congênita (0,5 a 8%) (DIAS, 2000), além de outras vias, como por exemplo, a oral (CAMANDARROBA et al., 2002).

Em humanos, após a infecção e subsequente período de incubação, inicia-se a fase aguda da doença, sendo que na falta de tratamento específico, os sintomas como febre, cefaléia, dores musculares, dores no peito, dificuldade para respirar e linfadenopatia, persistem por aproximadamente 2 meses, gerando uma taxa de

mortalidade de 2 a 8%, especialmente em crianças. *Trypanosoma cruzi* é capaz de invadir e multiplicar-se em diferentes células do hospedeiro, inclusive em macrófagos, músculos lisos e esqueléticos, fibroblastos e até em neurônios. Após a fase aguda da doença, os pacientes apresentam forte resposta imunológica porém tendem a permanecer infectados, sendo que a presença de formas amastigotas em diferentes tecidos evidencia o início da fase crônica da doença. Nessa fase, a maioria dos pacientes permanece assintomática porém, em 20 a 50% dos pacientes, podem ocorrer desordens cardíacas (cardiomegalia), digestivas (megaesôfago ou megacólon) e neurológicas.

A patogênese da doença de Chagas ainda não é completamente definida e compreendida. Existem dois tipos básicos de lesões inflamatórias: uma focal e outra difusa. A lesão focal é associada à presença do parasita e ocorre em células parasitadas e não rompidas. A proporção da lesão difusa independe da presença dos parasitas. Durante a infecção aguda existem lesões difusas no coração e focal em muitos outros órgãos. Na fase crônica da doença cardíaca, por exemplo, a fibrose severa e as lesões inflamatórias encontradas não podem ser relacionadas somente a presença do *T. cruzi*, mas também a intensa reação de hipersensibilidade e lesões isquêmicas que ocorrem no hospedeiro vertebrado. Os mecanismos propostos para a patogênese durante a fase crônica da doença são a persistência do parasita resultando em inflamação crônica e indução de uma resposta auto-imune.

Desde a descoberta por Carlos Chagas no início do século XX até os dias atuais foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem, entretanto, obter-se um medicamento que fosse totalmente eficaz. Em 1961 iniciou-se um período de tentativas de tratamento que resultou, no início da década de 1970, principalmente em dois medicamentos: nifurtimox, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (Lampit[®], da Bayer) e o benznidazol, *N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida (Rochagan[®], da Roche), além da violeta de genciana, utilizada até hoje como profilático em bancos de sangue (DIAS et al., 2009). No entanto, esses medicamentos são pouco ativos na fase aguda, inativos na fase crônica, além de ocasionarem severos efeitos adversos, tais como: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, náuseas, vômitos, cólica intestinal e diarreia (nifurtimox),

hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, trombocitopenia púrpura, agranulocitose, polineuropatia, parestesia e polineurites de nervos periféricos (benznidazol) (COURA; CASTRO, 2002).

Diante da gravidade da doença de Chagas, da falta de uma vacina eficaz e da quase inexistência de recursos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) na área de doenças parasitárias por parte das principais companhias farmacêuticas e biotecnológicas no mundo (BRENK et al., 2008), faz-se necessário a busca de novos agente antichagásicos. Embora avanços obtidos nos aspectos biológicos e genéticos do parasita tenham possibilitado a identificação de novos alvos biológicos (proteases, topoisomerases, via glicolítica, biossíntese de esteróides, etc.) para o desenvolvimento racional de novos fármacos (DIAS et al., 2009), a triagem com produtos naturais ainda representa uma vertente importante na busca de agentes tripanocidas (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). Dentre os diversos produtos naturais relatados com atividade tripanocida destaca-se os lignóides isolados de espécies de *Piper* e *Peperomia* (MARTINS et al., 2003, FELIPPE et al., 2008), bem como benzopiranos (BATISTA et al., 2008).

Os estudos da atividade tripanocida de benzopiranos isolados de espécies de Piperaceae, realizados por esse autor, permitiram a identificação de características estruturais envolvidas na atividade biológica em questão, tais como a presença de doadores de elétrons substituídos no anel aromático e da função éster (BATISTA et al., 2008). No entanto, a influência da estereoquímica absoluta desses compostos para o potencial tripanocida ainda não havia sido determinada. Assim, o isolamento de cromanos e cromenos racêmicos, sua resolução por cromatografia quiral e a determinação da configuração absoluta de forma inequívoca por meio de métodos quirópticos se constitui em uma oportunidade excelente para avaliação da influência de fatores estereoquímicos para o potencial biológico. Portanto, nesse capítulo, serão abordados resultados da atividade tripanocida, bem como inibidora de protease (a seguir), dos enantiômeros e/ou diastereoisômeros dos benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*.

3.1.2 Inibidores de protease

Diversas funções biológicas essenciais, intra- e extracelulares, tanto em humanos quanto em organismos patogênicos, dependem de proteases (MITTL; GRÜTTER, 2006). Essa classe de enzimas cataliza a hidrólise de ligações peptídicas em sítios específicos e, devido ao caráter irreversível de sua atividade, acredita-se que uma gama extensa de inibidores de protease evoluíram a fim de regular e controlar suas atividades. Esses inibidores podem ser utilizados no controle endógeno de proteólise, bem como para inativar proteases de organismos competidores ou predadores.

Baseado em sua importância para regulação da atividade celular, as enzimas com atividade proteolítica constituem talvez o alvo enzimático mais importante para o desenvolvimento de fármacos (MITTL; GRÜTTER, 2006), o que resultou na descoberta de antivirais, anticâncer, anti-hipertensivos, entre outros. De maneira geral, as proteases podem ser classificadas como serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteases. Dentre as proteases aspárticas, merece destaque a HIV-1 protease, um importante alvo terapêutico para o tratamento da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA ou AIDS), tratamento esse que se dá, em geral, em associação com inibidores da enzima transcriptase reversa (FEAR; KOMARNYTSKY; RASKIN, 2007). Como a enzima HIV-1 protease cliva apenas os resíduos Phe-Pro, Phe-Leu e Phe-Thr, é possível o desenvolvimento de inibidores altamente seletivos para o alvo em questão, como por exemplo o saquinavir e o indinavir.

Apesar dos avanços e do sucesso na terapia contra HIV/AIDS, ainda não se descobriu a cura ou mesmo uma vacina eficaz para essa enfermidade, a qual pode ser considerada como um dos maiores inimigos que a humanidade já enfrentou (ASRES et al., 2005). Isso se reflete nos dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde, totalizando aproximadamente 33 milhões de infectados em todo o mundo, no ano de 2009, com cerca de 2,6 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes, incluindo crianças e adultos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Em se tratando de fármacos inibidores de HIV-1 protease, uma das principais limitações para sua utilização a longo prazo é o desenvolvimento de resistência

cruzada. Diversas mutações envolvendo o sítio ativo da enzima, ou fora dele, diminuem a afinidade dos inibidores comercialmente disponíveis, evidenciando a necessidade da descoberta de novos agentes terapêuticos para os alvos existentes, ou ainda a busca de novos alvos (BANNWARTH et al., 2009). A busca de novos agentes terapêuticos utilizando produtos naturais tem sido promissora, com a identificação de diversas classes de compostos anti-HIV, tais como terpenóides e cumarinas (YU et al., 2007; COS et al., 2008). Em relação a identificação de novos alvos, pode-se destacar a interface de interação proteína-proteína (WELLS; MCCLENDON, 2007), uma vez que HIV-1 protease é ativa apenas na forma de um homodímero. Alterações na formação e/ou estabilização desse dímero levariam à inativação da enzima de interesse.

Assim, nesse trabalho buscou-se a avaliação da atividade dos benzopiranos naturais isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* frente à inibição de HIV-1 protease, bem como de seu possível mecanismo de ação. Outrossim, a disponibilidade tanto de misturas racêmicas como de enantiômeros/diastereômeros puros permitiu a investigação do papel da estereoquímica para a atividade biológica investigada. Por fim, a seleção de benzopiranos como candidatos a inibidores de protease se fundamenta em relatos prévios de atividade anti-HIV por integrantes dessa classe (KASHIWADA et al., 2001; ASRES et al., 2005; YU et al., 2007; LEE et al., 2009).

3.1.3 Implicações biossintéticas

Como abordado na introdução do primeiro capítulo dessa tese, acredita-se que os cromanos e cromenos isolados no decorrer desse trabalho sejam biossintetizados por meio da prenilação de uma unidade de ácido *p*-hidroxibenzóico ou ácido orselínico, com posterior ciclização e formação do núcleo benzopirano. Para tanto, assume-se a existência de catálise enzimática, com participação de uma enzima ciclase, de maneira análoga ao que ocorre na biossíntese dos tocoferóis, para os quais, a enzima tocoferol ciclase é bem caracterizada (GRÜTTER et al., 2006). No entanto, diferentemente do que ocorre na biossíntese dos constituintes da Vitamina E, os quais são formados de maneira estereosseletiva com configuração absoluta (*R*)-C-2 (CHÊNEVERT;

COURCHESNE; PELCHAT, 2006), ambos os enantiômeros dos compostos isolados nesse trabalho foram detectados. O fato de se encontrar misturas racêmicas em compostos naturais é relativamente raro (MORI, 2010), o que permite questionamentos a respeito da presença de sistemas enzimáticos distintos dedicados à formação de cada enantiômero, da ocorrência de ciclização química, de racemização pós-biossíntese ou mesmo racemização durante os processos de purificação e isolamento (artefatos), como observado no caso de alguns alcalóides tropânicos (DEWICK, 2009).

Assim, a fim de confirmar que as misturas racêmicas obtidas para os benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* não se tratavam de artefatos gerados pelos processos de purificação e isolamento, realizou-se o monitoramento por CLAE quiral dos benzopiranos em questão, em extratos obtidos em condições brandas, a partir de diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento, quando possível. Esses resultados também permitiram um melhor entendimento de certas características biossintéticas envolvidas na formação desses importantes compostos bioativos. Por fim, nesse trabalho buscou-se, pelo estudo de características estereoquímicas, uma compreensão mais global tanto da formação quanto da bioatividade de cromanos e cromenos em duas espécies de Piperaceae.

3.2 OBJETIVOS

- Avaliação da atividade tripanocida *in vitro*, frente à formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, dos benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*, bem como investigação da influência da configuração absoluta desses compostos para a atividade em questão;
- Avaliação da atividade inibidora de HIV-1 protease e possível mecanismo de ação dos benzopiranos isolados das espécies acima citadas, bem como investigação da influência da configuração absoluta desses compostos para a atividade em questão;
- Investigação da presença de racematos e da distribuição dos estereoisômeros de cromanos e cromenos em diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento das espécies estudadas, a fim de compreender melhor os fatores envolvidos em sua biossíntese.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

A descrição do material vegetal dos espécimes adultos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* foi realizada na seção 1.3.1 (pág. 25). Plântulas da espécie *Piper gaudichaudianum* foram cultivadas, a partir de sementes, em meio nutriente básico Murashige-Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962) por nove semanas. Após esse período, as plântulas foram transferidas para potes plásticos preenchidos com terra, de onde foram colhidas após seis semanas. As plântulas germinadas em meio nutritivo foram fornecidas pelo Prof. Massuo Jorge Kato do IQ-USP, SP.

3.3.2 Obtenção dos extratos vegetais

Folhas de um espécime adulto de *P. obtusifolia* foram coletadas e, imediatamente, trituradas em N₂ líquido, seguido de extração por maceração, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, utilizando Hex como solvente por um período de 3 h. Após a evaporação do solvente, a pressão reduzida, sem utilização de aquecimento, o extrato obtido foi prontamente injetado no sistema cromatográfico.

O material vegetal de *P. gaudichaudianum*, obtido de diferentes órgãos da planta adulta (raiz, caule e folha) foi seco em estufa a 40 °C e posteriormente pulverizado em moinho de facas tipo Willey. Todas as extrações foram feitas por maceração a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, utilizando AcOEt como solvente por um período de 3 h. Após a evaporação do solvente, a pressão reduzida, sem utilização de aquecimento, os extratos obtidos foram prontamente injetados no sistema cromatográfico. No caso das plântulas, após a colheita, os diferentes órgãos foram separados manualmente e, imediatamente, triturados em N₂ líquido, seguido de extração por maceração, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, utilizando AcOEt como solvente por um período também de 3 h. Após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, sem utilização de aquecimento, os extratos obtidos foram prontamente injetados no sistema cromatográfico.

3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

3.3.3.1 Solventes

- Hexano (95% *n*-hexano), EtOH, iPrOH e MeOH das marcas J.T. Baker, Mallinckrodt e Tedia foram utilizados para CLAE e outros fins. Água foi purificada antes do uso em sistema Milli-Q, Millipore.

3.3.3.2 Cromatógrafos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-6AD, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-10AF, coletor de frações FRC-10A, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-20A, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Jasco 2000 equipado com bomba de quatro canais PU-2089 Plus, injetor automático AS-2055 Plus, detector UV-DAD MD-2010 Plus e detector de dicroísmo circular CD-2095 Plus.

3.3.3.3 Colunas cromatográficas

- Daicel Chiralcel OD-H[®], 250 x 4,6 mm, 5 μ m;
- Phenomenex Lux[®] Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ m;
- Phenomenex Luna[®] C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m.

3.3.4 Ensaio tripanocida

A forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* foi escolhida nesse experimento por ser de fácil manutenção em cultura e não infectante. Os ensaios *in vitro* foram

realizados em triplicata, utilizando cepa Y, a qual foi cultivada a 28 °C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) axênico, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitas foram utilizados durante a fase exponencial de crescimento, após 7 dias em meio de cultura. A avaliação da atividade tripanocida foi realizada através do ensaio colorimétrico utilizando *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – phenazinemethosulfate* (MTT/PMS), descrito por Muelas-Serrano et al. (2000).

Os compostos a serem avaliados foram dissolvidos em DMSO e transferidos para placas estéreis de poliestireno com 96 poços, em diferentes concentrações finais (100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL). Em seguida, 50µL de meio LIT contendo parasitas (1 x 10⁷ parasitas/mL) foi adicionado a cada poço teste. Um número igual de poços contendo as substâncias em questão foi completado apenas com meio LIT, na ausência de parasitas. Nos poços utilizados como controle negativo foi adicionado o mesmo volume de meio LIT, com ou sem parasitas, na ausência de substâncias teste. Como controle positivo foi utilizado benznidazol extraído a partir de comprimidos de Rochagan® (Roche). As placas de 96 poços foram incubadas a 28 °C por 72 h e, após esse período, uma alíquota de 10 µL de MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) foi adicionada a cada poço e as placas incubadas por 75 min a 28 °C e ao abrigo da luz. Subsequentemente, 100 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl diluído (0,01 M) foi adicionada a cada poço e mantida a temperatura ambiente por 30 min, também ao abrigo da luz.

A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm e os resultados obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos, C% (citotoxicidade), foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

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

$$G_c = A_c - A_m$$

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

Sendo que G_c representa o número de parasitas/mL nos poços controles e G_p representa o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da

substância teste. A_c corresponde ao valor de absorvância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitas; A_m corresponde ao valor da absorvância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasita; A_p representa o valor da absorvância nos testes e A_{pm} representa o valor da absorvância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita. Os valores de concentração inibitória 50% e desvio padrão foram calculados por regressão linear. Esses ensaios foram realizados sob supervisão da Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP em Araraquara.

3.3.5 Ensaio anti-HIV-1 protease

A protease do HIV-1 (PR HIV-1) foi preparada de acordo com Bannwarth et al. (2009). O substrato fluorogênico utilizado nos ensaios foi o DABCYL- γ -abu-SQNYPIVQ-EDANS (DABCYL, ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoil; γ -abu, γ -aminobutírico; EDANS, ácido 5[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico) (Bachem, Voisin-le-Bretonneux, France). Esse substrato possui um sítio específico de clivagem na ligação peptídica entre os resíduos de triptofano e prolina, os quais estão inseridos em uma porção peptídica que separa um cromóforo doador (EDANS) de um receptor (DABCYL). A atividade biológica é observada pelo decréscimo nas medidas de fluorescência, resultante da diminuição da atividade enzimática pelas substâncias teste, uma vez que o substrato intacto não emite fluorescência.

