

BRUNA FONSECA MAZZEU

“Estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos  
em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Química, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção de título  
de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

**Araraquara**  
**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Mazzeu, Bruna Fonseca

M477e      Estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos  
em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae) / Bruna Fonseca

Mazzeu. – Araraquara : [s.n], 2014

142 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Maysa Furlan

1. Química orgânica. 2. Biossíntese. 3. Produtos naturais. 4. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

BRUNA FONSECA MAZZEU

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

Araraquara, 30 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MAYSA FURLAN (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Dr. NIVALDO BORALLE  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. MARCOS PIVATTO  
Instituto de Química / UFU / Uberlândia

# INFORMAÇÕES CURRICULARES

## 1. Dados Pessoais

Nome: Bruna Fonseca Mazzeu  
Filiação: Benedito Antonio Mazzeu e Roseli Aparecida Fonseca  
Nascimento: 08/08/1987 - Araraquara/SP - Brasil  
Estado Civil: Solteira  
Endereço residencial: Avenida Laudomiro Scotton, 52  
Jardim Califórnia - Araraquara  
14801-024, SP - Brasil  
Telefone: (16) 3332-1883  
Endereço profissional Instituto de Química de Araraquara – UNESP  
Departamento de Química Orgânica  
Rua Prof. Francisco Degni, 55  
Quitandinha - Araraquara  
14800-970, SP - Brasil  
Telefone: (16) 3301-9510  
e-mail: bruna.mazzeu@gmail.com

## 2. Formação Profissional

### 2.1. Graduação

Curso: Licenciatura em Química  
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Período: março de 2007 a dezembro de 2011.

### 2.2. Iniciação Científica

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Modalidade: Produtos Naturais  
Projeto: “Estudo químico e biológico de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”  
Orientadora: Maysa Furlan  
Período: janeiro de 2010 a dezembro de 2011

### 2.3. Pós-Graduação

#### 2.3.1. Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica  
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Modalidade: Produtos Naturais  
Projeto: “Estudo de aspectos estruturais e biossintéticos em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”.  
Orientadora: Maysa Furlan  
Período: março de 2012 a maio de 2014

### **3. Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais**

MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; SILVA, F. C.; GULLO, F.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M.

Rare antifungal compounds isolated from *Piper fuliginum* (PIPERACEAE).

**4th Brazilian Conference On Natural Products (BCNP) and the XXX Annual Meeting On Micromolecular Evolution, Systematics And Ecology (RESEM), 2013.** Natal - RN

MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M.

Estudo Químico e Biológico de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae).

**34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.** Florianópolis-SC

MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PASSERINI, G.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M.

Prospecção química e biológica de *Piper fuliginum* Kunth (PIPERACEAE).

**XXII - Congresso de Iniciação Científica – UNESP, 2010.** Araraquara.

### **4. Trabalhos submetidos à publicação**

JARDIM, A.; SANTOS, V. A.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; IGLOI, Z; AMAKO, Y; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. **Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro.** Journal: Antiviral Research, 2014.

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho ao meu pai, Mazzeu, por acreditar em mim, pelo seu incentivo, seu cuidado e sua dedicação. Sua presença significou segurança e a certeza de que eu não estou sozinha.*

*Ao meu noivo Ederson pelo amor e dedicação, por ser meu companheiro em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS por estar sempre me guiando.

À minha orientadora Profa. Maysa Furlan, com quem aprendi muito, contribuindo com meu crescimento intelectual e pessoal; agradeço a orientação, o incentivo e principalmente a confiança.

À minha querida amiga e incentivadora Lidiane, por vibrar e chorar comigo a cada resultado deste trabalho, pela dedicação, ajuda e amizade.

Ao meu pai, Mazzeu, por me ensinar a nunca desistir, pelo apoio nas horas difíceis, por sempre acreditar em mim e principalmente pelo amor.

Ao meu noivo Ederson por estar sempre ao meu lado, me apoiando e pela paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão, Murilo, e ao meu afilhado Mateus por me ensinarem a alegria de uma nova vida.

À toda minha família e amigos, meu porto seguro.

Ao Instituto de Química, por me possibilitar todas as realizações durante esta jornada, desde a graduação.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e a Dr<sup>a</sup> Lucinéia Vizzotto, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, pelas conversas e discussões, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às grandes amigas Karina, Vania, Gislaíne e Rute, pelas discussões, risadas, companheirismo e acima de tudo, pela amizade.

Ao Dr. Fernando Cotinguiba por me iniciar no mundo acadêmico.

Ao Me Cláudio Nogueira pela ajuda com as determinações estruturais.

Aos amigos e professores do Departamento de Química Orgânica, principalmente aos do NuBBE, pela amizade, pelo convívio e pela ajuda sempre na hora certa.

Ao João e à Juliana por estarem sempre prontos a ajudar no que for necessário.

À Marília e à Bianca (NDCOM) pela obtenção dos espectros de massas, pelas discussões e pela grande ajuda sempre que precisei.

Aos meus amigos do grupo de Biossíntese de Produtos Naturais: Amauri, Andrea, Renan, Tiago e Tatiana, pelas discussões, pelas conversas e principalmente, pela amizade.

Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Química Orgânica, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários e funcionárias da Seção de Pós-Graduação e pela atenção e dedicação

Às funcionárias da biblioteca, pela ajuda sempre tão importante.

Ao grupo da Profa Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli pela realização dos testes para determinação da atividade tripanocida, no Laboratório de Imunologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, em Araraquara, e principalmente à pós-graduanda Gabriela Duó Passerini, por terem realizados os experimentos.

Ao grupo da Profa Profa Dra Maria José Soares Mendes Gianinni, do Laboratório de Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, pela avaliação da atividade antifúngica.

Ao grupo da Profa Dra Paula Rahal, principalmente à pós-graduanda Ana Carolina Gomes Jardim, do Departamento de Biologia - Instituto de Biociencia, Linguagem e Ciências Exatas (IBILCE) – UNESP- São José do Rio Preto – SP, pela avaliação da atividade antiviral

À FAPESP, pela bolsa concedida.



Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar...

Apesar de todas as consequências.

*Osho*

## RESUMO

O perfil químico de folhas e frutos de *Piper fuliginum* foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. A composição química de média polaridade dos dois órgãos vegetais apresentou semelhança. As análises demonstraram também que os frutos apresentavam composição química complexa, principalmente devido a presença de substâncias de maior polaridade. Essas análises permitiram selecionar as folhas de *P. fuliginum* para dar continuidade aos estudos químicos. Estes estudos resultaram no isolamento de cinco substâncias, sendo duas kavalactonas: (*E*)-6-(8-feniletíl)-4-metoxi-2H-piran-2-ona e 6-(2-fenil-7,8-diidroxitil)-4-metoxi-2H-piran-2-ona; uma cromanona: (2,2-dimetil-4-oxocromano-6-carboxilato de metila) e dois derivados prenilados do ácido benzoico: 4-hidroxi-3-(3-metilbutil-2-en-1-il)benzoato de metila e 4-metoxi-3-(3-metil-1-oxobut-2-en-1-il) benzoato de metila. As estruturas químicas das substâncias foram determinadas utilizando técnicas espectrométricas, incluindo RMN 1D e 2D. Todas as substâncias estão sendo descritas pela primeira vez em *Piper fuliginum*. A substância **4** é inédita como produto natural. O extrato etanólico das folhas e as frações obtidas de *P. fuliginum* foram avaliadas quanto ao potencial tripanocida frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mostrando promissora atividade do extrato etanólico com IC<sub>50</sub> de 26,67 µg.mL<sup>-1</sup> quando comparado com o controle positivo, benznidazol, com IC<sub>50</sub> de 11,11 µg.mL<sup>-1</sup>. O extrato acetato de etila, a fração clorofórmica e a substância **1** foram submetidos a testes antifúngicos frente aos fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e a levedura *Cryptococcus neoformans*. O extrato apresentou forte atividade frente ao fungo *Candida tropicalis* e moderada atividade frente aos fungos *C. krusei*, *C. parapsilosis* e a levedura *Cryptococcus neoformans*, enquanto a fração clorofórmica apresentou forte atividade frente ao fungo *C. krusei*, e moderada atividade frente aos fungos *C. albicans*, *C. parapsilosis* e a levedura *C. neoformans*. A substância **1** foi submetida a avaliação da atividade antiviral contra o vírus da hepatite C, mostrando moderada atividade quando comparada à atividade do controle positivo ciclosporina A. A biogênese da classe das kavalactonas foi proposta como sendo derivada de uma biossíntese mista originada do acoplamento entre uma unidade C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> da via fenilpropanoídica com uma unidade de acetatoacetil-CoA da via do acetato, que após sucessivas oxidações e ciclizações enzimáticas levam a sequência de substâncias isoladas. A participação da via fenilpropanoídica na rota biossintética das kavalactonas, foi analisada por experimentos de incorporação da fenilalanina em extratos enzimáticos das folhas de *P. fuliginum* com o objetivo de determinar a atividade da enzima fenilalanina amônia liase. A análise por CLAE revelou a produção do ácido *trans*-cinâmico e foi mais

expressiva na fração 55-85% de saturação quando realizada precipitação salina com sulfato de amônio. Os extratos etanólicos das folhas analisados em diferentes períodos indicaram que a biossíntese dos metabólitos secundários presentes na espécie apresentam variação sazonal o que, poderia favorecer a rota dos fenilpropanóides ou do ácido *p*-hidroxibenzoico.