As intensidades de fluorescência resultantes da clivagem do substrato pela PR HIV-1 foram medidas em um espectrofotômetro FluoroStar Galaxy (BMG LabTechnologies) em microplacas opacas pretas (Costar, Corning Incorporated). A atividade proteolítica da PR HIV-1 foi determinada por espectrofotometria de fluorescência ($\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 490$ nm) em uma solução de 100 mM de tampão AcONa, 1 mM de EDTA e 1M de NaCl em pH 4,7 a 30°C. O substrato (5,2 μ M) e os compostos teste foram dissolvidos em DMSO (3%, v/v). Inicialmente foram realizados ensaios para obtenção do CI_{50} utilizando-se a concentração máxima de inibidor a 28

μM . A partir dos resultados obtidos foram selecionadas as concentrações dos inibidores a serem utilizadas nos ensaios para determinação do mecanismo de ação.

O mecanismo de inibição e as constantes de inibição competitiva (K_{ic}) e/ou constante de inibição da dimerização (K_{id}) foram determinados utilizando-se a análise cinética de Zhang-Poorman (ZHANG et al., 1991). Os dados foram avaliados por meio do software KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software). Para a análise cinética de Zhang-Poorman mantém-se constante a concentração do substrato, utiliza-se o inibidor em duas concentrações diferentes (uma acima e outra abaixo ao valor obtido para IC_{50}) e varia-se a concentração da protease ($[E]_0 = 5,33, 8,0, 10,7, 13,3, 16,0$ e $18,7$ nM). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Enzimologia Molecular e Funcional na Université Paris – V (UPMC - Sorbonne Universités, Paris) pelo Dr. Otávio Flausino Jr.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 Avaliação da atividade tripanocida

Os estereoisômeros **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, os compostos racêmicos **3-5**, bem como seus respectivos enantiômeros, foram avaliados frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, conforme metodologia descrita na seção **3.3.4**. Para o composto **5**, foram ainda avaliadas misturas dos enantiômeros, em diferentes proporções, a fim de investigar uma possível atividade sinérgica para o racemato.

3.4.1.1 Esterificações de **5** e avaliação da atividade tripanocida

Baseado em dados previamente publicados (BATISTA et al., 2008), os quais relatam aumento na atividade tripanocida de **5** com a derivatização do grupo carboxila e formação de um éster metílico, nessa etapa foram gerados ésteres etílicos, propílicos e butílicos de **5** a fim de avaliar o efeito do aumento da cadeia carbônica para a atividade tripanocida. Para tanto, realizou-se reações de esterificação entre o ácido carboxílico presente no cromeno racêmico **5** e álcoois de diferentes extensões de cadeia carbônica, sob catálise ácida utilizando H₂SO₄. Nessas reações, o próprio álcool da mistura reacional desempenhou o papel de solvente. Em todos os procedimentos, utilizou-se 34,5 mg (0,1 mmol) de **5** e as reações foram desenvolvidas sob agitação e aquecimento em banho de óleo sem aparelhagem para refluxo.

Após o tempo reacional adequado, todas as misturas reacionais foram vertidas sobre H₂O (30,0 mL) e particionadas com DCM (15,0 mL) por três vezes. À fase orgânica foi adicionado Mg₂SO₄ anidro, como agente secante, por uma hora, e após filtração, o solvente orgânico foi evaporado a pressão reduzida. Os produtos de interesse foram purificados por CCDP, desenvolvida em Hex-AcOEt 95:05. A tabela 7 (pág. 172) apresenta as condições reacionais empregadas no processo de esterificação do cromeno **5** frente aos álcoois etanol, 1-propanol e 1-butanol.

A formação dos produtos desejados foi acompanhada por CCDC e confirmada por experimentos de RMN de ¹H e de ¹³C mono- e bidimensionais, além de

espectrometria de massas de baixa e alta resolução. Uma vez purificados e caracterizados, os ésteres obtidos foram avaliados frente a cepa Y de *T. cruzi*, no entanto utilizou-se o método de contagem dos parasitas viáveis e câmara de Neubauer descrito em Batista et al. (2008).

Tabela 7 - Condições reacionais empregadas nas reações de esterificação

Tipo de Álcool	Volume de álcool (mL)	Temperatura (°C)	Volume de ácido (mL)	Tempo (h)
Etanol*	10,0	60,0	0,10	32,0
1-Propanol*	20,0	65,0	0,15	90,0
1-Butanol*	30,0	70,0	0,25	96,0

* Reagentes da marca Synth.

3.4.2 Avaliação da atividade inibidora de HIV-1 protease

Os estereoisômeros **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, os compostos racêmicos **3-5**, bem como os enantiômeros do composto **4** (**4.1** e **4.2**) foram avaliados como potenciais inibidores da enzima HIV-1 protease, conforme metodologia descrita na seção **3.3.5**. Infelizmente, não foi possível investigar a atividade dos enantiômeros dos compostos **3** e **5**, pois os mesmos haviam degradado quando do envio das amostras à França.

3.4.3 Avaliação da presença do composto racêmico **4** no extrato aprótico das folhas de *Peperomia obtusifolia*

Nessa etapa investigou-se a presença do composto racêmico **4** no extrato hexânico das folhas de *P. obtusifolia* a fim de confirmar que o mesmo não se tratava de um artefato gerado durante os processos de isolamento e purificação. Para tanto, o extrato de folhas do espécime adulto foi preparado segundo metodologia descrita na seção **3.3.2**. Antes da injeção no sistema cromatográfico as amostras, tanto do extrato

hexânico quanto da substância pura **4**, passaram por um processo de “clean-up” utilizando um cartucho de sílica gel Sep-Pack® (Waters) eluído com Hex e Hex/acetona (50:50, v/v). Apenas a fração Hex/acetona foi analisada. As análises foram qualitativas e empregaram as seguintes condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, 5 µm, em modo de eluição isocrática, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) com vazão de 0,7 mL/min e detecção em 254 nm.

3.4.4 Avaliação da presença do composto racêmico **5, em diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento de *Piper gaudichaudianum***

Nessa etapa do projeto, foram realizadas análises por CLAE, tanto em fase reversa não quiral quanto em fase normal quiral, a fim de avaliar a distribuição do benzopirano majoritário, o ácido gaudichaudiânico (**5**), nas raízes, caules e folhas da planta adulta, bem como das plântulas de *P. gaudichaudianum*. Essa avaliação visou também determinar se o mesmo se apresentava como uma mistura racêmica desde estágios iniciais de desenvolvimento, além de comprovar que a mistura racêmica não se tratava de um artefato gerado durante os processos de isolamento e purificação de **5**. Para tanto, extratos de cada órgão vegetal do espécime adulto e das plântulas foram preparados segundo metodologia descrita na seção **3.3.2** e imediatamente injetados no sistema cromatográfico. As análises foram qualitativas e empregaram as seguintes condições cromatográficas: para análises em fase reversa não quiral utilizou-se coluna Phenomenex Luna® C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, em modo de eluição gradiente, 5-100% de MeOH em AcOH aquoso (0,05%) em 30 min, seguido de 10 min em 100% de MeOH, com vazão de 1,0 mL/min e detecção a 254 nm; para as análises em fase normal quiral utilizou-se coluna Phenomenex Lux® Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 µm, em modo de eluição isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,05% AcOH, com vazão de 0,8 mL/min e detecção em 254 nm.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Avaliação da atividade tripanocida

Todos os cromanos estereificados com monoterpenos, ou seja, compostos **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, foram avaliados frente a formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, no entanto, devido a um problema de solubilidade no meio de cultura, o qual é predominantemente aquoso, ocorreu precipitação das amostras impossibilitando a análise dos dados. A fim de solucionar esse problema, avaliou-se a influência do aumento da concentração de DMSO, originalmente a 3%, bem como a inclusão do tensoativo monolaurato de sorbitano polietoxilado 20 (Tween-20). Infelizmente, nenhuma das abordagens gerou resultados satisfatórios devido a sua elevada toxicidade ao parasita. Portanto, os ésteres de cromanos tanto com borneol quanto fenchol não puderam ser avaliados quanto ao seu potencial tripanocida.

Os compostos **3** e **4** foram isolados como misturas racêmicas e demonstraram potente atividade tripanocida, associada a baixa citotoxicidade em macrófagos murinos (MOTA et al., 2009). A resolução dos enantiômeros de ambos os compostos no decorrer desse trabalho possibilitou a investigação da possível influência da estereoquímica em C-2 para a atividade biológica em questão. No entanto, quando ensaiados, os enantiômeros **3.1**, **3.2**, **4.1** e **4.2** não apresentaram diferença estatisticamente significativa na atividade tripanocida quando comparados, tanto entre si quanto com a mistura racêmica de onde foram originados. Esses resultados sugerem que a estereoquímica de C-2, nesse núcleo cromano, não é essencial para a potente atividade tripanocida desses compostos. A tabela 8 (pág. 175) apresenta o valor de concentração inibitória 50% (CI₅₀) e o desvio padrão (DP), frente à cepa Y de *T. cruzi*, dos cromanos **3**, **3.1**, **3.2**, **4**, **4.1** e **4.2**.

Tabela 8 - Atividade tripanocida das misturas racêmicas e enantiômeros isolados de *Peperomia obtusifolia*

Substâncias	CI ₅₀ (μM)* ± DP
3	41,1 ± 1,2
3.1	43,5 ± 1,5
3.2	40,5 ± 2,0
4	52,2 ± 0,8
4.1	52,1 ± 0,5
4.2	52,9 ± 0,6
benznidazol	37,3 ± 1,5

*Média obtida para um ensaio realizado em triplicata.

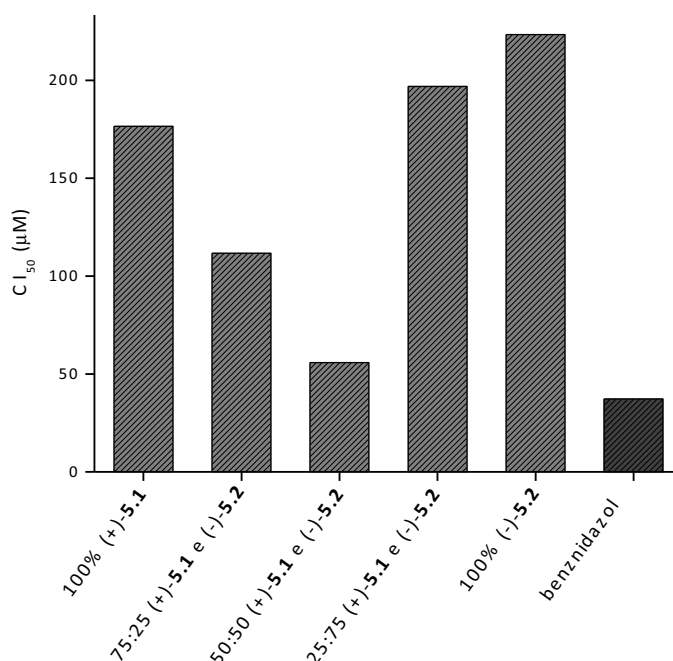
O ácido gaudichaudiânico (**5**), bem como análogos gerados por modificações moleculares já foram relatados como potentes compostos tripanocidas frente as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (BATISTA et al., 2008). No entanto, até o momento, nenhum estudo havia sido feito para avaliar a influência da estereoquímica em C-2 para a atividade em questão. Assim, inicialmente, foram avaliados a mistura racêmica **5**, bem como seus enantiômeros separadamente. Os resultados obtidos foram interessantes, uma vez que a mistura racêmica apresentou a atividade mais significativa (CI₅₀ 55,8 ± 2,2 μM), seguida pelos enantiômeros (+)-(S)-**5.1** (CI₅₀ 176,5 ± 2,0 μM) e (-)-(R)-**5.2** (CI₅₀ 223,5 ± 2,5 μM). Esses resultados sugerem uma possível atividade sinérgica para os enantiômeros de **5**, uma vez que a mistura 50:50 apresentou atividade mais pronunciada que cada um dos enantiômeros separadamente. Resultados semelhantes já foram descritos para os enantiômeros do feromônio sulcatol, produzido pelo besouro *Gnathotrichus sulcatus* (MORI, 2011).

A fim de investigar melhor o possível sinergismo, foram realizados ensaios tripanocidas utilizando misturas dos enantiômeros (+)-**5.1** e (-)-**5.2** nas proporções 75:25 (CI₅₀ 111,2 ± 4,3 μM) e 25:75 (CI₅₀ 197,0 ± 1,4 μM), respectivamente. Esses ensaios confirmaram a presença de sinergismo pois a atividade máxima foi obtida apenas quando (+)- e (-)-**5** se apresentaram em proporções iguais (mistura racêmica).

No entanto, os resultados também evidenciaram que, fora da proporção racêmica, a atividade tripanocida é diretamente proporcional à concentração do enantiômero (+)-(S)-**5.1** (BATISTA et al., 2011b). Os resultados do ensaio biológico são sumarizados na figura 95 (pág. 176). Por fim, o fato da atividade descrita para a mistura racêmica **5** ser comparável àquela do controle positivo benznidazol sugere que, na primeira vez em que o ácido gaudichaudiânico teve sua atividade tripanocida descrita, esse tratava-se de uma mistura racêmica e não do enantiômero S conforme relatado (BATISTA et al., 2008).

Baseado no exposto acima, somado ao fato do éster metílico do ácido gaudichaudiânico ter sido relatado como o composto mais potente frente ao parasita *T. cruzi* (BATISTA et al., 2008), nesse trabalho realizou-se a esterificação do cromano **5** racêmico com os alcoóis etanol, 1-propanol e 1-butanol, a fim de avaliar a influência da extensão da cadeia carbônica para a atividade biológica em questão. A metodologia para preparação dos derivados esterificados de **5** se encontra na seção 3.4.1.1 (pág. 171) e os resultados das reações de derivatização, bem como a caracterização dos produtos obtidos serão discutidas na próxima seção, 3.5.2 (pág. 177).

Figura 95 - Atividade tripanocida dos enantiômeros de **5** em diferentes proporções. O benznidazol foi utilizado como controle positivo



Em relação a atividade tripanocida dos derivados esterificados de **5** racêmico, foi possível observar que os ésteres etílico (**5.4**), propílico (**5.5**) e butílico (**5.6**) apresentaram atividade tripanocida na mesma ordem de grandeza apresentada pelo éster metílico (**5.3**), indicando assim, que a extensão da cadeia carbônica não potencializa a atividade biológica proposta. Apesar da presença do éster consistir em uma importante característica estrutural, o aumento do número de unidades metilênicas, em uma série homóloga, parece não ser estatisticamente significativa para a atividade tripanocida. No entanto, essas moléculas se mostraram mais ativas que o controle positivo utilizado, eliminando todos os parasitas presentes nos poços da placa de ensaio até a 5^a, das 7 diluições realizadas.

A tabela a seguir (Tabela 9, pág. 177) apresenta os valores da concentração inibitória 50% (CI₅₀), frente a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, do cromeno natural racêmico **5** e de seus análogos gerados por modificação estrutural utilizando o método de contagem dos parasitas viáveis em câmara de Neubauer.