## ABSTRACT

The chemical profile of leaves and fruits of *Piper fuliginum* was analyzed by high performance liquid chromatography. The chemical composition of medium polarity related to leaves and fruits showed great similarity. The analysis also showed that the chemical composition of the fruits was more complex, mainly due to the presence of more polar substances. These analyzes allowed the selection of the leaves of *P. fuliginum* to continue the chemical studies. The chemical studies of the leaves of *Piper fuliginum* resulted in the isolation of six compounds, including two kavalactones (4-methoxy-6-[(E)-2-phenyl-vinyl]-2H-pyran-2-one and 6-(1,2-dihydroxy-2-phenyl-ethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one), one chromanone (methyl-2,2-dimethyl-4-oxo-6-cromanacarboxylate) and two prenylated derivatives of benzoic acid (methyl-4-hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl) benzoate and methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butenoyl) benzoate). The chemical structures of the isolated compounds were determined using spectrometric techniques, including 1D and 2D NMR. All compounds were described for the first time in *Piper fuliginum*, and the compound **4** is a new natural product. The ethanolic leaf extract and fractions obtained from *P. fuliginum* were evaluated for trypanocidal potential against epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* Y strain, showing promising activity of the ethanol extract with  $IC_{50}$  of  $26.67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  compared with the positive control benznidazole, with  $IC_{50}$  of  $11.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The ethyl acetate extract, the chloroform fraction and substance **1** underwent antifungal drugs against fungi *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* yeast. The extract showed strong activity against the fungus *Candida tropicalis* and moderate activity against fungi *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* yeast while the chloroform fraction showed strong activity against the fungus *C. krusei*, and moderate activity against fungi *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. neoformans* yeast. The compound **1** was subjected to evaluation of antiviral activity against hepatitis C virus, showing moderate activity compared to the positive control cyclosporin A. The proposed biosynthetic pathway of the kavalactones was proposed as being derived from phenylpropanoid and acetate pathways. Further, successive oxidation and enzymatic cyclization leads to the kavalactones. The phenylpropanoid pathway was evaluated by incorporation of phenylalanine in cell free extracts from leaves of *P. fuliginum* with the objective of determining the phenylalanine ammonia lyase activity. HPLC analysis revealed the production of *trans*-cinnamic acid. The most pronounced activity was observed on fraction 55-85 % of saturation when performed salt precipitation using ammonium sulfate. The ethanol leaves extracts analyzed at different periods of the year indicated that the biosynthesis of secondary metabolites present in such species shows seasonal variation which could support the route of phenylpropanoid or p-hydroxybenzoic acid.

## Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de produtos naturais no século XIX.....	25
Figura 2: Estrutura química da fidaxomicina.....	26
Figura 3: Estrutura química de compostos isolados de fontes vegetais usados no tratamento do câncer e de doenças degenerativas.....	27
Figura 4: A – <i>Piper</i> . B – <i>Peperomia</i> . C- <i>Manekia</i> . D – <i>Zippelia</i> . E – <i>Verhuellia</i> .....	30
Figura 5: Regiões onde são encontradas espécies do gênero <i>Piper</i> .....	32
Figura 6: <i>Piper fuliginum</i> .....	36
Figura 7: Estrutura química base das kavalactona.....	37
Figura 8: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Piper fuliginum</i> ...48	
Figura 9: Cromatogramas obtidos via CLAE dos extratos etanólicos de frutos e folhas de <i>P. fuliginum</i> . (Condições de análise: 30% MeOH → 100% MeOH em 50, fluxo de 1 mL.min <sup>-1</sup> , coluna C-18 Phenomenex).....	56
Figura 10: Estrutura química da substância <b>1</b> .....	57
Figura 11: Estrutura química da substância <b>2</b> .....	59
Figura 12: Estrutura química da substância <b>1a</b> .....	62
Figura 13: A- Espectros de massas substancia 1a (modo positivo); B- Espectros de massas do experimento de íon fragmentos de <i>m/z</i> 245.....	62
Figura 14: Proposta de fragmentação para <b>1a</b> .....	63
Figura 15: Estrutura química da substância <b>3</b> .....	64
Figura 16: Estrutura química da substância <b>4</b> .....	66
Figura 17: Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC da substância <b>4</b> .....	67
Figura 18: Estrutura química da substância <b>5</b> .....	68
Figura 19: Cromatograma do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Piper fuliginum</i> coletadas em 2006. B – Ampliação com identificação das	

substâncias isoladas (1-5). (Condições de análise: 50% MeOH → 100% MeOH em 30 min e mais 10 min em 100% de MeOH, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>).....72

Figura 20: A – Cromatograma obtido do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2006, comparado com o mesmo extrato obtido em 2014. B – Cromatograma do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2006, comparado com as substâncias 1 e 4. C – Cromatograma do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2014, comparado com as substâncias 1 e 4. (Condições de análise: 50% MeOH → 100% MeOH em 30 min., fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna C-18 Phenomenex).....74

Figura 21: Proposta biossintéticas das substâncias identificadas em *P. fuliginum* Kunth.....77

Figura 22: Proposta biossintéticas das kavalactonas identificadas em *P. fuliginum* Kunth.....78

Figura 23: Curva analítica da ovoalbumina bovina (fração V).....81

Figura 24: A – Cromatograma obtido após a incubação da fração 55-85% em 24 horas. B- Cromatograma do branco da enzima. C – Cromatograma do padrão fenilalanina nas mesmas condições experimentais. D - Cromatograma do padrão ácido cinâmico nas mesmas condições experimentais. (Condições de análise: MeOH:H<sub>2</sub>O (+ 0,1% de HAc) / 60:40 em 30 min., fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna supelcosil LC-18).....82

Figura 25: Proposta biossintéticas da cromanona e dos derivados prenilados do ácido benzoico isolados de *P. fuliginum* Kunth.....85

## Lista de tabela

Tabela 1: Metabólitos secundários que ocorrem em diferentes espécies de <i>Piper</i> .....	34
Tabela 2: Estruturas químicas e atividade biológica das seis principais kavalactonas.....	38
Tabela 3: Quantidade obtida das frações das folhas de <i>P. fuliginum</i> .....	46
Tabela 4: Precipitação com sulfato de amônio – concentração de sal a ser adicionado a 0°C.....	53
Tabela 5: Dados de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias <b>1-2</b> .....	60
Tabela 6: Dados de RMN de <sup>13</sup> C das substâncias <b>1-2</b> .....	61
Tabela 7: Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias <b>3-4</b> .....	69
Tabela 8: Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>5</b> .....	70
Tabela 9: Dados de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias <b>3-4</b> .....	70
Tabela 10: Dados de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>5</b> .....	71
Tabela 11: Tempo de retenção das substâncias isoladas de <i>P. fuliginum</i> .....	73
Tabela 12: Resultado do ensaio antifúngico frente a diferentes patógenos humano.....	75
Tabela 13: Atividade tripanocida do extrato etanólico das folhas e frações de <i>Piper fuliginum</i> frente à forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	76
Tabela 14: Diferentes concentrações de proteína do extrato bruto e das frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	81

## Lista de fluxograma

Fluxograma 1: Obtenção do extrato bruto e frações a partir dos folhas triturados e partição liquido-liquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila.....	45
Fluxograma 2: Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica.....	47
Fluxograma 3: Obtenção do extrato enzimático das folhas de <i>Piper fuligineum</i> .....	52
Fluxograma 4: Procedimento geral para o ensaio enzimático.....	54