Tabela 9 - Atividade tripanocida do cromeno natural **5** e seus análogos gerados por modificação estrutural

Substâncias	CI ₅₀ (μM) ± DP
5	33,8* ± 0,8
5.3	2,82* ± 1,0
5.4	4,3 ± 2,0
5.5	5,1 ± 1,5
5.6	4,5 ± 0,9
benznidazol	10,3 ± 0,2

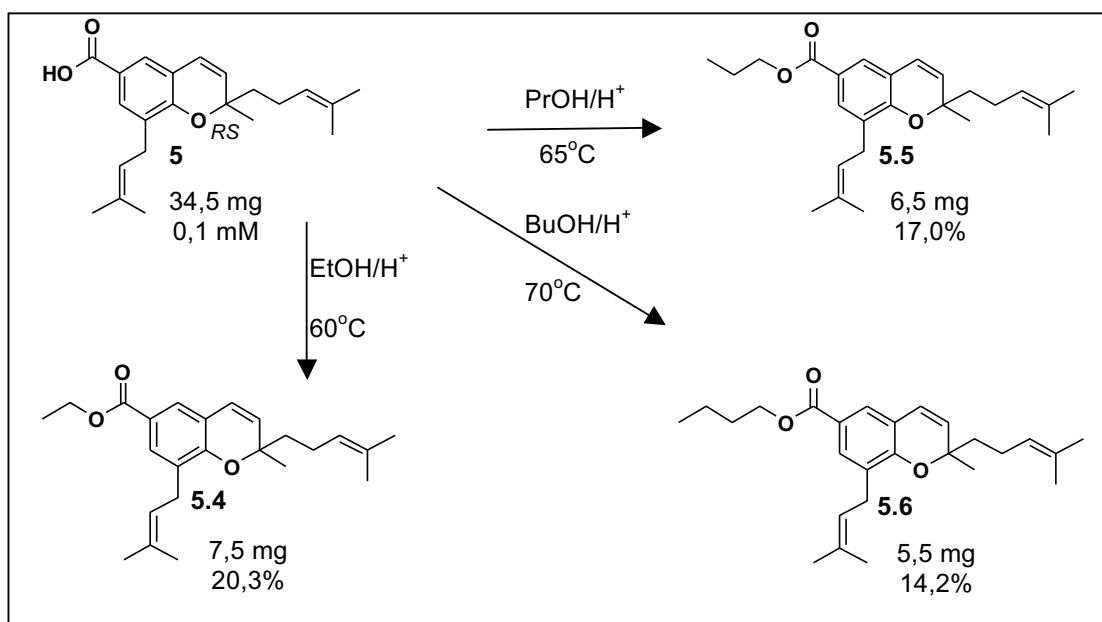
* Dados retirados de BATISTA et al., 2008.

3.5.2 Reações de esterificação

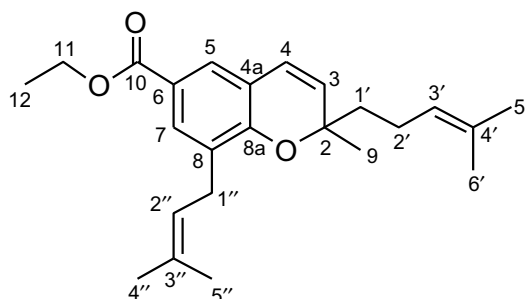
As reações de esterificação realizadas com o cromeno **5** ocorrem por meio de ataque da hidroxila alcoólica à carboxila do ácido carboxílico e eliminação de uma

molécula de H₂O. Apesar de que o aumento da cadeia carbônica do álcool possa teoricamente, devido a efeitos indutivos, aumentar a nucleofilicidade da hidroxila alcoólica, o rendimento obtido nas reações guarda uma relação inversamente proporcional ao tamanho da cadeia carbônica do álcool (Figura 96, pág. 178). Além disso, foi necessário um aumento significativo do tempo reacional, além da elevação da temperatura e da quantidade de catalisador para se obter rendimentos razoáveis, à medida que o álcool etílico foi substituído pelo 1-propílico e 1-butílico. Os resultados obtidos com o emprego das condições descritas na tabela 7 (pág. 172) não puderam ser otimizados, já que elevações de temperatura, do tempo reacional e da concentração do catalisador favoreceram a formação de produtos de degradação, não caracterizados.

Figura 96 - Condições reacionais e rendimentos das reações de esterificação de **5**



3.5.2.1 Elucidação estrutural de 5.4



Para **5.4** foi proposta a estrutura do éster 2-metil-8-(3-metilbut-2-enil)-2-(4-metilpent-3-enil)-2*H*-cromeno carboxilato de etila, com fórmula molecular $C_{24}H_{32}O_3$. Essa substância está de acordo com as características apresentadas para o cromeno **5** na seção **1.5.1.4** (pág. 92), exceto pelo fato de ser um éster etílico do ácido carboxílico correspondente. Os sinais no espectro de RMN de 1H em δ 4,24 (2H, q, $J = 7,0$ Hz) e δ 1,29 (3H, t, $J = 7,0$ Hz) foram atribuídos a H-11 e H-12, respectivamente, típicos de hidrogênios das unidades metilênica e metílica do grupo etoxílico. O espectro de RMN de ^{13}C confirma a presença do éster etílico pelos sinais em δ 166,6, típico de carbonila de ésteres, além de δ 60,5 e 14,4, atribuídos, respectivamente, a C-11 (carbono metilênico) e C-12 (carbono metílico) da porção etoxila. Esses dados são confirmados pelas correlações observadas no experimento *g*HMBC. O espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por eletrospray, no modo positivo, apresentou um pico correspondente ao íon molécula protonada m/z 369,2439 $[M + H]^+$ e do aduto com sódio m/z 391,2258. Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de **5.4**, bem como o espectro de massas, são apresentados a seguir.

Figura 97 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **5.4** e ampliações

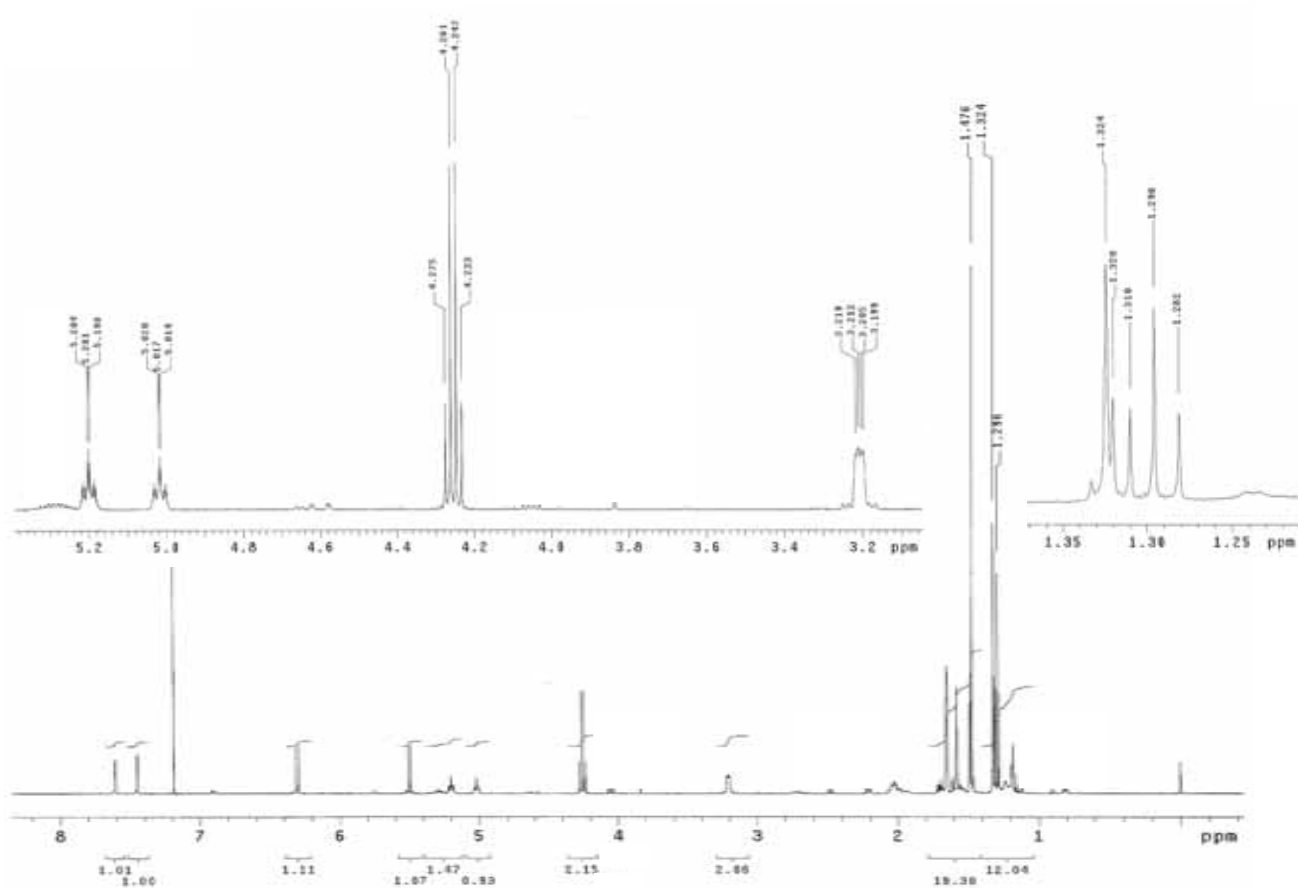


Figura 98 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **5.4**

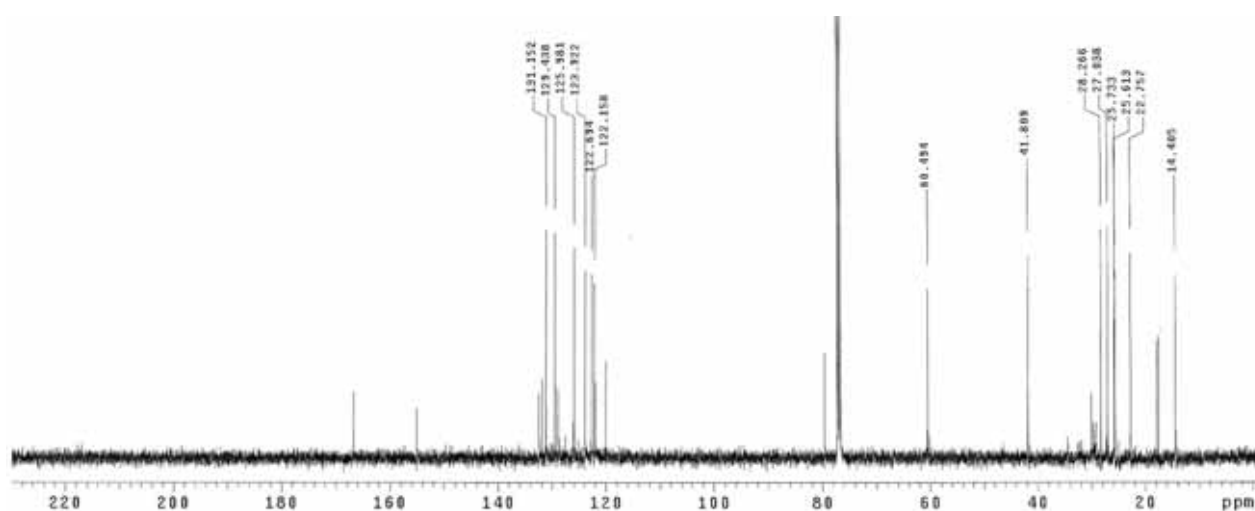
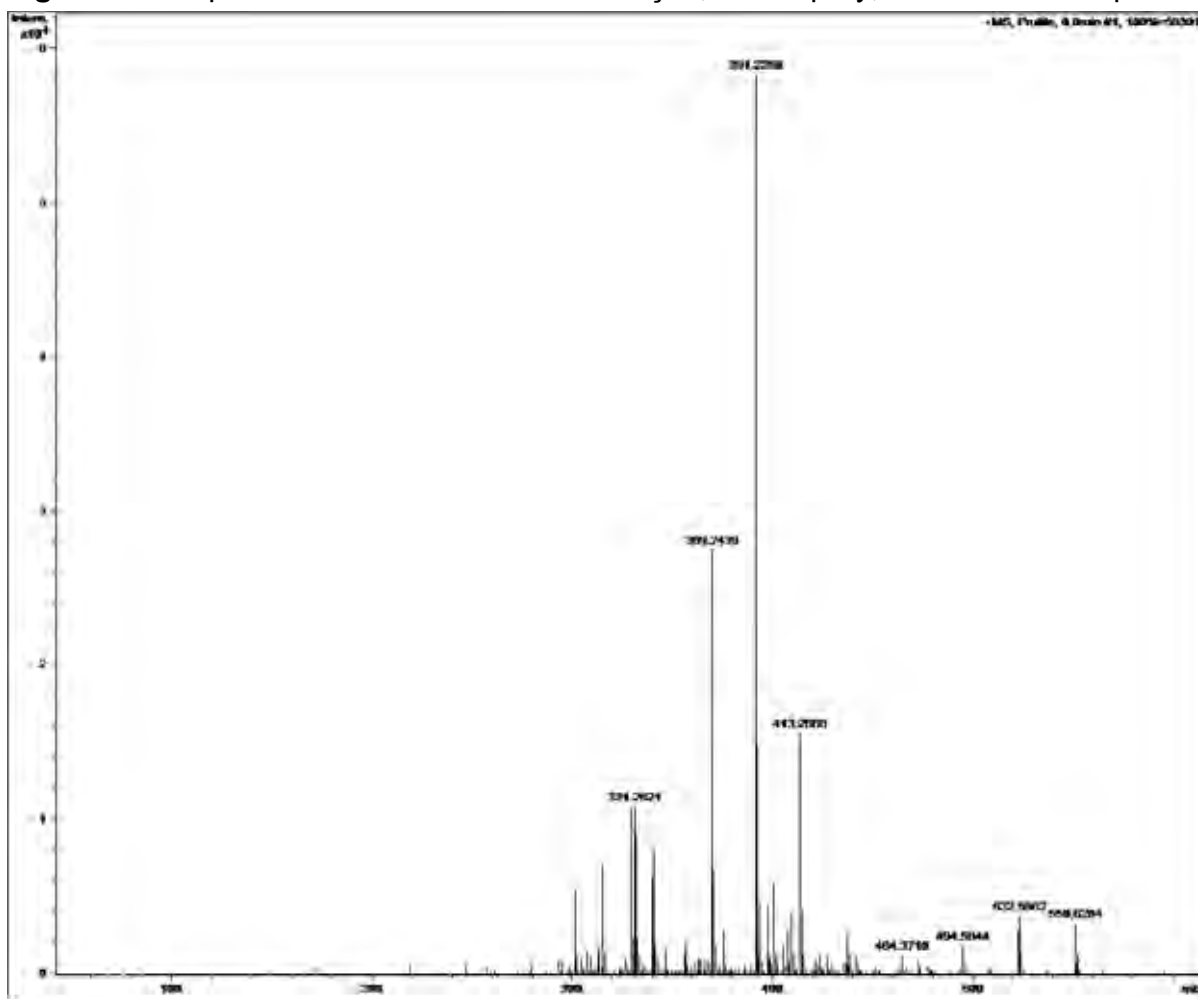
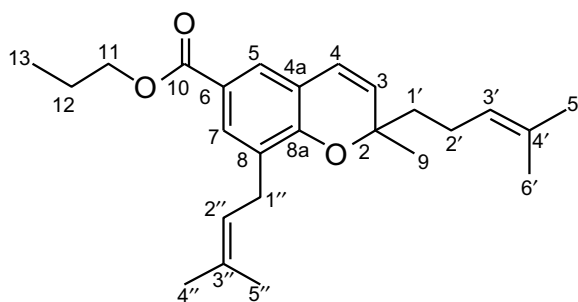


Figura 99 - Espectro de massas de alta resolução, eletrospray, de 5.4 no modo positivo



3.5.2.2 Elucidação estrutural de 5.5



Para **5.5** foi proposta a estrutura do éster 2-metil-8-(3-metilbut-2-enil)-2-(4-metilpent-3-enil)-2*H*-cromeno carboxilato de propila, com fórmula molecular $C_{25}H_{34}O_3$. Essa substância está de acordo com as características apresentadas para o cromeno **5** na seção **1.5.1.4** (pág. 92), exceto pelo fato de ser um éster propílico do ácido carboxílico correspondente. Os sinais no espectro de RMN de 1H em δ 4,15 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), δ 1,70 (2H, m) e δ 0,94 (3H, t, $J = 7,5$ Hz) foram atribuídos a H-11, H-12 e H-13, respectivamente, característicos de hidrogênios das unidades metilênicas e metílica do grupo propoxílico. O espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença do éster propílico pelos sinais em δ 166,7, típico de carbonila de ésteres, além de δ 66,1; 22,1 e 10,5, atribuídos, respectivamente, a C-11 (carbono metilênico), C-12 (carbono metilênico) e C-13 (carbono metílico) da porção propoxila. Esses dados foram confirmados pelas correlações observadas no experimento *g*HMBC. O espectro de massas obtido por eletrospray, no modo positivo, apresentou um pico correspondente ao íon molécula protonada m/z 383 $[M + H]^+$, bem como do fragmento m/z 341 $[M - CH_3CH_2CH_2 + H]^+$, referente a perda do substituinte propílico para formação do ácido carboxílico correspondente. Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de **5.5**, bem como o espectro de massas, são apresentados a seguir.