## Lista de espectro

Espectro 1: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>1</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	97
Espectro 2: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>1</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) – Ampliação.....	98
Espectro 3: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>1</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	99
Espectro 4: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>1</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) – Ampliação.....	100
Espectro 5: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>1</b> .....	101
Espectro 6: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>1</b> – Ampliação.....	102
Espectro 7: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>1</b> .....	103
Espectro 8: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>1</b> - Ampliação.....	104
Espectro 9: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>1</b> - Ampliação.....	105
Espectro 10: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2</b> (500MHz, $\text{DMSO d}_6$ ).106	
Espectro 11: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2</b> (500MHz, $\text{DMSO d}_6$ ) - Ampliação.....	107
Espectro 12: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>2</b> (125MHz, $\text{DMSO d}_6$ ).....	108
Espectro 13: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>2</b> (125MHz, $\text{DMSO d}_6$ ) – Ampliação.....	109
Espectro 14: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>2</b> .....	110
Espectro 15: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>2</b> .....	111
Espectro 16: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>2</b> - Ampliação.....	112
Espectro 17: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>2</b> - Ampliação.....	113
Espectro 18: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>3</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	114
Espectro 19: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>3</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) – Ampliação.....	115
Espectro 20: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>3</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	116

Espectro 21: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>3</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.....	117
Espectro 22: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>3</b> .....	118
Espectro 23: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>3</b> .....	119
Espectro 24: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>3</b> - Ampliação.....	120
Espectro 25: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>3</b> - Ampliação.....	121
Espectro 26: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>3</b> - Ampliação.....	122
Espectro 27: Mapa de contorno COSY da substância <b>3</b> .....	123
Espectro 28: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>4</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	124
Espectro 29: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>4</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.....	125
Espectro 30: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>4</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	126
Espectro 31: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>4</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.....	127
Espectro 32: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>4</b> .....	128
Espectro 33: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>4</b> .....	129
Espectro 34: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>4</b> - Ampliação.....	130
Espectro 35: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>4</b> - Ampliação.....	131
Espectro 36: Mapa de contorno COSY da substância <b>4</b> .....	132
Espectro 37: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>5</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	133
Espectro 38: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>5</b> (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.....	134
Espectro 39: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>5</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	135
Espectro 40: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>5</b> (125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.....	136
Espectro 41: Mapa de contorno gHSQC da substância <b>5</b> .....	137
Espectro 42: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>5</b> .....	138
Espectro 43: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>5</b> - Ampliação.....	139

Espectro 44: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>5</b> - Ampliação.....	140
Espectro 45: Mapa de contorno gHMBC da substância <b>5</b> - Ampliação.....	141
Espectro 46: Mapa de contorno COSY da substância <b>5</b> .....	142

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	-	acetato de etila
CC	-	cromatografia em coluna
CCDC	-	cromatografia em camada delgada comparativa
CIM	-	concentração inibitoria minima
Cl <sub>50</sub>	-	concentração inibitória 50%
CLAE	-	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	-	<i>correlation spectroscopy</i>
δ	-	deslocamento químico
d	-	duplete
DAD	-	detector de arranjo de diodos
dd	-	duplo duplete
DMAPP	-	difosfato de dimetilalilo
DMSO	-	dimetil sulfóxido
DO	-	desnsidade optica
DTT	-	1,4-ditiotreitól
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
EFS	-	extração em fase sólida
EtOH	-	etanol
FAc	-	fração acetato de etila
Fcl	-	fração clorofórmica
FH	-	fração hidroalcóolica
gHMBC	-	<i>gradient heteronuclear multiple bond correlation</i>
gHMQC	-	<i>gradient heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HAc	-	acido acético
Hex	-	hexano
IPP	-	difosfato de isopentenila

<i>J</i>	-	constante de acoplamento
LIT	-	Liver infusion triptose
m	-	múltiplo
MeOH	-	metanol
<i>m/z</i>	-	relação massa-carga
p.	-	página
PAL	-	fenilalanina amônia liase
PMS	-	metossulfato de fenazina
PVPP	-	polivinilpolipirrolidona
RMN	-	ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>1</sup> H	-	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	-	ressonância magnética nuclear de carbono treze
rpm	-	rotações por minuto
s	-	simpleto
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
TMS	-	tetrametilsilano
TNF	-	fator de necrose tumoral
UV	-	ultravioleta
Vis	-	espectroscopia no visível

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	23
1.1. A importância dos produtos naturais .....	23
1.2. A família Piperaceae .....	28
1.3. O gênero <i>Piper</i> .....	30
1.4. A espécie <i>Piper fuliginum</i> .....	35
1.5 Kavalactonas .....	36
2. OBJETIVOS .....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 – Material vegetal.....	40
3.2 – Solventes .....	40
3.3 – Cromatografia .....	40
3.3.1 – Cromatografia em camada delgada .....	40
3.3.2 – Cromatografia em coluna (CC) .....	41
3.3.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	41
3.4. Equipamentos .....	42
3.5 – Técnicas Espectrométricas .....	42
3.5.1- Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	42
3.5.2- Espectrometria de massas .....	42
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	44
4.1. Estudo fitoquímico de <i>Piper fuliginum</i> .....	44
4.1.1. Perfil cromatográfico .....	44
4.1.1.1. Obtenção dos extratos .....	44
4.1.1.2. Obtenção das frações .....	44
4.1.2. Purificação de substâncias .....	46
4.2. Atividades biológicas.....	49

4.2.1. Avaliação da atividade antifungica .....	49
4.2.2. Avaliação da atividade tripanocida .....	50
4.2.3. Avaliação da atividade antiviral .....	51
4.3. Estudos biossintéticos de <i>Piper fuligineum</i> .....	52
4.3.1. Estudo da fenilalanina amônia liase (PAL) em <i>Piper fuligineum</i> .....	52
4.3.1.1. Extração enzimática .....	52
4.3.1.2. Precipitação fracionada.....	52
4.3.1.3. Determinação da concentração proteica.....	53
4.3.1.4. Ensaio enzimático .....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1. Estudo fitoquímico de <i>Piper fuligineum</i> .....	55
5.1.1. Perfil cromatográfico .....	55
5.1.2. Determinação e Identificações estruturais .....	56
5.1.2.1. Kavalactonas .....	56
5.1.2.2. Derivados do ácido benzóico .....	64
5.2. Análise do perfil cromatográfico do extrato EtOH das folhas de <i>Piper fuligineum</i> . 72	
5.3. Atividades biológicas.....	75
5.3.1. Avaliação da atividade antifúngica .....	75
5.3.2. Avaliação da atividade tripanocida .....	75
5.3.3. Avaliação da atividade antiviral .....	76
5.4. Estudos biossintéticos de <i>Piper fuligineum</i> .....	76
5.4.1. Ensaio enzimáticos .....	78
CONCLUSÕES.....	85

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A importância dos produtos naturais

A presença de substâncias em uma espécie vegetal está relacionada com o metabolismo primário, entretanto diversas espécies desenvolveram um metabolismo espécie-específico, chamado de metabolismo secundário, que pode oferecer defesa contra predadores, atrair ou advertir outras espécies, desempenhando um papel vital para o bem-estar da planta. As propriedades farmacológicas dos produtos naturais são atribuídas à diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários (DEWICK, 2002).

O estudo dos produtos naturais tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, correntemente utilizados na medicina moderna (NEWMAN E CRAGG, 2012).

São várias as utilidades dos produtos naturais, principalmente os oriundos das plantas, quer sejam como suplementos na alimentação, intermediários usados nas indústrias ou medicamentos (MOTANARI E BOLZANI, 2001), ou no uso *in natura* das plantas medicinais como o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL, et al., 2002).