Figura 100 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **5.5** e ampliações

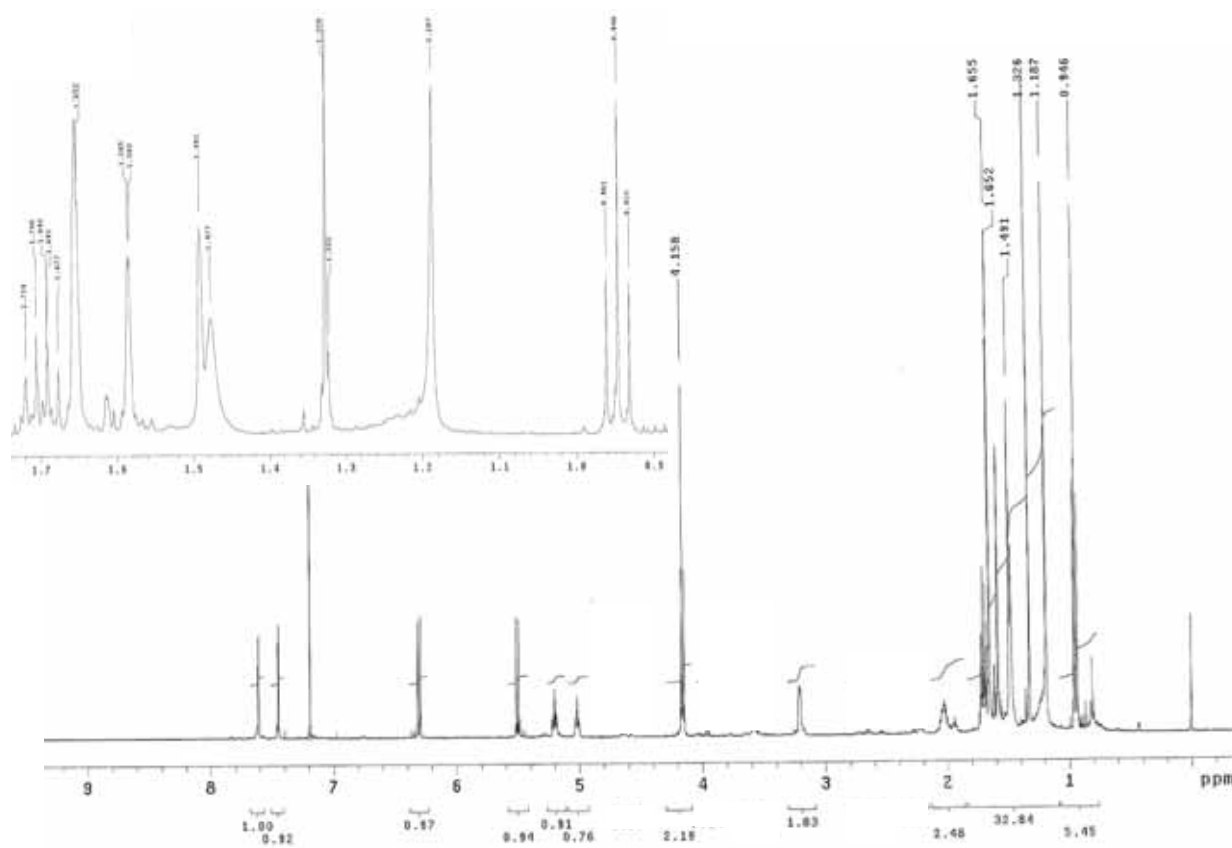


Figura 101 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **5.5**

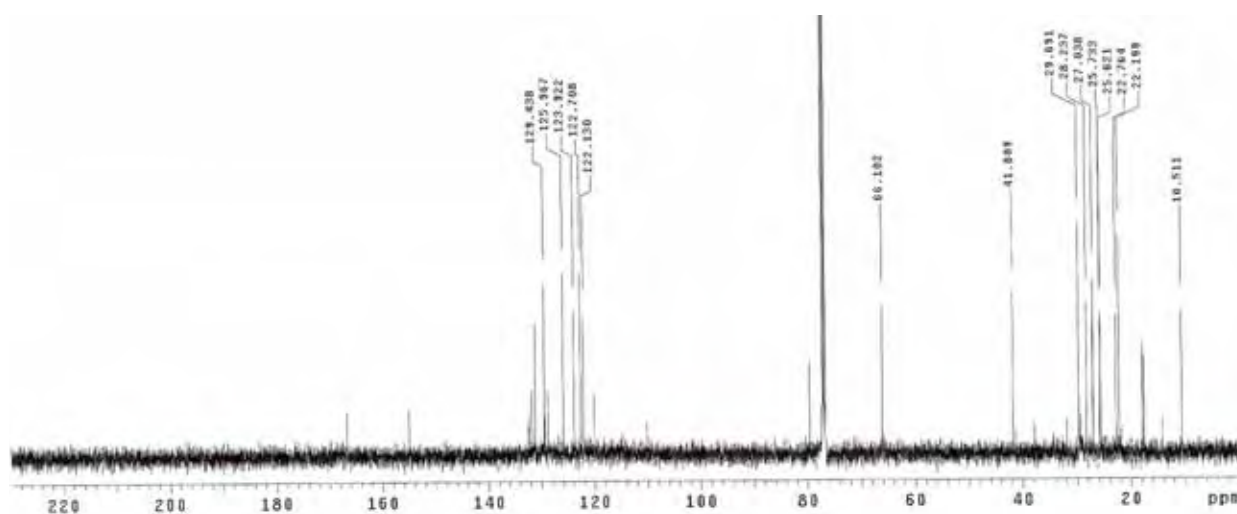
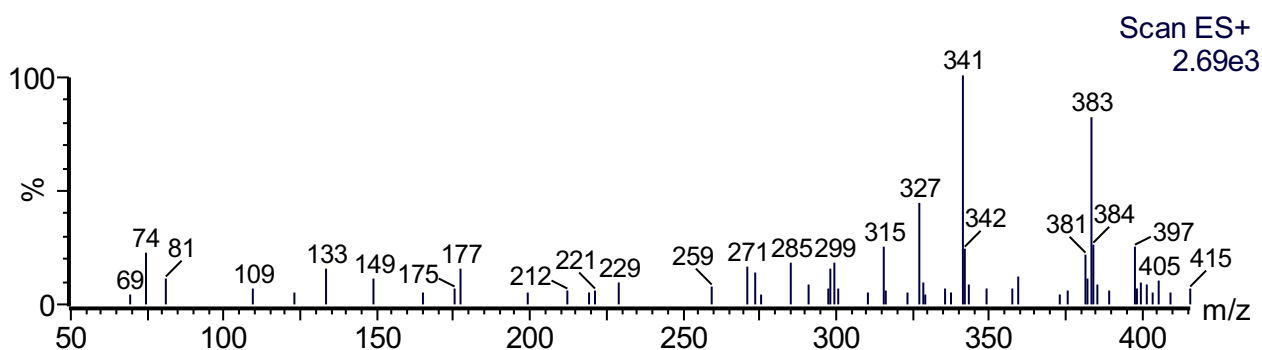
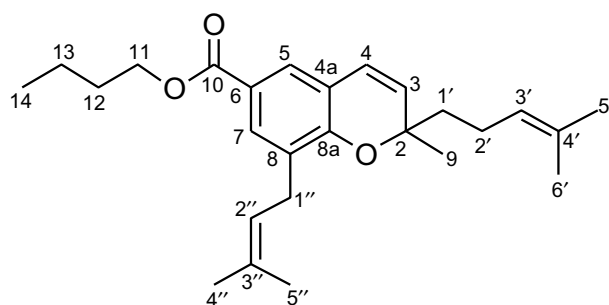


Figura 102 - Espectro de massas de baixa resolução, eletrospray, de **5.5** no modo positivo



3.5.2.3 Elucidação estrutural de 5.6



Para **5.6** foi proposta a estrutura do éster 2-metil-8-(3-metilbut-2-enil)-2-(4-metilpent-3-enil)-2*H*-cromeno carboxilato de butila, com fórmula molecular $C_{26}H_{36}O_3$. Essa substância está de acordo com as características apresentadas para o cromeno **5** na seção **1.5.1.4** (pág. 92), exceto pelo fato de ser um éster butílico do ácido carboxílico correspondente. Os sinais no espectro de RMN de 1H em δ 4,18 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), δ 1,63 (2H, m), δ 1,37 (2H, m) e δ 0,89 (3H, t, $J = 7,5$ Hz) foram atribuídos a H-11, H-12, H-13 e H-14, respectivamente, característicos de hidrogênios das unidades metilênicas e metílica do grupo butoxílico. O espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença do éster butílico através dos sinais em δ 166,7, típico de carbonila de ésteres, além de δ 64,4; 19,2; 30,8 e 13,7, atribuídos, respectivamente, a C-11 (carbono metilênico), C-12 (carbono metilênico), C-13 (carbono metilênico) e C-14 (carbono

metílico) da porção butoxila ligada a C-10. Esses dados foram confirmados pelas correlações observadas no experimento *g*HMBC. O espectro de massas obtido por eletrospray, no modo positivo, apresentou um pico correspondente ao íon molécula protonada m/z 397 $[M + H]^+$, bem como do fragmento m/z 341 $[M - CH_3CH_2CH_2CH_2 + H]^+$, referente a perda do substituinte butílico para formação do ácido carboxílico correspondente. Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de **5.6**, bem como o espectro de massas, são apresentados a seguir.

Figura 103 - Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) de **5.6** e ampliações

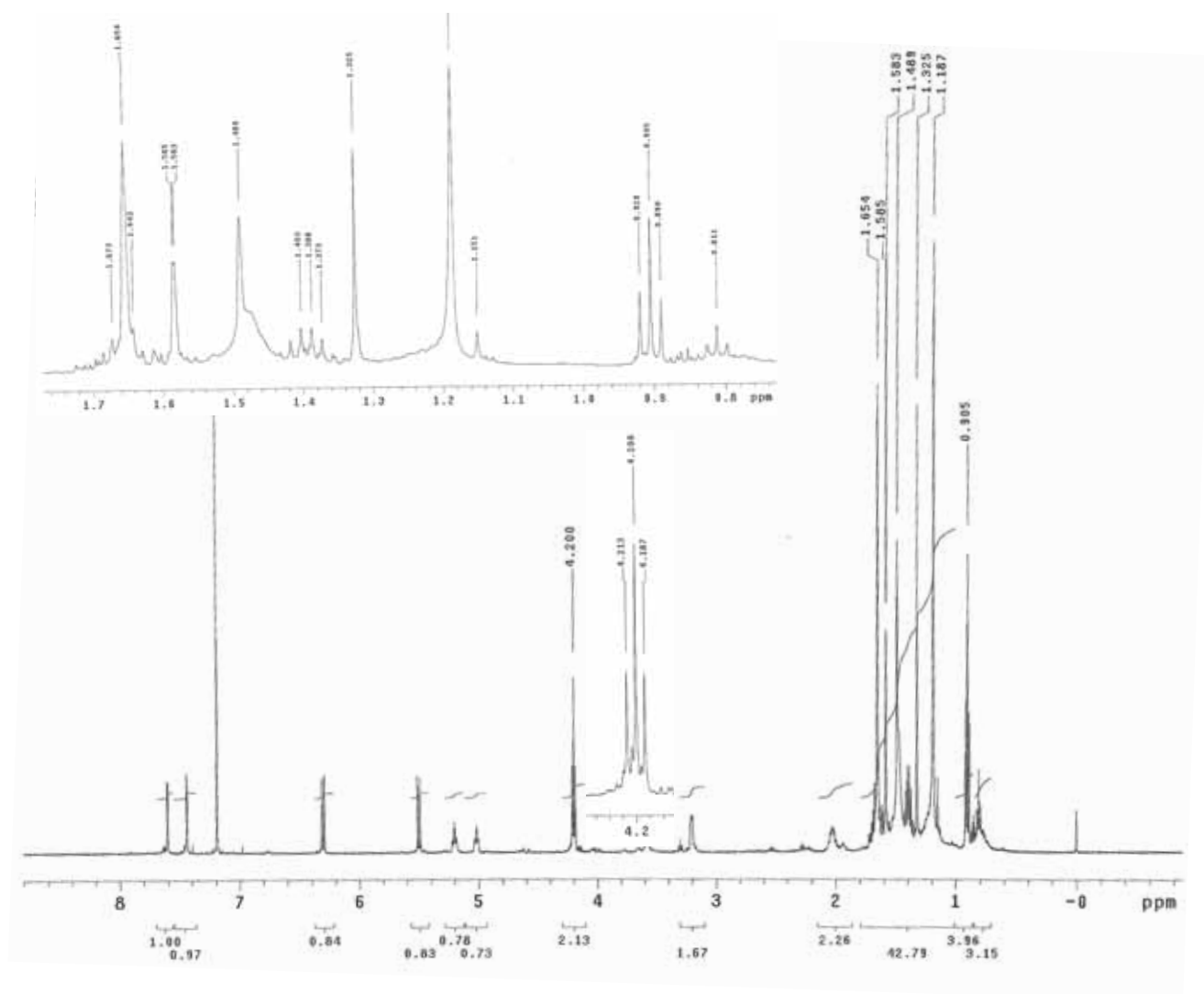
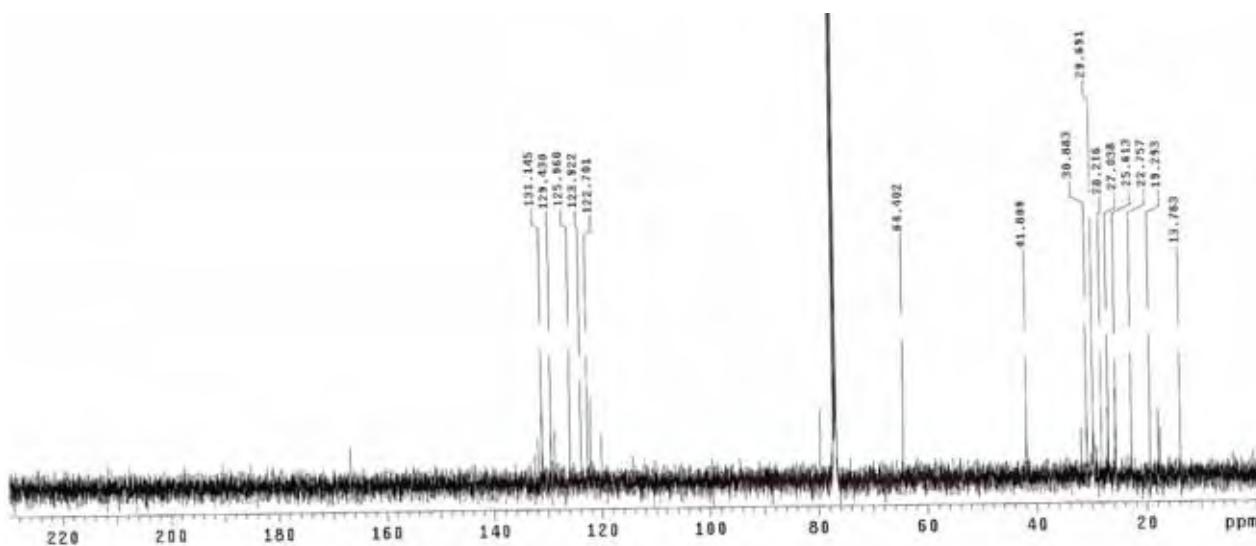
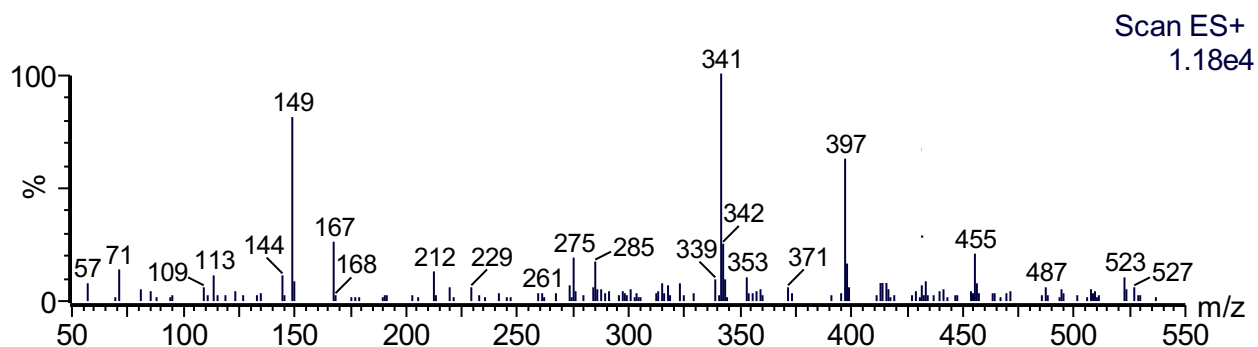


Figura 104 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **5.6****Figura 105** - Espectro de massas de baixa resolução, eletrospray, de **5.6** no modo positivo

3.5.3 Atividade inibidora de HIV-1 protease

Os compostos **1.1-1.4**, **2.1-2.2** e **3** foram inativos frente à atividade inibidora de HIV-1 protease, quando avaliados na concentração inicial de $28 \mu\text{M}$. Assim, não foram realizados processamentos posteriores para determinação da cinética enzimática. No entanto, os compostos **4**, **4.1**, **4.2** e **5** foram ativos, sendo que **4.1** apresentou a atividade mais pronunciada. Os resultados são apresentados na tabela 10 (pág. 188). É

interessante destacar que os compostos ativos apresentam em comum a função ácido carboxílico livre, ausente nos ésteres com monoterpenos bem como em **3**. Além disso, **4** foi cerca de seis vezes mais ativo que **5** o que pode indicar a importância dos substituintes no anel aromático, bem como do núcleo cromano, o qual é mais flexível e possui características eletrônicas distintas daquelas dos cromenos, para a inibição enzimática. Esses resultados fornecem dados preliminares sobre os requisitos estruturais necessários para a atividade biológica em questão.

A análise cinética da inibição da atividade proteolítica de HIV-1 protease utilizando o método de Zhang-Poorman (ZHANG et al., 1991) evidenciou que **4**, **4.1**, **4.2** e **5** atuam como inibidores da dimerização da enzima HIV-1 protease, a qual é ativa apenas na forma de um homodímero. Esse resultado é observado quando linhas paralelas são obtidas para o gráfico de $[E]_0/\sqrt{v_i}$ vs $\sqrt{v_i}$, onde $[E]_0$ corresponde à concentração inicial de HIV-1 protease e v_i à velocidade inicial da reação em mol L⁻¹/segundo (Ms) (Figura 106, pág. 188). Para inibições do tipo competitiva ou mista, as linhas não paralelas intersectam-se na origem, ou em outro ponto do eixo Y, respectivamente. O fato de se encontrar moléculas inibidoras de dimerização é muito interessante, uma vez que os resíduos C- e N-terminais das estruturas que estabilizam o homodímero (folhas- β e β -hairpin) são altamente conservadas em HIV-1, tanto selvagem quanto mutantes, o que se configura em uma alternativa para a busca de novos agentes terapêuticos. Como a maioria dos inibidores já descritos são peptideomiméticos (BANNWARTH; REBOUD-RAVAUX, 2007) a abordagem com micromoléculas é inovadora e pode contribuir para impedir o desenvolvimento de resistência.

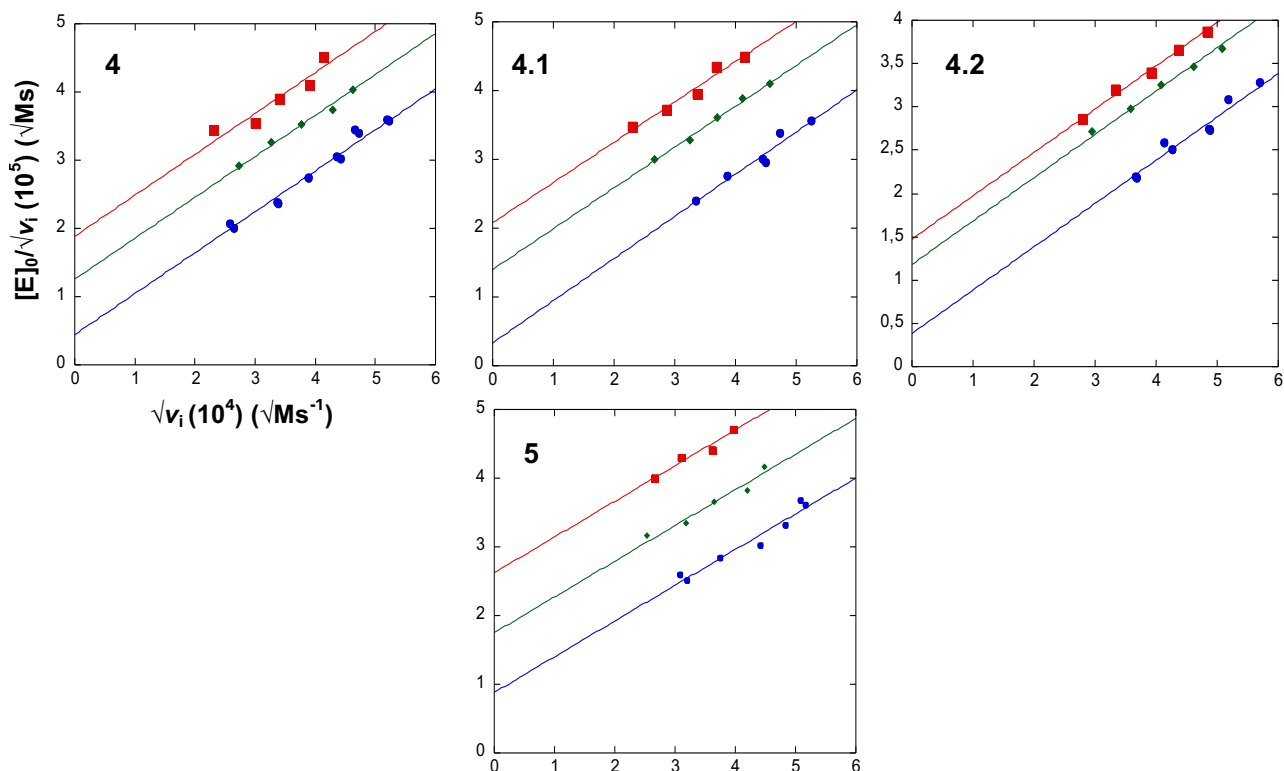
Por fim, o fato de (-)-(S)-**4.1** ser mais ativo que seu antípodo indica que esse estereoisômero contribui de maneira mais significativa para a atividade observada para a mistura racêmica e reforça a importância de estudos de pureza enantiomérica e configuração absoluta para compostos bioativos, principalmente quando alvos enzimáticos são utilizados.

Tabela 10 - Atividade inibidora de HIV-1 protease dos benzopiranos isolados de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*

Substâncias	CI ₅₀ (μM) ± DP*	K _{id} (μM)
4	2,85 ± 0,18	2,21
4.1	2,31 ± 0,08	1,35
4.2	3,14 ± 0,11	3,16
5	19,02 ± 0,52	14,3

*Não existem substâncias específicas para serem utilizados como controles positivos para inibição de dimerização, no entanto, compostos peptidomiméticos podem apresentar atividade da ordem de 100-1000 vezes mais potentes (BANNWARTH et al., 2009)

Figura 106 - Gráficos de atividade inibidora de HIV-1 protease para **4**, **4.1**, **4.2** e **5**. Linhas azuis representam a reação enzimática na ausência de inibidor; Linhas verdes representam reação enzimática na presença de inibidor na concentração de 2,5 μM para **4**, 1,7 para **4.1**, 2,8 para **4.2** e 17 para **5**; Linhas vermelhas representam reação enzimática na presença de inibidor na concentração de 4,9 μM para **4**, 2,8 para **4.1**, 5,1 para **4.2** e 22,6 para **5**. Linhas paralelas indicam inibição de dimerização



3.5.4 Avaliação da presença do composto racêmico **4** no extrato aprótico das folhas de *Peperomia obtusifolia*

Nessa etapa, devido ao fato do cromano **4** ter sido isolado como uma mistura racêmica, avaliou-se a presença do referido racemato em um extrato aprótico das folhas de *P. obtusifolia*. Essa abordagem baseou-se na possibilidade, em condições próticas, de protonação do oxigênio O-1, com posterior abertura do anel benzopirano e formação de uma hidroxila fenólica e um carbocátion terciário e alílico. O carbocátion poderia, então, ser atacado tanto pela face *si* quanto *re*, formando proporções iguais dos enantiômeros *R* e *S* (Figura 107, pág. 190) (BATISTA et al., 2011b). Assim, um extrato hexânico foi preparado a partir de folhas coletadas e, imediatamente, trituradas em N₂, ao abrigo da luz. O extrato foi analisado por CLAE quiral, nas mesmas condições previamente otimizadas para a resolução enantiomérica.

Como resultado, observou-se por coinjeção do padrão racêmico **4**, que a referida substância encontra-se também na forma racêmica no extrato hexânico, o que sugere que (\pm)-**4** não se trata de um artefato gerado durante o isolamento (Figura 108, pág. 190). Esses resultados indicam ainda que o benzopirano é biossintetizado de forma não estereosseletiva (BATISTA et al., 2009), levantando dúvidas a respeito do nível de controle enzimático na etapa de ciclização e formação do núcleo benzopirano. Como a possibilidade de racemização pós-biossíntese induzida por fatores físico-químicos não pôde ser totalmente descartada, decidiu-se avaliar a influência de radiação ultravioleta, aquecimento e condições acídicas para a racemização de ambos enantiômeros de **4**. Essa avaliação foi o tema do projeto de Iniciação Científica da aluna Adriana Miranda dos Santos (FAPESP 2009/05098-3) e os resultados indicaram que, em nenhuma das condições avaliadas, houve formação do antípodo do enantiômero utilizado. Esses resultados reforçam a hipótese desse composto ser biossintetizado como uma mistura racêmica.

Figura 107 - Possível mecanismo de racemização de **4** em condições próticas

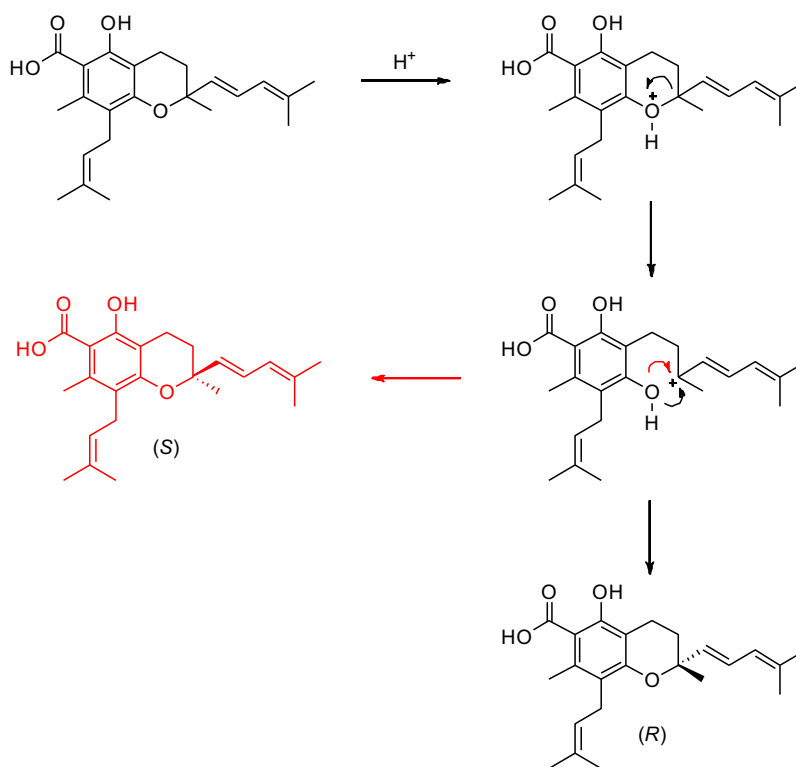
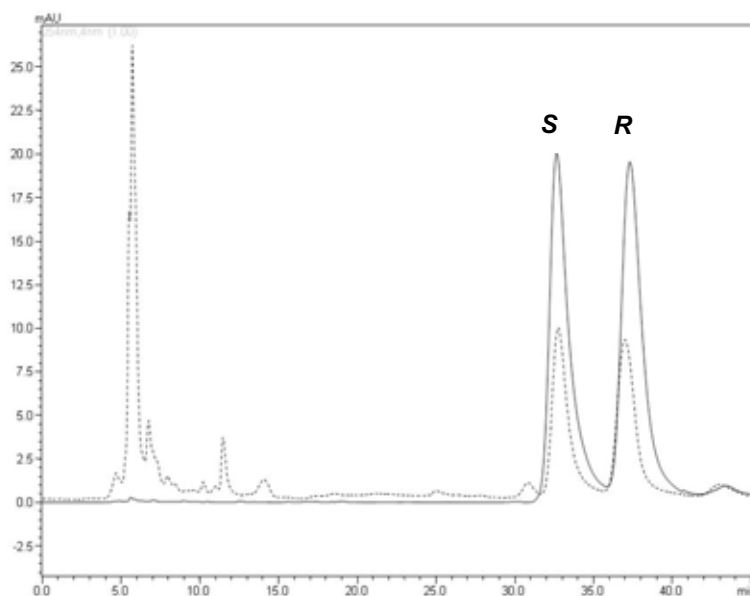


Figura 108 - Cromatogramas do extrato hexânico das folhas de *Peperomia obtusifolia* (tracejado) e de **4** (sólida). Coluna Chiralcel OD-H, 250 x 4,6 mm, 5 μ M, eluição isocrática, *n*-Hex/EtOH (99,5:0,5, v/v), vazão 0,7 mL/min e detecção em 254 nm



É interessante ainda destacar que o composto **4** constitui uma subunidade dos ésteres com monoterpenos **1.1-1.4** e **2.1-2.2**, os quais diferem, entre outros aspectos, quanto a estereoquímica em C-2. Os pares de compostos **1.1** ($t_R = 11,6$ min) e **1.2** ($t_R = 13,3$ min), **1.3** ($t_R = 14,8$ min) e **1.4** ($t_R = 16,2$ min), bem como **2.1** ($t_R = 9,0$ min) e **2.2** ($t_R = 10,4$ min), possuem a mesma configuração absoluta para a porção monoterpênica, porém configuração oposta para o núcleo cromano. Vale ressaltar que **1.1** e **1.4**, assim como **1.2** e **1.3** guardam relações enantioméricas entre si. A análise dos cromatogramas desses compostos empregando coluna quiral revela uma possível estereosseletividade em sua biossíntese, já que **1.1** e **1.2** correspondem a 66% da área do cromatograma (33% cada) enquanto que **1.3** e **1.4** representam 34% (17% cada) (Figuras 9 e 10, pág. 34). Esses dados sugerem que a planta se utiliza da mistura racêmica do composto **4**, no entanto, a esterifica com os enantiômeros do borneol de maneira seletiva (BATISTA et al., 2011a).