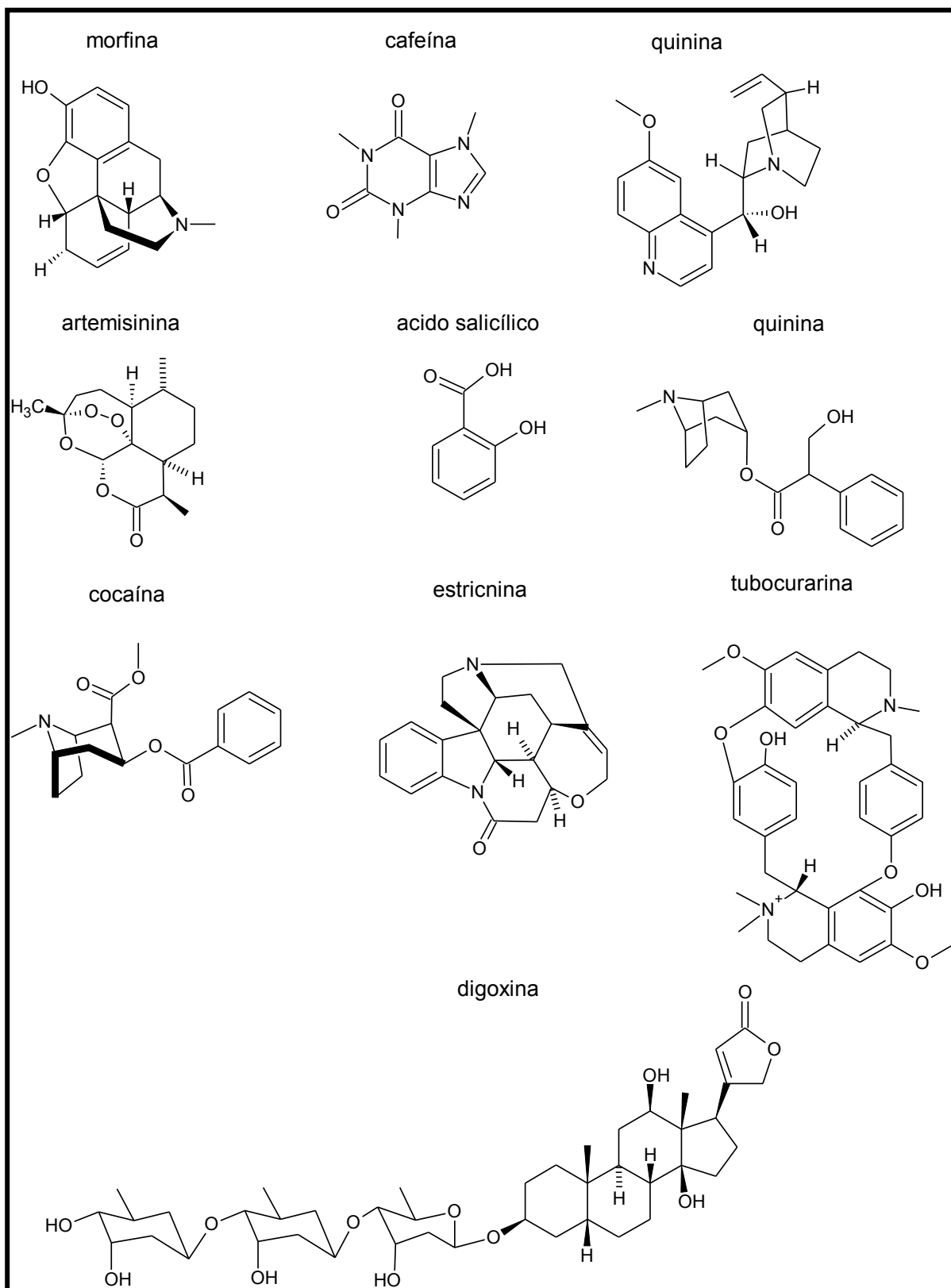
A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Ainda hoje plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL, et al., 2002).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers pertencente à época da XVIII dinastia. Enumera aproximadamente 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO, 2002). As investigações sobre vegetais com base científica iniciaram-se a partir do século XIX, considerado o período inicial do estudo fitoquímico de plantas medicinais. O isolamento da morfina, pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, a partir de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) foi o primeiro na investigação de substâncias ativas presentes em plantas e possibilitou a descoberta de diversas outras moléculas com potencial farmacológico, entre elas a estricnina isolada de *Strychnos* spp. (Loganiaceae), a quinina de *Chinchona* spp. (Rubiaceae), a



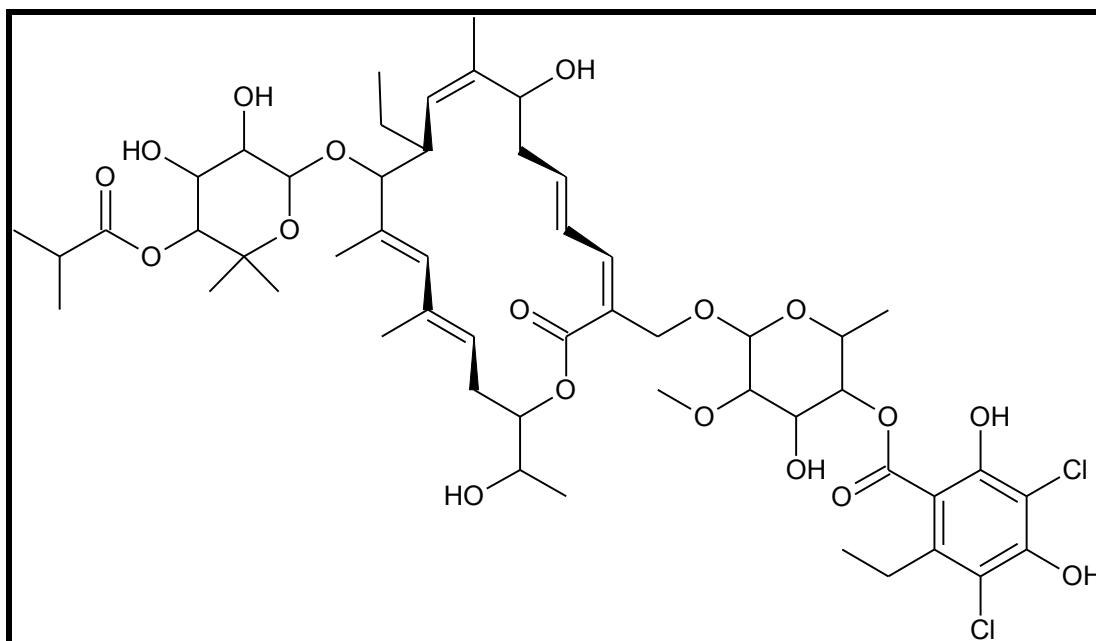
artemisinina de *Artemisia annua* (Asteraceae), a cafeína de *Coffea arabica* (Rubiaceae), a atropina de *Atropa belladonna* (Solanaceae), a cocaína de *Erythroxylon coca* (Erythroxylaceae), o ácido salicílico de *Salix alba* (Salicaceae), a digoxina de *Digitalis lanata* (Plantaginaceae), a tubocurarina de *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae) (HEINRICH, 2010) (Figura 1, p. 25), entre tantas outras substâncias que são utilizadas como medicamento até os dias atuais (MONTANARI E BOLZANI, 2001; NEWMAN E CRAGG, 2012).