Em se tratando dos compostos esterificados com fenchol, apenas um enantiômero do monoterpeno em questão foi detectado (*1R,2R,4S*), o qual foi ligado a ambos os enantiômeros de **4** em proporções semelhantes. Esses dados sugeriram que apenas um estereoisômero do fenchol é utilizado em *Peperomia obtusifolia* para a biossíntese dos referidos ésteres. No entanto, esse resultado levou à reinvestigação, por CLAE quiral, da fração bruta enriquecida nos compostos de interesse, a qual revelou a presença de um pico minoritário, com espectro no UV idêntico e com menor tempo de retenção, quando comparado a todos os compostos previamente isolados (Figura 109, pág. 192). Esse composto (**2.0**) foi então isolado e análises por RMN de ^1H e espectrometria de massas de alta resolução, revelaram que se tratava de um estereoisômero de **2.1-2.2**. É interessante destacar que o espectro de RMN de ^1H apresentava alguns sinais duplicados, principalmente referentes à porção diênica ligada ao centro estereogênico em C-2, o que indicou uma possível mistura. Por fim, experimentos NOESY 1D revelaram a mesma estereoquímica relativa para a porção monoterpênica encontrada em **2.1-2.2**, ou seja, o núcleo cromano na posição *endo* e o hidrogênio H-2''' na posição *exo* do núcleo fenchila (Figura 110, pág. 192).

Figura 109 - Cromatogramas da Fração Bruta contendo os monoterpenos **1.1-1.4** e **2.1-2.2** isolados de *Peperomia obtusifolia* (acima) e o novo composto **2.0** (abaixo). Coluna Phenomenex Lux Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μ M, eluição isocrática, *n*-hexano 100%, vazão 0,8 mL/min e detecção em 254 nm

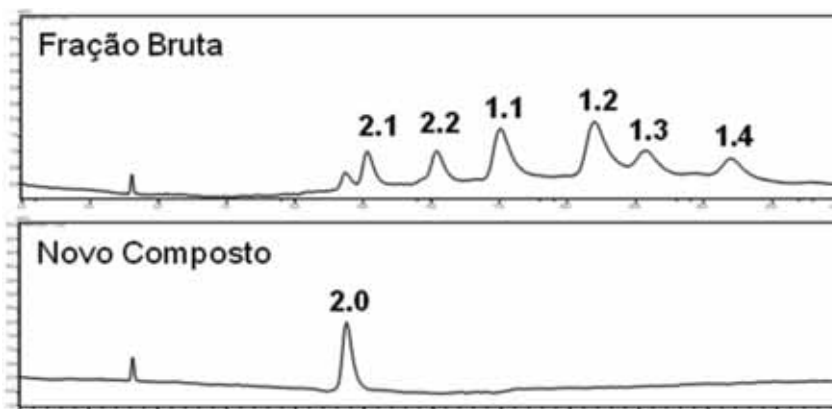
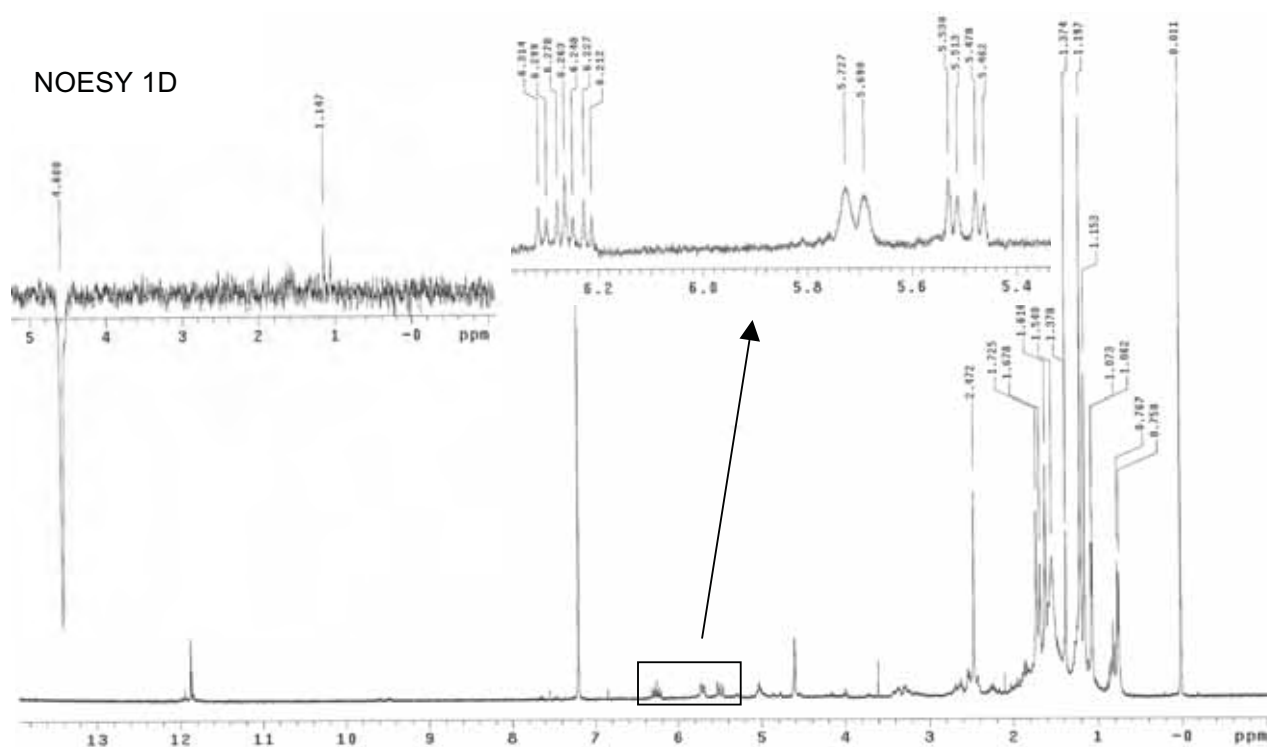
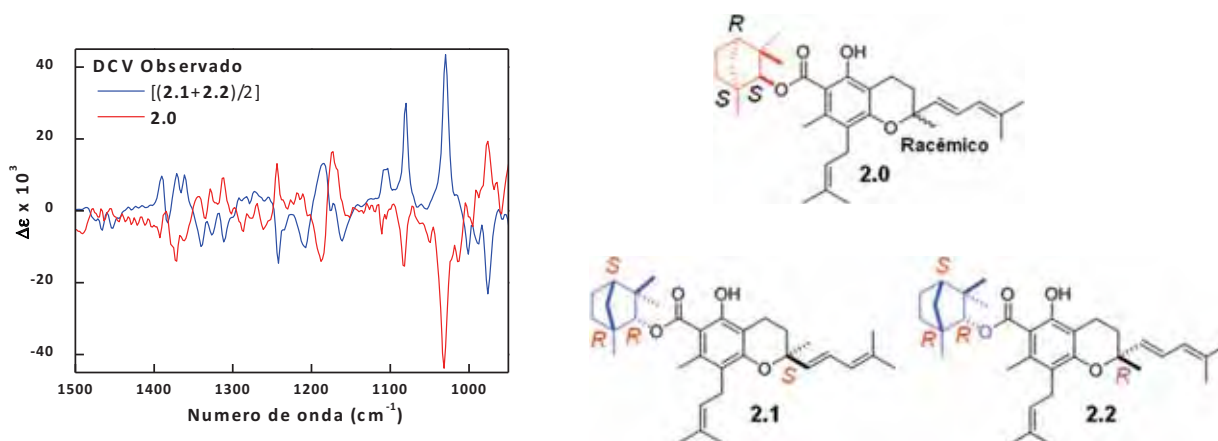


Figura 110 - Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e NOESY 1D de **2.0**



Uma vez estabelecida a configuração relativa de **2.0**, o próximo passo consistiu na determinação de sua configuração absoluta. Para tanto, os espectros no IV e de DCV foram obtidos. A partir do espectro no IV foi possível confirmar que se tratava de um éster do cromano **4** com o monoterpene fenchol. No entanto, o espectro de DCV revelou que **2.0** trata-se de uma mistura diastereoisomérica de duas substâncias esterificadas com fenchol com configuração absoluta (1*S*,2*S*,4*R*), porém racêmico quanto ao centro C-2 da porção benzopirânica. Vale ressaltar que o monoterpene identificado trata-se do antípodo daquele previamente descrito. Essa conclusão baseou-se no fato do espectro experimental de DCV para **2.0** ser oposto àquele obtido pela média simples dos espectros de **2.1** e **2.2** (Figura 111, pág. 193). Como descrito anteriormente, a soma, seguida de divisão por 2, de dois espectros de diastereoisômeros, gera como resultado o espectro correspondente às porções da molécula com mesma configuração absoluta eliminando àquelas com configuração oposta. No caso de **2.0**, não se observam transições vibracionais consideradas marcadores para a porção benzopirânica, como por exemplo, fundamentais 122/123 e 130 (Figuras 84 e 85, págs. 145 e 147) (BATISTA et al., 2011a). Esses resultados só seriam possíveis no caso de proporções iguais de ambos os enantiômeros do núcleo cromano em questão, o que confirma o assinalamento proposto.

Figura 111 - Espectros experimentais de DCV de **2.0**, bem como da média simples dos espectros experimentais de **2.1** e **2.2**



Por fim, todos os resultados apresentados até o presente momento sugerem que, sob as condições de análise empregadas, *Peperomia obtusifolia* produz o cromano **4** de forma racêmica, bem como ambos os enantiômeros dos monoterpenos *endo*-borneol e *endo*-fenchol, porém os utiliza de maneira estereosseletiva na formação dos ésteres. A partir dos dados obtidos, não é possível inferir a respeito da proporção na qual os enantiômeros dos referidos monoterpenos são biossintetizados. Os mesmos resultados ainda reforçam a potencialidade da técnica de DCV em determinar a configuração absoluta de moléculas complexas em solução, sem derivatizações e, nesse último exemplo, mesmo em uma mistura diastereoisomérica e sem a necessidade de cálculos mecânico-quânticos adicionais.

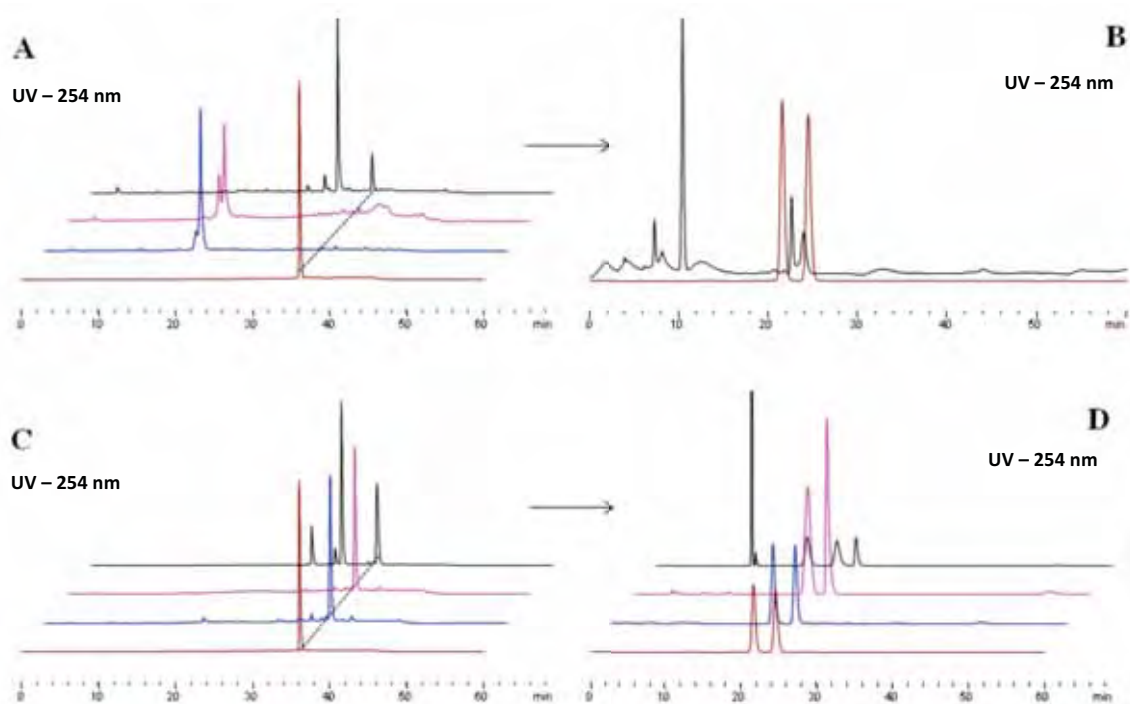
3.5.5 Avaliação da presença do composto racêmico **5, em diferentes órgãos vegetais e estágios de desenvolvimento de *Piper gaudichaudianum***

O ácido gaudichaudiânico (**5**) tem sido rotineiramente isolado no presente grupo de pesquisa, no entanto, essa é a primeira vez que esse composto é descrito como uma mistura racêmica. Devido às características químicas do anel *2H*-cromeno, espera-se que, na presença de condições ácidas, possa ocorrer abertura do anel pirano de maneira análoga à descrita para **4** (Figura 107, pág. 190). Portanto, a fim de comprovar que o metabólito racêmico isolado não é um artefato gerado durante os processos de isolamento e purificação, nessa etapa, foi realizado um estudo utilizando CLAE quiral para monitorar a presença do metabólito racêmico **5** em extratos apróticos (AcOEt) de raízes, caules e folhas de um espécime adulto, bem como em plântulas. A mesma análise foi também realizada empregando coluna com fase reversa (C-18) não quiral.

A partir dos resultados das análises cromatográficas em fase reversa, foi possível observar que o ácido gaudichaudiânico é, de fato, o benzopirano majoritário em *P. gaudichaudianum*, uma vez que foi detectado de forma predominante em todos os órgãos da planta adulta. No entanto, é interessante destacar que o mesmo metabólito foi detectado apenas nas raízes das plântulas, enquanto ausente nos outros órgãos vegetais. Esses resultados sugerem que **5** é biossintetizado inicialmente nas

raízes e, durante o desenvolvimento vegetal, é translocado para outros órgãos ou tem sua biossíntese iniciada nos mesmos. As análises empregando coluna com fase estacionária quiral revelaram que o metabólito **5** se apresenta como racemato em todos os órgãos da planta adulta e também nas raízes das plântulas, o que permite sugerir que não se trata de um artefato (Figura 112, pág. 196). Assim, a biossíntese de outro metabólito racêmico corrobora os questionamentos considerados na seção **3.5.4** (pág. 189) para o cromano **4**, ou seja, a ausência de controle enzimático na etapa de ciclização e formação do anel *2H*-cromeno ou a presença de dois sistemas enzimáticos distintos, devotados à formação de cada enantiômero, como se observa na biossíntese de monoterpenos enantioméricos em uma mesma matriz vegetal (DEWICK, 2009). Outra possibilidade que não pode ser descartada é a racemização *in vivo*, posterior à biossíntese de um metabólito enantiomericamente puro.

Figura 112 - Cromatogramas obtidos para o composto racêmico **5** (marron) e extratos AcOEt de folhas (azul), caules (rosa) e raízes (preto). Porção superior: plântulas (**A**) C-18 e (**B**) quiral. Porção inferior: planta adulta (**C**) C-18 e (**D**) quiral. Condições: (**A**) e (**C**) Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), modo gradiente, 5-100% de MeOH em AcOH aquoso (0,05%) em 30 min, seguido de 10 min em 100% de MeOH, 1,0 mL/min; (**B**) e (**D**) Phenomenex LUX Cellulose-1 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), modo isocrático, *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5, v/v) + 0,05% AcOH, 0,8 mL/min



6 CONCLUSÕES

O presente trabalho descreveu o estudo fitoquímico, focado no isolamento de benzopiranos, das espécies *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae), o qual resultou no isolamento de 5 compostos, sendo dois deles inéditos na literatura. Investigações posteriores revelaram que as referidas substâncias tratavam-se de misturas enantioméricas/diastereoisoméricas, as quais foram separadas por meio de cromatografia quiral, totalizando 16 compostos. Como todas as substâncias descritas eram quirais, no desenvolvimento desse projeto objetivou-se ainda a utilização de métodos quirópticos, tais como dicroísmo circular vibracional e eletrônico, associados a cálculos mecânico-quânticos, para a determinação da configuração absoluta dos centros estereogênicos presentes, bem como dos confôrmeros predominantes em solução. Uma vez caracterizados, os compostos em questão foram avaliados quanto sua atividade tripanocida e inibidora de HIV-1 protease. Assim, foi possível identificar a atividade tripanocida seletiva e sinérgica para os enantiômeros do cromeno **5**, isolados de *Piper gaudichaudianum*, enquanto não seletiva para os enantiômeros dos cromanos **3** e **4**, isolados de *Peperomia obtusifolia*. No entanto, quando avaliados frente a atividade inibidora de HIV-1 protease, o enantiômero (-)-(S)-**4**, mostrou-se mais ativo que a mistura racêmica e que seu antípodo. Diante do isolamento de compostos racêmicos, o que não é usual em produtos naturais, investigou-se a presença de racematos dos compostos bioativos **4** e **5**, em extratos obtidos com solventes apróticos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum*, respectivamente. Os resultados sugeriram que os compostos são biossintetizados na forma de misturas racêmicas, sendo que o composto **5** é sintetizado desde estágios iniciais de desenvolvimento, primeiramente nas raízes, e então translocado e/ou sintetizado nos órgãos aéreos do espécime adulto. Todos os dados obtidos com o desenvolvimento do presente trabalho permitiram uma maior compreensão de fatores químicos relacionados aos cromanos e cromenos isolados das espécies selecionadas, além da sedimentação do conhecimento e aplicação dos métodos de dicroísmo circular e cálculos mecânico-quânticos para estudos de configuração absoluta, o que é inovador na Química de Produtos Naturais no Brasil.

Por fim, estudos focados em fatores estereoquímicos evidenciaram o papel da configuração absoluta para as atividades biológicas investigadas e forneceram maiores subsídios para o entendimento de alguns aspectos biossintéticos envolvidos na formação desses metabólitos nas espécies de Piperaceae estudadas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing, 1995. 469 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RES 356**: determina como medida de interesse sanitário, a apreensão, em todo território nacional, de qualquer produto farmacêutico a base de kava-kava (*Piper methysticum* L.) que não possuam tarja vermelha contendo os dizeres venda sob prescrição médica. Brasília, DF, 2002a. 47 p. Disponível em:

<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3749040&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=32&hdTipoNorma=32&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&font=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=32&numero=356&data=&dataFim=&ano=&pag=1>. Acesso em: 30 nov. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RES 357**: determina como medida de interesse sanitário, a apreensão, em todo território nacional, de qualquer produto farmacêutico a base de Erva de São João (*Hypericum perforatum*) que não possuam tarja vermelha contendo os dizeres venda sob prescrição médica. Brasília, DF, 2002b. 47 p. Disponível em:

<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3749058&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=32&hdTipoNorma=32&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&font=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=32&numero=357&data=&dataFim=&ano=&pag=1>. Acesso em: 30 nov. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RES 14**: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF, 2010. 85 p. Disponível em:

<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=4053023&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=32&hdTipoNorma=32&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&font=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=32&numero=14&data=&dataFim=&ano=&pag=1> Acesso em: 30 nov. 2011.

AHMED, S. A.; ROSS, S. A.; SLADE, D.; RADWAN, M. M.; ZULFIQAR, F.; ELSOHLI, M. A. Cannabinoid ester constituents from high-potency *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 71, n. 4, p. 536-542, Apr. 2008.

ALBIERO, A. L. M.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 24, n. 4, p. 550-554, oct. 2005.

- ALLENMARK, S.; GAWRONSKI, J. Determination of absolute configuration: an overview related to this special issue. **Chirality**, New York, v. 20, n. 5, p. 606-608, May 2008.
- ANTUS, S.; KURTÁN, T.; JUHÁSZ, L.; KISS, L.; HOLLÓSI, M.; MÁJER, Z. S. Chiroptical properties of 2,3-dihydrobenzo[b]furan and chromane chromophores in naturally occurring O-heterocycles. **Chirality**, New York, v. 13, n. 8, p. 493-506, Aug. 2001.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 215-218, Apr. 2004.
- ASHWOOD, V. A.; BUCKINGHAM, R. E.; CASSIDY, F.; EVANS, J. M.; FARUK, E. A.; HAMILTON, T. C.; NASH, D. J.; STEMP, G.; WILLCOCKS, K. Synthesis and antihypertensive activity of l-(cyclic amido)-2H-1-benzopyrans. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 29, n. 11, p. 2194-2201, Nov. 1986.
- ASRES, K.; SEYOUM, A.; VEERESHAM, C.; BUCAR, F.; GIBBONS, S. Naturally derived anti-HIV agents. **Phytotherapy Research**, New York, v. 19, n. 7, p. 557-581, July 2005.
- ATWAL, K. S.; GROVER, G. J.; AHMED, S. Z.; SLEPH, P. G.; DZWONCZYK, S.; BAIRD, A. J.; NORMANDIN, D. E. Cardioselective anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel openers. 3. Structure- activity studies on benzopyranyl cyanoguanidines: modification of the cyanoguanidine portion. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 38, n. 17, p. 3236-3245, Aug. 1995.
- AUTSCHBACH, J. Computing chiroptical properties with first-principles theoretical methods: background and illustrative examples. **Chirality**, New York, v. 21, n. 1E, p. E116-E152, Dec. 2009.
- AWAD, R.; AHMED, F.; BOURBONNAIS-SPEAR, N.; MULLALLY, M.; TA, C. A.; TANG, A.; MERALI, Z.; MAQUIN, P.; CAAL, F.; CAL, V.; POVEDA, L.; VINDAS, P. S.; TRUDEAU, V. L.; ARNASON, J. T. Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: effects on the GABAergic system. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 257-264, Sept. 2009.
- BADA, J. L. Origins of homochirality. **Nature**, London, v. 374, n. 6523, p. 594-595, Apr. 1995.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 51, n. 7, p. 899-902, Aug. 1999.

BANNWARTH, L.; REBOUD-RAVAUX, M. New approaches for elucidating protease biology and therapeutic opportunities. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 35, n. 3, p. 551-554, June 2007.

BANNWARTH, L.; ROSE, T.; DUFAU, L.; VANDERESSE, R.; DUMOND, J.; JAMART-GRÉGOIRE, B.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E.; REBOUD-RAVAUX, M. Dimer disruption and monomer sequestration by alkyl tripeptides are successful strategies for inhibiting wild-type and multidrug-resistant mutated HIV-1 proteases. **Biochemistry**, Easton, v. 48, n. 2, p. 379-387, Jan. 2009.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, n. 3, p. 538-540, Mar. 2008.

BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; SILVA MOTA, J. da; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SILVA BOLZANI, V. da; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and absolute configuration assignment of a natural racemic chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality**, New York, v. 21, n. 9, p. 799-801, Oct. 2009.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron: Asymmetry**, New York, v. 21, n. 19, p. 2402-2407, Oct. 2010.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 76, n. 8, p. 2603-2612, Apr. 2011a.

BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, n., p. 1154-1160, May 2011b.

BENTLEY, R. Chiral: a confusing etymology. **Chirality**, New York, v. 22, n. 1, p. 1-2, Jan. 2010.

BEROVA, N.; BARI, L. D.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, London, v. 36, n. 6, p. 914, June 2007.

BOBBITT, D. R. Instrumentation for the measurement of circular dichroism; past, present and future development. In: PURDIE, N.; BRITAIN, H. G. (Ed.). **Techniques and instrumentation in analytical chemistry**: analytical applications of circular dichroism. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 14, cap. 2, p. 15-52.

BOUCHOUCHA, M.; UZZAN, B.; COHEN, R. Metformin and digestive disorders. **Diabetes & Metabolism**, New York, v. 37, n. 2, p. 90-96, Apr. 2011.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 141-148, Nov. 2008.

BRENK, R.; SCHIPANI, A.; JAMES, D.; KRASOWSKI, A.; GILBERT, I. H.; FREARSON, J.; WYATT, P. G. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 3, n. 3, p. 435-444, Mar. 2008.

BRITAIN, H. G. Introduction to chiroptical phenomena. In: PURDIE, N.; BRITAIN, H. G. (Ed.). **Techniques and instrumentation in analytical chemistry**: analytical applications of circular dichroism. Amsterdam: Elsevier, 1994. v. 14, cap. 1, p. 1-14.

BÜRGI, T.; VARGAS, A.; BAIKER, A. VCD spectroscopy of chiral cinchona modifiers used in heterogeneous enantioselective hydrogenation: conformation and binding of non-chiral acids. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, Cambridge, v. 2002, n. 9, p. 1596-1601, Sept. 2002.

BURKE, S. J.; JACOBS, H.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Structural and spectral assignment by 2D NMR of a new prenylated benzopyrancarboxylic acid and structural reassignment of a related compound. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester v. 41, n. 2, p. 145-146, Feb. 2003.

CAMANDAROBA, E. L. P.; LIMA, C. M. P.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 97-103, abr. 2002.

CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A. C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; ROSARIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 123, n. 3, p. 413-422, June 2009.

CHEN, C. M.; JAN, F. Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**, Sendai, v. 29, n. 3, p. 411-414, Mar. 1989.

CHÊNEVERT, R.; COURCHESNE, G.; PELCHAT, N. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of α -tocotrienol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 15, p. 5389-5396, Aug. 2006.

CHO, H.; KATOH, S.; SAYAMA, S.; MURAKAMI, K.; NAKANISHI, H.; KAJIMOTO, Y.; UENO, H.; KAWASAKI, H.; AISAKA, K.; UCHIDA, I. Synthesis and selective coronary vasodilatory activity of 3,4-dihydro-2,2-bis(methoxymethyl)-2*H*-1-benzopyran-3-ol derivatives: novel potassium channel openers. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 39, n. 19, p. 3797-3805, Sept. 1996.

CICHEWICZ, R. H.; CLIFFORD, L. J.; LASSEN, P. R.; CAO, X.; FREEDMAN, T. B.; NAFIE, L. A.; DESCHAMPS, J. D.; KENYON, V. A.; FLANARY, J. R.; HOLMAN, T. R.; CREWS, P. Stereochemical determination and bioactivity assessment of (*S*)-(+)-curcuphenol dimers isolated from the marine sponge *Didiscus aceratus* and synthesized through laccase biocatalysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 13, n. 19, p. 5600-5612, Oct. 2005.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001. 1536 p.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, jan. 2002.

COS, P.; MAES, L.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – An update (1998-2007). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 11, p. 1323-1337, Sept. 2008.

CRABBÉ, P. **Actividad optica, dispersion rotatoria optica y dicroismo circular en quimica organica**. Washington, DC: OEA, 1974. 68 p.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature as source of medicines; novel drugs from nature; screening for antitumor activity. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural product II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.06, p. 135-175.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; KINGSTON, D. G. I. Terrestrial plants as a source of novel pharmaceutical agents. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural product II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 2, cap. 2.02, p. 5-39.

DAVANKOV, V. Chirality as an inherent general property of matter. **Chirality**, New York, v. 18, n. 7, p. 459-461, July 2006.

DEBIE, E.; DE GUSSEM, E.; DUKOR, R. K.; HERREBOUT, W.; NAFIE, L. A.; BULTINCK, P. A Confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or Raman optical activity. **ChemPhysChem**, v. 12, n. 8, p. 1542-1549. 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 539 p.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETO, M. (Ed.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. v. 1, cap. 5, p. 48-74.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, nov. 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. 604 p.

EL-AGRODY, A. M.; EL-LATIF, M. S. A.; EL-HADY, N. A.; FAKERY, A. H.; BEDAIR, A. H. Heteroaromatization with 4-hydroxycoumarin part II: synthesis of some new pyrano[2,3-d]pyrimidines, [1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines and pyrimido[1,6-b]-[1,2,4]triazine derivatives. **Molecules**, Basel, v. 6, n. 6, p. 519-527, May 2001.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 1267 p.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 113, n. 2, p. 354-368, Feb. 2007.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICALLELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 445-450, Jan. 2008.

FLACK, H. D.; BERNARDINELLI, G. The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. **Chirality**, New York, v. 20, n. 5, p. 681-690, May 2008.

FONDOM, N. Y.; CASTRO-NAVA, S.; HUERTA, A. J. Seasonal variation in photosynthesis and diel carbon balance under natural conditions in two *Peperomia* species that differ with respect to leaf anatomy. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, Lawrence, v. 136, n. 1, p. 57-69, Jan. 2009.

FREEDMAN, T. B.; CAO, X.; DUKOR, R. K.; NAFIE, L. A. Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. **Chirality**, New York, v. 15, n. 9, p. 743-758, Oct. 2003.

FREEDMAN, T. B.; CAO, X.; PHILLIPS, L. M.; CHENG, P. T. W.; DALTERIO, R.; SHU, Y.-Z.; ZHANG, H.; ZHAO, N.; SHUKLA, R. B.; TYMIAK, A.; GOZO, S. K.; NAFIE, L. A.; GOUGOUTAS, J. Z. Determination of the absolute configuration and solution conformation of a novel disubstituted pyrrolidine acid A by vibrational circular dichroism. **Chirality**, New York, v. 18, n. 9, p. 746-753, Oct. 2006.

GADWOOD, R. C.; KAMDAR, B. V.; DUBRAY, L. A. C.; WOLFE, M. L.; SMITH, M. P.; WATT, W.; MIZSAK, S. A.; GROUPI, V. E. Synthesis and biological activity of spirocyclic benzopyran imidazolone potassium channel openers. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 36, n. 10, p. 1480-1487, May 1993.

GAL, J.; KOSTYANOVSKY, R. G. When did Louis Pasteur present his memoir on the discovery of molecular chirality to the Académie des sciences? Analysis of a discrepancy. **Chirality**, New York, v. 20, n. 10, p. 1072-1084, Oct. 2008.

GAWRONSKI, J. K. Circular dichroism and chirality of dienes. In: BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. (Ed.). **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. v. 1, cap. 11, p. 305-336.

GOEL, A.; RAM, V. J. Natural and synthetic 2*H*-pyran-2-ones and their versatility in organic synthesis. **Tetrahedron**, Oxford, v. 65, n. 38, p. 7865-7913, Sept. 2009.

GRABOWSKI, K.; SCHNEIDER, G. Properties and architecture of drugs and natural products revisited. **Current Chemical Biology**, Pennington, v. 1, n. 1, p. 115-127, Jan. 2007.

GRÜTTER, C.; ALONSO, E.; CHOUGNET, A.; WOGGON, W.-D. A biomimetic chromanol cyclization leading to α -tocopherol. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 45, n. 7, p. 1126-1130, Feb. 2006.

HEINRICH, M. Ethnopharmacology and drug discovery. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.12, p. 351-381.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, London, v. 212, n. 5068, p. 1385-1386, Dec. 1966.

HOLZWARTH, G.; HSU, E. C.; MOSHER, H. S.; FAULKNER, T. R.; MOSCOWITZ, A. Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 96, n. 1, p. 251-252, Jan. 1974.

IWAZAKI, M. D. C.; SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, J. H. G. Morfo-anatomia comparativa da flor de *Peperomia dahlstedtii* C. DC., *Ottonia martiana* Miq. e *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 545-558, out. 2006.

KASHIWADA, Y.; YAMAZAKI, K.; IKESHIRO, Y.; YAMAGISHI, T.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; MIZUKI, K.; COSENTINO, L. M.; FOWKE, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K-H. Isolation of rhododaurichromanic acid B and the anti-HIV principles rhododaurichromanic acid A and rhododaurichromenic acid from *Rhododendron dauricum*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1559-1563, Feb. 2001.

KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**, London, v. 39, n. 11, p. 4466-4503, Nov. 2010.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, Durham, v. 79, n. 4, p. 529-538, May 2007.

KIKUCHI, T.; MORI, Y.; YOKOI, T.; NAKAZAWA, S.; KURODA, H.; MASADA, Y.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, K. Structure and absolute configuration of sargatriol, a novel isoprenoid chromenol from a brown alga *Sargassum tortile* C. Agardh. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, n. 1, p. 106-113, Jan. 1983.

KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 67, n. 21, p. 2398-2402, Nov. 2006.

KOYAMA, H.; BOUERES, J. K.; MILLER, D. J.; BERGER, J. P.; MacNAUL, K. L.; WANG, P-R.; IPPOLITO, M. C.; WRIGHT, S. D.; AGRAWAL, A. K.; MOLLER, D. E. (2R)-2-Methylchromane-2-carboxylic acids: discovery of selective PPAR α agonists as hypolipidemic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, n. 14, p. 3347-3351, July 2005.

KUPPENS, T.; BULTINCK, P.; LANGENAEKER, W. Determination of absolute configuration via vibrational circular dichroism. **Drug Discovery Today: Technologies**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 269-275, Dec. 2004.

KWIT, M.; GAWRONSKI, J.; BOYD, D. R.; SHARMA, N. D.; KAIK, M.; O'FERRALL, R. A. M.; KUDAVALLI, J. S. Toluene dioxygenase-catalyzed synthesis of cis-dihydrodiol metabolites from 2-substituted naphthalene substrates: assignments of absolute configurations and conformations from circular dichroism and optical rotation measurements. **Chemistry - A European Journal**, Weinheim, v. 14, n. 36, p. 11500-11511, Dec. 2008.

- LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; 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**, Washington, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, Nov. 2004.
- LEAL, W. S.; SHI, X.; LIANG, D.; SCHAL, C.; MEINWALD, J. Application of chiral gas chromatography with electroantennographic detection to the determination of the stereochemistry of a cockroach sex pheromone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Baltimore, v. 92, n. 4, p. 1033-1037, Feb. 1995.
- LEE, J.; OH, W. K.; AHN, J. S.; KIM, Y. H.; MBAFOR, J. T.; WANDJI, J.; FOMUM, Z. T. Prenylisoflavonoids from *Erythrina senegalensis* as novel HIV-1 protease inhibitors. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 3, p. 268-270, Feb. 2009.
- LEE, T. D.; YANG, C. N. Question of parity conservation in weak interactions. **Physical Review**, New York, v. 104, n. 1, p. 254-258, Oct. 1956.
- LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C. M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A. L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 253-263, Dec. 1998.
- LI, N.; WU, J. L.; SAKAI, J. I.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 66, n. 11, p. 1421-1426, Dec. 2003.
- LIGHTNER, D. A. The octant rule. In: BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. (Ed.). **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. v. 1, cap. 10, p. 261-304.
- LIPINSKI, C. A.; ALDINGER, C. E.; BEYER, T. A.; BORDNER, J.; BURDI, D. F.; BUSSOLOTI, D. L.; INSKEEP, P. B.; SIEGEL, T. W. Hydantoin bioisosteres. *In vivo* active spiro hydroxy acetic acid aldose reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 35, n. 12, p. 2169-2177, June 1992.
- LOMBARDI, R. A.; NAFIE, L. A. Observation and calculation of vibrational circular birefringence: a new form of vibrational optical activity. **Chirality**, New York, v. 21, n. 1E, p. E277-E286, Dec. 2009.
- LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 68, n. 15, p. 2053-2058, Aug. 2007.

- LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; FLAUSINO JUNIOR, O.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, June 2010.
- LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, out. 2010.
- MA, T.; LIU, L.; XUE, H.; LI, L.; HAN, C.; WANG, L.; CHEN, Z.; LIU, G. Chemical library and structure–activity relationships of 11-demethyl-12-oxo calanolide A analogues as anti-HIV-1 agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 51, n. 5, p. 1432-1446, Mar. 2008.
- MacDERMOTT, A. J. Chirality: distinguishing true chirality from its accidental imitators. **Nature**, London, v. 323, n. 6083, p. 16-17, Sept. 1986.
- MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 667-670, Sept. 2003.
- MASON, S. F. From Pasteur to parity nonconservation: theories of the origin of molecular chirality. In: BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. (Ed.). **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. v. 1, cap. 2, p. 37-50.
- McFERRER, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 183-187, Mar. 1998.
- MICHEL, J.; DUARTE, R.; BOLTON, J.; HUANG, Y.; CACERES, A.; VELIZ, M.; SOEJARTO, D.; MAHADY, G. Medical potential of plants used by the Q'eqchi Maya of Livingston, Guatemala for the treatment of women's health complaints. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 92-101, Oct. 2007.
- MICHEL, J. L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; KRUNIC, A.; ORJALA, J.; VELIZ, M.; SONI, K. K.; SOEJARTO, D. D.; CACERES, A.; PEREZ, A.; MAHADY, G. B. Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of *Piper hispidum* Swingle (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 220-226, May 2010.
- MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; MAIA, B. H. L. N. S.; TEIXEIRA, S. D. Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 10, p. 2379-2383, Oct. 2003.

- MITTL, P. R. E.; GRÜTTER, M. G. Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 16, n. 6, p. 769-775, Dec. 2006.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, fev. 2001.
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; ANJOS JUNIOR, J. F.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 10, p. 670-675, Oct. 2007.
- MORANDIM-GIANNETTI, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; OLIVEIRA, H. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 4, n. 17, p. 1810-1814, Sept. 2010.
- MORI, J.; IWASHIMA, M.; TAKEUCHI, M.; SAITO, H. A synthetic study on antiviral and antioxidative chromene derivative. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, n. 3, p. 391-396, Mar. 2006.
- MORI, K. Determination of structure including absolute configuration of bioactive natural products. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 9, cap. 9.05, p. 147-167.
- MORI, K. Bioactive natural products and chirality. **Chirality**, New York, v. 23, n. 6, p. 449-462, July 2011.
- MOSS, G. P. Basic terminology of stereochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, Durham, v. 68, n. 12, p. 2193-2222, Dec. 1996.
- MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 25, n. 1, p. 1-7, Jan. 2011.
- MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 6, p. 620-623, May 2009.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 86, n. 12, p. 999-1002, Nov. 2000.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.
- NAFIE, L. A. Vibrational circular dichroism: a new tool for the solution-state determination of the structure and absolute configuration of chiral natural product molecules. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 3, n. 3, p. 451-466, Mar. 2008.
- NAFIE, L. A. **Vibrational optical activity**: principles and applications. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. 398 p.
- NAFIE, L. A.; CHENG, J. C.; STEPHENS, P. J. Vibrational circular dichroism of 2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 97, n. 13, p. 3842-3843, June 1975.
- NAFIE, L. A.; DIEM, M.; VIDRINE, D. W. Fourier transform infrared vibrational circular dichroism. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 101, n. 2, p. 496-498, Jan. 1979.
- NAFIE, L. A.; DUKOR, R. K.; FREEDMAN, T. B. Vibrational circular dichroism. In: CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R. (Ed.). **Handbook of vibrational spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 2002. v. 1, cap. 6, p. 734-748.
- NAFIE, L. A.; KEIDERLING, T. A.; STEPHENS, P. J. Vibrational circular dichroism. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 98, n. 10, p. 2715-2723, May 1976.
- NAZARIAN, Z.; EMAMI, S.; HEYDARI, S.; ARDESTANI, S. K.; NAKHJIRI, M.; POORRAJAB, F.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Novel antileishmanial chalconoids: synthesis and biological activity of 1- or 3-(6-chloro-2*H*-chromen-3-yl)propen-1-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 45, n. 4, p. 1424-1429, Apr. 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, n. 3, p. 461-477, Mar. 2007.
- NICOLAOU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H. J. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 122, n. 41, p. 9939-9953, Oct. 2000.

NICU, V. P.; BAERENDS, E. J. Robust normal modes in vibrational circular dichroism spectra. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, n. 29, p. 6107, May 2009.

ODONNE, G.; BOURDY, G.; CASTILLO, D.; ESTEVEZ, Y.; LANCHA-TANGO, A.; ALBAN-CASTILLO, J.; DEHARO, E.; ROJAS, R.; STIEN, D.; SAUVAIN, M. Ta'ta', Huayani: perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 149-158, Oct. 2009.

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**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 813-818, Oct. 1993.

ORTHOLAND, J-Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, New York, v. 8, n. 3, p. 271-280, June 2004.

PARMAR, V. S.; SHARMA, N. K.; HUSAIN, M.; WATTERSON, A. C.; KUMAR, J.; SAMUELSON, L. A.; CHOLLI, A. L.; PRASAD, A. K.; KUMAR, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JHA, A.; SINGH, A.; SINGH, I.; HIMANSHU; VATS, A.; SHAKIL, N. A.; TRIKHA, S.; MUKHERJEE, S.; SHARMA, S. K.; SINGH, S. K.; KUMAR, A.; JHA, H. N.; OLSEN, C. E.; STOVE, C. P.; BRACKEF, M. E.; MAREEL, M. M. Synthesis, characterization and *in vitro* anti-invasive activity screening of polyphenolic and heterocyclic compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 913-929, Mar. 2003.

PERAZZO, F.; SOUZA, G.; LOPES, W.; CARDOSO, L.; CARVALHO, J.; NANAYAKKARA, N.; BASTOS, J. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 215-220. 2005.

PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M. I. S.; ABAD, F. C.; MARTINEZ, M. M.; OLIVEIRA, E. C.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Optimization of pressurized liquid extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1105, n. 1-2, p. 148-153, Feb. 2006a.

PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M. I. S.; ABAD, F. C.; JACQUES, R. A.; MARTINEZ, M. M.; OLIVEIRA, E. C.; CARAMÃO, E. B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1105, n. 1-2, p. 115-118, Feb. 2006b.

PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SPEROTTO, A. R. M.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A.; SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 47, n. 9, p. 2389-2395, Sept. 2009.

PESCITELLI, G.; KURTÁN, T.; FLÖRKE, U.; KROHN, K. Absolute structural elucidation of natural products: a focus on quantum-mechanical calculations of solid-state CD spectra. **Chirality**, New York, v. 21, n. 1E, p. E181-E201, Jan. 2009.

POLAVARAPU, P. L. Why is it important to simultaneously use more than one chiroptical spectroscopic method for determining the structures of chiral molecules? **Chirality**, New York, v. 20, n. 5, p. 664-672, May 2008.

PRADO, S.; JANIN, Y. L.; SAINT-JOANIS, B.; BRODIN, P.; MICHEL, S.; KOCH, M.; COLE, S. T.; TILLEQUIN, F.; BOST, P. E. Synthesis and antimycobacterial evaluation of benzofurobenzopyran analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 2177-2186, Mar. 2007.

QUINN, R. J.; CARROLL, A. R.; PHAM, N. B.; BARON, P.; PALFRAMAN, M. E.; SURAWEEERA, L.; PIERENS, G. K.; MURESAN, S. Developing a drug-like natural product library. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 71, n. 3, p. 464-468, Mar. 2008.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Chemoecology**, Basel, v. 19, n. 2, p. 73-80, July 2009.

RHO, M.-C.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; CHOI, J.-H.; KANG, J. Y.; KIM, K.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 68, n. 6, p. 899-903, Mar. 2007.

RUKACHAISIRIKUL, T.; SIRIWATTANAKIT, P.; SUKCHAROENPHOL, K.; WONGVEIN, C.; RUTTANAWEANG, P.; WONGWATTANAVUCH, P.; SUKSAMRARN, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 173-176, Aug. 2004.

SABRY, N. M.; MOHAMED, H. M.; KHATTAB, E. S. A. E. H.; MOTLAQ, S. S.; EL-AGRODY, A. M. Synthesis of 4*H*-chromene, coumarin, 12*H*-chromeno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives and some of their antimicrobial and cytotoxicity activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 765-772, Feb. 2011.

SADLEJ, J.; DOBROWOLSKI, J. C.; RODE, J. E. VCD spectroscopy as a novel probe for chirality transfer in molecular interactions. **Chemical Society Reviews**, London, v. 39, n. 5, p. 1478, May 2010.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 66, n. 5, p. 573-579, Mar. 2005.

SAMAIN, M-S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; JIMENEZ RODRIGUEZ, F.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 5, p. 677-688, May 2010.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; REYES-TREJO, B.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; CASTILLO-HENKEL, C.; CERVANTES-CUEVAS, H.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Fitoterapia**, New York, v. 81, n. 1, p. 66-71, Jan. 2010.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 455-465, jul./set. 2007.

SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, Easton, v. 104, n. 1, p. 17-117, Jan. 2004.

SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Plant diversity from Brazilian cerrado and atlantic forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.05, p. 95-133.

SILVA, D. R.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 569-573, Mar. 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th ed. Danvers: John Wiley & Sons, 2005. 512 p.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 66, n. 18, p. 2177-2215, Sept. 2005.

SMITH, H. E. Applications of the benzene sector and benzene chirality rules. In: BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. (Ed.). **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. v. 1, cap. 14, p. 397-430.

SNATZKE, G.; HO, P. C. Circular dichroism - XLVI: rules for benzene cotton-effects. **Tetrahedron**, Oxford, v. 27, n. 15, p. 3645-3653, July 1971.

SOAI, K.; SHIBATA, T.; MORIOKA, H.; CHOJI, K. Asymmetric autocatalysis and amplification of enantiomeric excess of a chiral molecule. **Nature**, London, v. 378, n. 6559, p. 767-748, Dec. 1995.

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; PAN, J-J. The determination of the absolute configurations of chiral molecules using vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy. **Chirality**, New York, v. 20, n. 5, p. 643-663, May 2008.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 229-232, Sept. 1998.

TANG, Y.; WEI, J.; ZHONG, W.; LIU, X. Synthesis and characterization of chroman-containing compounds and their preliminary assessment of cytotoxicity toward two human cancer cell lines. **Heteroatom Chemistry**, Deerfield Beach, v. 21, n. 6, p. 423-429, July 2010.

TEIXEIRA, S. D. **Estudo fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua interação com morcegos frugívoros**. 2003. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

VAN OTTERLO, W. A. L.; NGIDI, E. L.; KUZVIDZA, S.; MORGANS, G. L.; MOLEELE, S. S.; DE KONING, C. B. Ring-closing metathesis for the synthesis of 2*H*- and 4*H*-chromenes. **Tetrahedron**, Oxford, v. 61, n. 42, p. 9996-10006, Oct. 2005.

VERPOORTE, R. Overview and introduction. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural product II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.01, p. 1-4.

VILLEGAS, L. F.; MARÇALO, A.; MARTIN, J.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. (+)-epi-alfa-bisbolol Is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the *in vivo* wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 10, p. 1357-1359, Oct. 2001.

VOGEL, H. G. Similarities between various systems of traditional medicine. Considerations for the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 179-190, Dec. 1991.

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**, Orlando, v. 42, n. 2, p. 477-497, Feb. 2007.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 77-81, jan. 1963.

- WELLS, J. A.; McCLENDON, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces. **Nature**, London, v. 450, n. 7172, p. 1001-1009, Dec. 2007.
- WETZEL, S.; LACHANCE, H.; WALDMANN, H. Natural products as lead sources for drug development. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.02, p. 5-46.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 384p.
- WOODY, R. W. Circular dichroism: an introduction. In: BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. (Ed.). **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. v. 1, cap. 1, p. 1-28.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet No. 340: Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 1 dez. 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS: global summary of the HIV/AIDS epidemic**, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.png>. Acesso em: 6 out. 2011.
- WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n. 11, p. 1656-1660, Nov. 2005.
- YU, D.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K-H. New developments in natural products-based anti-AIDS research. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 27, n. 1, p. 108-132, Jan. 2007.
- ZHANG, Z-Y.; POORMAN, R. A.; MAGGIORA, L. L.; HEINRIKSON, R. L.; KÉZDY, F. J. Dissociative inhibition of dimeric enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 24, p. 15591-15594, Aug. 1991.