**Figura 1:** Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de produtos naturais no século XIX.



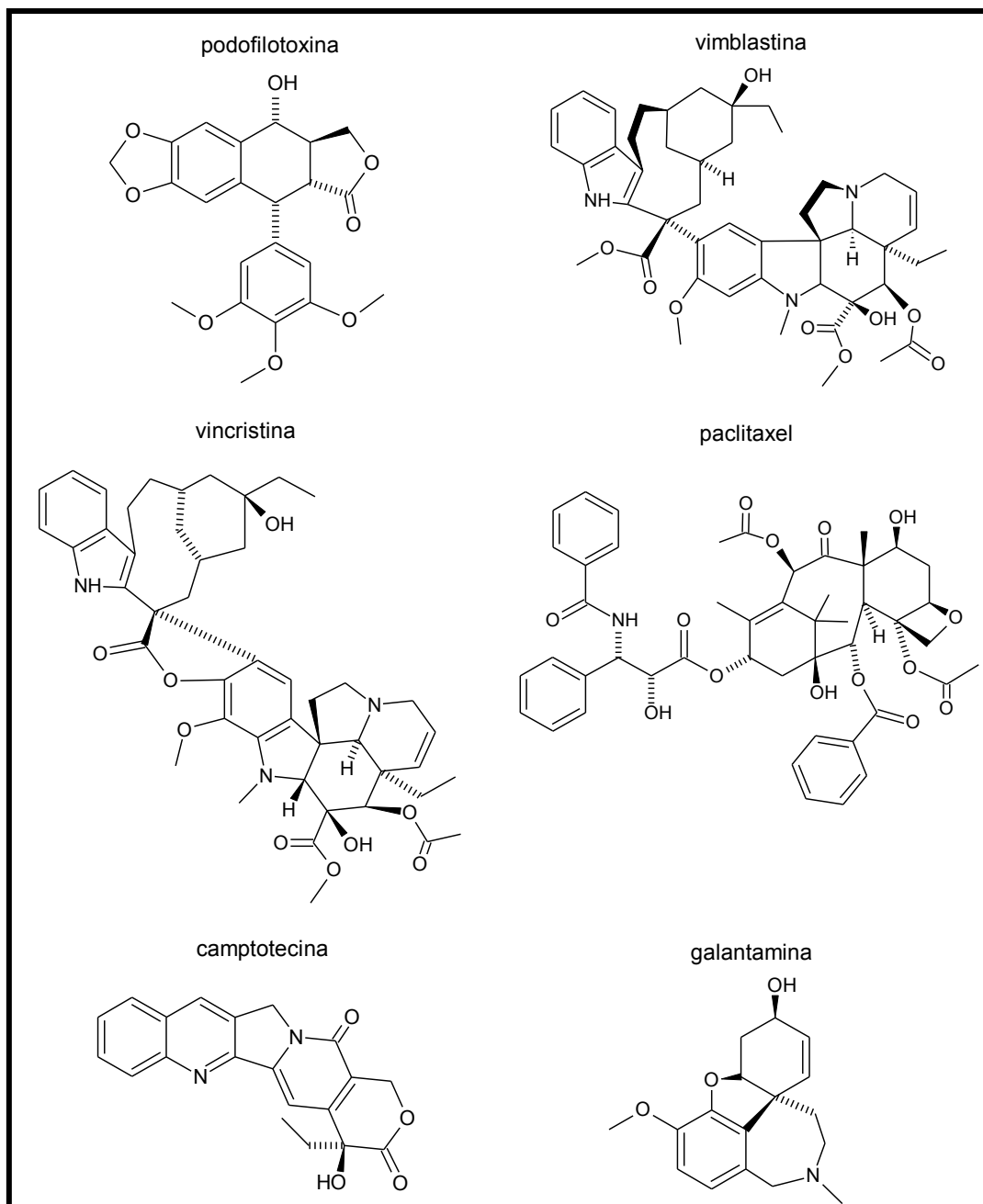
A era moderna da descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais começou em 1940 com a penicilina G, o primeiro antibacteriano beta-lactâmico, e continua até hoje, com a aprovação da fidaxomicina (Figura 2, p. 26) em 2011, um antibiótico macrolídeo usado no tratamento de infecções bacterianas (KOEHN, 2012).

**Figura 2:** Estrutura química da fidaxomicina.



Na última década, compostos isolados de fontes vegetais têm desempenhado um importante papel no tratamento do câncer e de doenças degenerativas, como o mal de Alzheimer. Entre os compostos anticâncer destaca-se a podofilotoxina (Wartec<sup>®</sup>) primeiramente isolada de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), os alcalóides da vinca, vinblastina (Faublastina<sup>®</sup>) e vincristina (Oncovin<sup>®</sup>), isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), o paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) e a camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). Entre os compostos utilizados no tratamento do mal de Alzheimer destaca-se a galantamina (Reminyl<sup>®</sup>), isolada originalmente de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) (HEINRICH, 2010) (Figura 3, p. 27).

**Figura 3:** Estrutura química de compostos isolados de fontes vegetais usados no tratamento do câncer e de doenças degenerativas



Apesar da importância dos produtos naturais, a espécie humana se aproveita de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecedem no planeta. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a ser desvendados. Há uma estimativa que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores no planeta, mas

que apenas 6% foram investigadas quanto ao seu potencial farmacológico e 15% do ponto de vista químico (CRAGG E NEWMAN, 2012).

Comercialmente, algumas das mais importantes utilizações das descobertas e desenvolvimentos em produtos naturais estão na área farmacêutica, agroquímica, cosmética e nutricional (MCCHESENEY et al., 2007).

Aproximadamente 47% dos fármacos lançadas são derivadas de produtos naturais. Em 2007, o mercado de medicamentos a base de produtos naturais teve um lucro em vendas superiores a US \$ 35 bilhões (KOEHN, 2012).

Os requisitos para desenvolvimento e comercialização na área farmacêutica são geralmente bem conhecidos. O tempo para o desenvolvimento de um medicamento pode variar de alguns anos a até mais de duas décadas. A estrutura química do paclitaxel (Figura 3, p.27) foi reportada e identificada pela primeira vez como constituinte principal da atividade citotóxica do extrato de *Taxus brevifolia* em 1971 (WANI et al., 1971), mas o Taxol<sup>®</sup> foi aprovado como um agente quimioterapêutico para o câncer somente no final de 1992, 20 anos depois. Em média, novos compostos farmacêuticos levam em torno de uma década para serem desenvolvidos e comercializados (MCCHESENEY et al., 2007).

Considerando este elevado tempo para o desenvolvimento de fármacos a partir de fontes naturais, as preparações caseiras a partir de produtos naturais são, ainda hoje, fonte de mais de 90% das classes terapêuticas e o mais interessante é que, por volta de dois terços ou mais da população mundial ainda utilizam plantas medicinais como primeiros cuidados farmacêuticos (MCCHESENEY et al., 2007, NEWMAN E GRAGG, 2012).

Esses fatos indicam que a medicina tradicional ainda é bastante promissora, e que a humanidade pode aprender a utilizar o que a natureza oferece de forma mais adequada, buscando novas alternativas para o tratamento de doenças.

## **1.2. A família Piperaceae**

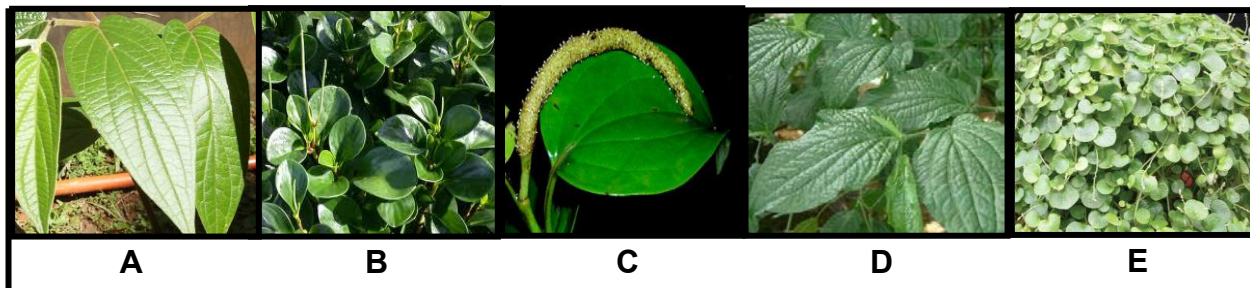
A família Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, sendo uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas (WANKE et al., 2007) e por possuir metabolismo secundário peculiar e diversificado em termos de classes estruturais, conduz à formação de diversos metabólitos com interesse biológico.

As espécies da família Piperaceae têm sido usadas extensivamente para efeitos medicinais (CAMPOS et al., 2005), pois apresentam atividade antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antiviral, antioxidante e leishmanicida. Estas propriedades biológicas foram atribuídas à presença de lignanas e/ou flavonoides, kawa-lactonas, butenolidos e epóxidos cicloexano (JOHANN et al., 2009). Recentemente, foi publicada a avaliação das atividades esquistossomicida e moluscicidas de espécies de Piperaceae mostrando resultados promissores para estudos de prevenção e controle da esquistossomose (RAPADO et al., 2013). Além disso, espécies desta família tem sido utilizadas na medicina tradicional para diversos fins, entre eles: cicatrizante (VILLEGAS et al., 2001), anti-inflamatório, analgésico (ARRIGONI-BLANK et al., 2004; SILVA et al., 2008), antiasmático, antimalárico (CÉLINE et al., 2009; PERAZZO et al., 2005), expectorante, hipoglicemiante (RUKACHAISIRIKUL et al., 2004), anticolérico, antiulceroso, antidispéptico (RHO et al., 2007) e antiepiléptico (AWAD et al., 2009).

As espécies representantes desta família são plantas herbáceas, arbustivas ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas, usualmente com mais de três metros de altura. O caule é nodoso, as folhas são inteiras, dorsiventrais, alternas, pecioladas, com ou sem estípulas (GOGOSZ et al., 2012). São encontradas em regiões tropicais e subtropicais (JUDD et al., 2009) dos dois hemisférios (KATO E FURLAN, 2007) e apresentam cerca de 3700 espécies distribuídas pelo mundo (JARAMILLO et al., 2004; WANKE et al., 2006).

Esta família foi descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1753 e, atualmente compreende cinco gêneros representados por *Piper* L., *Peperomia* Ruiz e Pavon, *Manekia* Trel. (classificada anteriormente como *Sarcorhachis*), *Zippelia* Blume (WANKE, et al., 2007) e *Verhuellia*, um pequeno gênero descrito recentemente (SAMAIN, et al., 2010) (Figura 4, p. 30).

**Figura 4:** A – *Piper*. B – *Peperomia*. C- *Manekia*. D – *Zippelia*. E – *Verhuellia*



**Fonte:** A- Bruna Mazzeu. B-([http://artgarden.bg/wpcontent/uploads/2012/03/Peperomia\\_26291.jpg](http://artgarden.bg/wpcontent/uploads/2012/03/Peperomia_26291.jpg)). C- [http://www.bio.utk.edu/williams/images/manekia%20flwr\\_DSCN0502.jpg](http://www.bio.utk.edu/williams/images/manekia%20flwr_DSCN0502.jpg)). D- [http://www.cvh.org.cn/cvh\\_picture/eco/b/768030.jpg](http://www.cvh.org.cn/cvh_picture/eco/b/768030.jpg)). E <http://aob.oxfordjournals.org/content/early/2010/03/17/aob.mcq031/F1.large.jpg>) – acessado em 25/02/2014).

Os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* são encontrados no Brasil, principalmente nas florestas Amazônica e Atlântica (NASCIMENTO et al., 2012). *Piper* e *Peperomia* são considerados os gêneros mais representativos da família, com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente (WANKE et al., 2007).

### 1.3. O gênero *Piper*

O gênero *Piper* apresenta o maior potencial econômico e comercial. A espécie mais conhecida comercialmente é a *Piper nigrum*, cujos frutos são fonte natural da pimenta-do-reino, utilizada como especiaria na culinária mundial (SRINIVASAN, 2007). *Piper auritum* e *Piper lolot* também são usadas como especiarias no México e Vietnã, respectivamente (DYER, 2004).

Espécies do gênero *Piper* têm uma notável importância em fitoquímica, etnobotânica e atividade biológica (PARRA et al., 2011). Muitas desempenham um importante papel na medicina popular e na produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e inseticida (SILVA E MACHADO, 1999). Entre as espécies com potencial etnofarmacológico, destaca-se a *Piper tuberculatum*, que é utilizada na medicina popular como analgésico, sedativo, antídoto para picadas de cobra, tratamento de distúrbios digestivos e até mesmo como tempero para alimentos (BURCI et al., 2013) e a *Piper methysticum* Forst

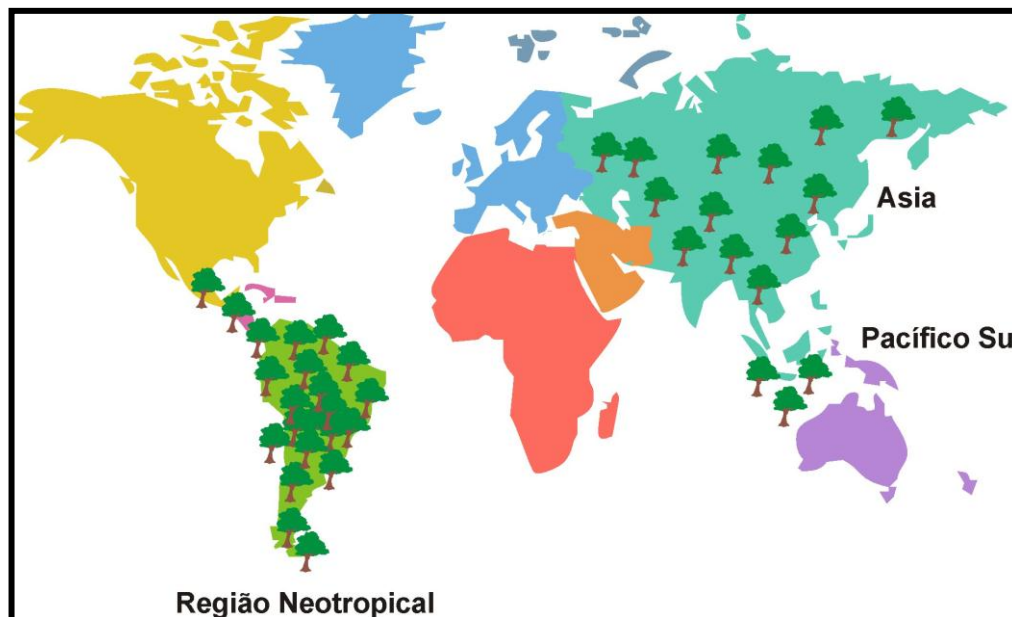
(kava-kava), que tem propriedades sedativas e anti-estresse e foi amplamente utilizada no tratamento dos distúrbios do sistema nervoso central, como a depressão e a insônia (SIMÕES, 1999), entretanto, as preocupações com hepatotoxicidade levaram a sua retirada do mercado em muitos países (SINGH, 2005).

Atualmente, o estudo envolvendo espécies deste gênero se intensificou (PARMAR et al., 1997; DYER E PALMER, 2004; KATO E FURLAN, 2007; RAMOS E KATO, 2012) devido às inúmeras substâncias de origem natural que estão sendo isoladas, entre elas podemos citar: alcalóides/amidas, cromenos, lignanas, neolignanas, terpenos e polifenóis (BALDOQUI et al., 1999; BALDOQUI et al., 2009; REGASINI et. al., 2009b; MORANDIM et. al., 2010; DIAZ et al., 2012; CHEN et al., 2013; BAO et al., 2014). Muitos destes compostos apresentam importantes atividades biológicas, como por exemplo, antifúngica, anti-inflamatória, antiparasitária, antioxidante, anticoagulante e tripanocida (SILVA et al., 2002; MARTINS et al., 2003; LAGO et al., 2004; LUIZE et. al., 2006; BATISTA JUNIOR et al., 2008; LOPES et al., 2008; FLORES et al., 2008; REGASINI et al., 2009a; BATISTA JUNIOR et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2012; WONHWA et al., 2013).

O gênero *Piper* é um dos mais diversificados entre as linhagens basais das angiospermas, a grande maioria das espécies são arbustos, porém podem também ser encontradas como trepadeiras e árvores de pequeno porte, sendo que a maioria cresce em florestas quente e úmida (DYER, 2004). Cerca de 1300 espécies das 2000 descritas estão na região neotropical, seguido por 600, encontradas na Ásia e 100 no Pacífico Sul (ISNARD, et al., 2012) (Figura 5, p.32).



**Figura 5:** Regiões onde são encontradas espécies do gênero *Piper*.



**Fonte:** Bruna F. Mazzeu.

Diversas espécies de *Piper* vêm sendo usadas em todo o mundo por apresentarem propriedades medicinais. Na China, o uso de chás, preparados com as folhas de *P. futokasura* é recomendado para o tratamento de arritmias cardíacas e asma. Na Jamaica, folhas de *P. aduncum* e *P. hispidum* são usadas para o tratamento de dores de estômago. No Brasil e no México, *P. amalago* também é usada para dores de estômago. As raízes de *P. sarmentosum* são usadas na Tailândia como carminativo e digestivo. Na Malásia e Indonésia, as folhas e as raízes desta planta são utilizadas para o tratamento da dor de dente, dermatite, tosse e asma. No Brasil, a *P. corcovadensis* comumente encontrada nas regiões Norte e Nordeste e popularmente conhecido como “João-brandinho” é usada no tratamento de reumatismo, gripe e tosse. Na região Sudeste, as raízes e os ramos desta espécie são mastigadas para aliviar a dor de dente devido a sua ação anestésica sobre a membrana mucosa. Folhas e caules de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas no estado da Paraíba, contra picada de cobra e sedativo (NASCIMENTO, et al., 2012).

Estudos recentes revelam que extratos de *Piper sarmentosum* com propriedades antioxidantes também agem para proteger contra a osteoporose ossea, além disso, também aceleram a cicatrização de fraturas. Estes dados

podem ser uma alternativa em relação aos tratamentos convencionais para prevenir e reverter estados de osteoporose, assim como para acelerar e melhorar a cicatrização em casos de fratura com muito menos efeitos colaterais (ELVY et al., 2013).

O óleo essencial de *Piper aduncum* apresentou atividade fungitóxica, (BASTOS et al., 2004) moluscicida e antitumoral (ORJALA et al., 1993; MOREIRA et al., 1998; BALDOQUI et al., 1999), além disso, as frações e cromenos prenilados isolados desta espécie mostraram potente atividade antibacteriana (RUIZ et al., 2013).

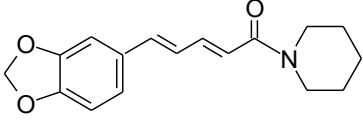
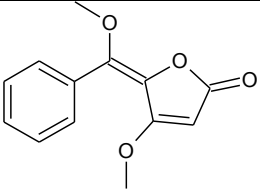
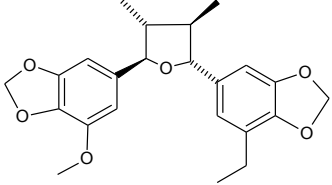
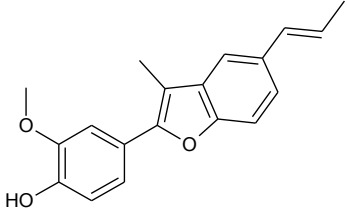
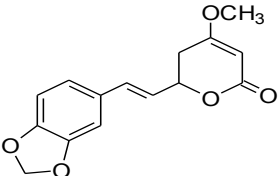
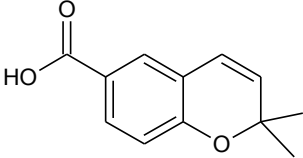
Outros estudos mostraram a atividade antifúngica da espécie *Piper abutiloides* Kunth, cujo extrato bruto foi ativo contra *Candida tropicalis* e *Sporothrix schenckii*, enquanto a fração hexânica foi ativa contra as espécies *Candida tropicalis* e *C. glabrata* (JOHANN et al., 2009). Os extratos, partições e substâncias puras de *Piper solmsianum* também apresentam potente atividade antifúngica contra alguns fungos patogênicos (CAMPOS et al., 2005). Além disso, piperolídeos isolados de *Piper malacophyllum* apresentaram atividades antifúngica frente a microrganismos como *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (LAGO et al., 2005).

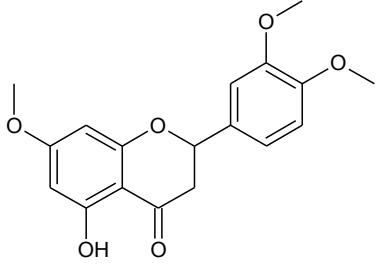
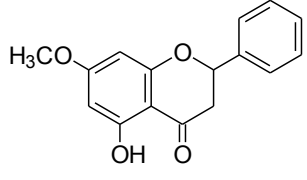
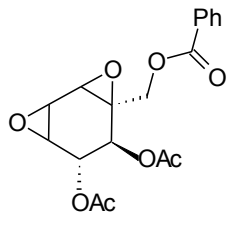
Luize e colaboradores (2006) demonstraram que neolignanais presentes na fração acetato de etila do extrato das folhas de *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) são ativas contra formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Os extratos das folhas apresentaram atividade antileishmania (LUIZE et al., 2005), além disso, também foram ativos contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, representando uma fonte em potencial para o isolamento de novos compostos antituberculose (SCODRO et al., 2013).

Recentemente, Nascimento e colaboradores (2012) demonstraram que óleos essenciais de *Piper klotzschianum* apresentam alta toxicidade contra *Aedes aegypti* e *Artemia salina*. Estes resultados indicam que estes óleos essenciais apresentando na sua constituição compostos que podem levar ao desenvolvimento de novos insecticidas em substituição aos sintéticos.

Outros componentes bioativos relatados em variadas espécies do gênero *Piper* estão descritos na tabela 1 (p. 34).

Tabela 1: Metabólitos secundários que ocorrem em diferentes espécies de *Piper*.

Classe	Exemplo	Espécies	Atividades biológicas	Referência
Alcalóides e amidas	 <p>piperina</p>	<i>P. cubeba</i> , <i>P. tuberculatum</i> , entre outras.	Antipirética, analgésica, inseticida e antiúlcera.	PARMAR, 1997; BURCI, et al., 2013
Piperolideos	 <p>4,6-dimetoxi-5-E-fenilbutenolideo</p>	<i>P. malacophyllum</i>	Antifúngica	LAGO, et al., 2005
Lignanas	 <p>lignana tetraidrofurânica</p>	<i>P. solmsianum</i>	Tripanocida	MARTINS, et al., 2013
Neolignanas	 <p>eupomatenóide-5</p>	<i>P. regnellii</i>	Antituberculose	SCODRO, et al., 2013
Kavapironas	 <p>metisticina</p>	<i>P. methysticum</i> e <i>P. sanctum</i> .	Atividade neuroprotetora e antioxidante	BACKHAUB E KRIEGLSTEIN, 1992; WU, et al., 2002
Cromenos	 <p>2,2-dimetil-2H-cromeno-ácido 6-carboxílico</p>	<i>P. aduncum</i>	Tripanocida	BATISTA JUNIOR, et al., 2008

<b>Flavonas</b>	 <p style="text-align: center;">velutina</p>	<i>P. clarkii</i> e <i>P. umbellata</i>	N C	BALDOQUI, et al., 2009
<b>Flavanonas</b>	 <p style="text-align: center;">pinostrobin</p>	<i>P. aduncum</i> , <i>P. fadyenii</i> <i>P. hispidum</i> e <i>P. steerni</i>	N C	PARMAR, 1997
<b>Outros compostos</b>	 <p style="text-align: center;">crotopóxido</p>	<i>P. attenuatum</i> , <i>P. futokadsura</i> , <i>P. hancei</i> , entre outras	Atividade antiumoral	PARMAR, 1997

NC = não consta

Diante dos dados apresentados até aqui fica claro a riqueza de componentes químicos com potencial biológico presentes em espécies do gênero *Piper*, o que ressalta a importância dos estudos químicos e biológicos.

#### 1.4. A espécie *Piper fuliginum*.

*Piper fuliginum* Kunth (Figura 6, p.36) é uma espécie inédita do ponto de vista de estudos químicos. Um estudo preliminar demonstrou que esta espécie acumula diversas classes de metabólitos entre elas kavalactonas, cromononas e derivados prenilados do ácido benzóico (Figura 8, p. 48). Além disto, testes biológicos iniciais com extratos brutos de folhas desta espécie demonstraram atividades em ensaios tripanocida e antifúngico frente aos fungos patógenos *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*.

**Figura 6:** *Piper fuliginum*.

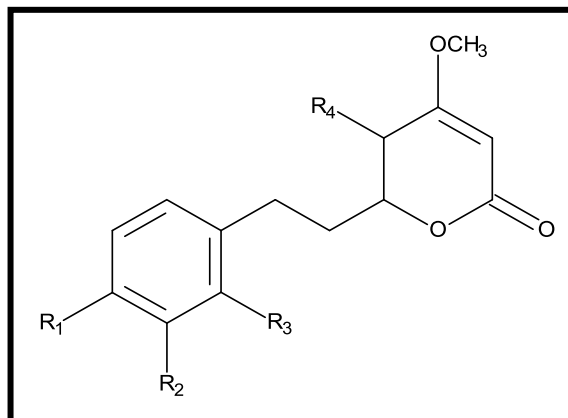


**Fonte:** Bruna F. Mazzeu.

## 1.5 Kavalactonas

Kavalactonas são substâncias que apresentam estrutura química formada por um anel aromático, ligado por uma cadeia composta por dois carbonos a um anel lactônico insaturado com seis membros ( $\alpha$ - pirona) metoxi-substituído (4-metoxi-2-pirona) (Figura 7, p. 37). O que as diferem é o grau de insaturação da cadeia intermediária de carbonos e/ou do anel lactônico, e a presença ou ausência de substituintes (hidroxi-, metoxi-, metilenodioxi-) no anel aromático (SHUANG, et al., 2009). Esta classe de metabólitos foi relatada em outras espécies de *Piper*, como *P. methysticum* (Kava-Kava) (PARMAR, 1997, RANJITH et al., 2002), *P. sanctum* (PARMAR, 1997; MATA et al., 2004), *P. cubeba* (ABOUL-ENEIN et al., 2011) e *P. rusbyi* (FLORES et al., 2007).

**Figura 7:** Estrutura química base das kavalactonas



Até o momento foram isoladas 18 kavalactonas (PARMAR, 1997, RANJITH, et al., 2002; MATA et al., 2004; FLORES, et al., 2007), destacando-se a Kavaína, 7,8- diidrokaína, yangonina, desmetoxyangonina, metisticina e diidrometisticina (Tabela 2, p. 38) (MA et al., 2004; LI et al., 2011), que foram as responsáveis por 95% do extrato orgânico de *P. Methysticum*.

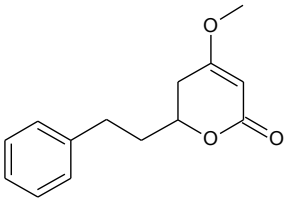
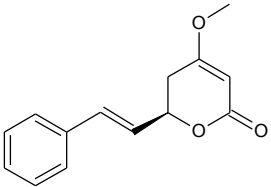
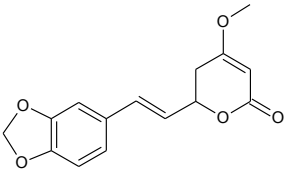
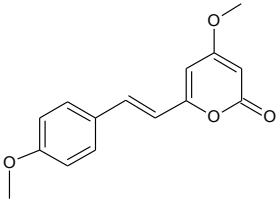
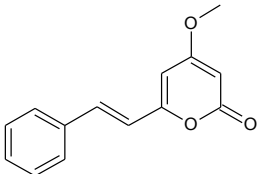
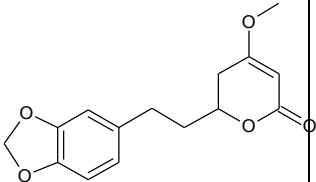
As kavalactonas são encontradas em maiores concentrações nas raízes de *P. methysticum* e são responsáveis pelas propriedades calmantes e relaxantes tradicionalmente atribuídas à espécie (WARBURTON et al., 2007)

Além da atividade ansiolítica, as kavalactonas isoladas de *P. methysticum* apresentam atividade herbicida e antifúngica frente a quatro tipos de fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporides*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, e *Trichoderma viride* (XUAN et al., 2006). Diidrokaína também mostrou atividade tripanocida no ensaio com o parasita *Trypanosoma brucei* (OTOGURO et al., 2012).

Hashimoto e colaboradores (2003) concluíram que a atividade inibitoria de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) está relacionada com o sistema conjugado das kavalactonas, sendo desmetoxyangonina e yangonina as substâncias mais ativas. Quando desmetoxyangonina e diidrometisticina são administradas juntas apresentam potente atividade de indução de CYP3A23, indicando um efeito sinérgico (MA et al., 2004).

A Tabela 2 (p. 38) mostra as atividades biológicas apresentadas pelas seis principais kavalactonas. Estes dados ressaltam a importância em estudar esta classe de substâncias.

**Tabela 2:** Estruturas químicas e atividade biológica das seis principais kavalactonas.

Substância	Estrutura	Atividade Biológica	Referência
7,8- diidrokaína		Ansiolítico, anti-inflamatório e tripanocida	WU et al., 2002; FELTENSTEIN et al., 2003; OTOGURO et al., 2012
kavaína		Anticonvulsante, analgésico e ansiolítico	WALDEN et al., 1997
metisticina		Atividade neuroprotetora e antioxidante	BACKHAUB E KRIEGLSTEIN, 1992; WU et al., 2002
yangonina		Antitumoral, anti-inflamatório e antioxidante	WU et al., 2002; HASHIMOTO et al., 2003
desmetoxyyangonina (5,6-deidrokaína)		Antitumoral, anti tuberculose e antioxidante	HASHIMOTO et al., 2003; MATA et al., 2004; ABOUL-ENEIN et al., 2011
diidrometisticina		Neuroprotetor, anticonvulsante, analgésico e ansiolítico	BACKHAUB E KRIEGLSTEIN, 1992; WALDEN et al., 1997

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do projeto foram determinar o perfil químico das partes aéreas de *Piper fuligineum* e dar início aos estudos biossintéticos das kavalactonas.

Objetivos específicos:

- Isolar e identificar as substâncias presentes nas partes aéreas de *P. fuligineum*.
- Submeter os extratos e as substâncias isoladas a ensaio biológico.
- Propor as relações biossintéticas entre as classes de metabolitos secundários presentes nas folhas de *P. fuligineum*.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Material vegetal**

As partes aéreas de *Piper fuliginum* utilizados nos estudos químicos foram coletadas no Jardim Botânico, no município de Araraquara – SP, sendo que para a obtenção do primeiro extrato, a coleta foi realizada em outubro de 2006. O segundo extrato foi obtido em fevereiro 2014 e a coleta foi feita no Clube Náutico Araraquara. O material vegetal foi identificado pela Dr<sup>a</sup> Inês Cordeiro do Instituto de Botânica (IBt de São Paulo, SP, Brasil) e suas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP – SP) sob o voucher Kato-0720.4.2. Para realizar os experimentos com a enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), foram utilizadas folhas de plantas adultas de *P. fuligienum* coletadas no Clube Náutico Araraquara em março de 2012.

#### **3.2 – Solventes**

Os solventes utilizados para cromatografia em camada delgada e em coluna foram de grau P.A., marca Merk, e para cromatografia líquida de alta eficiência analítica foram de grau HPLC. A água utilizada em todos os experimentos foi purificada antes do uso em sistema Milli-Q, Millipore.

#### **3.3 – Cromatografia**

Os extratos obtidos foram fracionados e analisados com a utilização de diversas metodologias cromatográficas, como cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

##### **3.3.1 – Cromatografia em camada delgada**

A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi desenvolvida em placas de vidro impregnadas com sílica gel 60 (Merck), espessura de 0,25 mm.

- A revelação das cromatoplasmas foi efetuada pela inspeção em luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm, e também com o uso do reagente revelador anisaldeído.

- Solução de anisaldeído: (0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético, 8,5 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantendo essa solução estocada em frasco opaco). Para visualização a solução foi borrifada na cromatoplasma, que em seguida foi aquecida em estufa a 120 °C por 5 minutos, observando-se a presença de manchas de cores características (azuis, roxas e esverdeadas).

### **3.3.2 – Cromatografia em coluna (CC)**

Para cromatografia em coluna, em fase normal, utilizou-se sílica gel 60 (Merck), 70 – 330 Mesh como fase estacionária, suspensa no eluente (fase móvel) e em seguida transferida para uma coluna, mantendo-se o fluxo do eluente até acomodação do gel.

Para a cromatografia sob pressão (flash), foi utilizada sílica gel (230 – 400 Mesh), marca Merck.

### **3.3.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, com sistema de bombas ternárias LC – 10 AD, detector UV – visível SPD – 10 A, auto-injetor SIL –10 A, um controlador CBM –10 A e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando software Class – IC 100. Foi utilizado também um cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20<sup>a</sup> e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando software LC-solution.

As colunas analíticas utilizadas foram de sílica de fase reversa (C-18), Phenomenex, com tamanho de 4,6 x 250 mm e partículas de 5 µm e Phenomenex, Phenyl-Hexyl, com tamanho 4,6 x 250 mm e partículas de 5 µm.

Para cromatografia preparativa, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca VARIAN ProStar equipado com duas bombas modelo SD-1

PrepStar e detector UVVis modelo 320. A coluna preparativa utilizada foi Phenomenex, Phenyl-Hexyl, com tamanho 250 x 21,20 mm e partículas de 10  $\mu\text{m}$ .

As análises bioquímicas foram feitas em escala analítica utilizando um cromatógrafo da marca SHIMADZU, constituído por quatro bombas modelo LC-10 e um detector UV-Vísivel modelo SPD-10. A coluna utilizada foi de sílica de fase reversa Supelcosil LC -18, 250 x 4,60 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Supelco.

### **3.4. Equipamentos**

A centrífuga refrigerada utilizada durante o processo de extração enzimática foi da marca SORVALLÒ RC PLUS.

O Freezer -86 °C utilizado para o armazenamento dos extratos enzimáticos e frações foi da marca FORMA Scientific.

### **3.5 – Técnicas Espectrométricas**

#### **3.5.1- Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Para as análises espectrométricas foi utilizado o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da marca Varian Inova 300 operando a 300 MHz na frequência do  $^1\text{H}$  e a 75 MHz na frequência do  $^{13}\text{C}$ , um espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$  e um espectrômetro Bruker Avance 600 operando a 600 MHz na frequência do  $^1\text{H}$  e a 150 MHz na frequência do  $^{13}\text{C}$ , com duas probes, crioprobe e smartprobe (BBO 600 MHz S3 mm). Como solvente deuterado foram utilizados  $\text{CDCl}_3$  (99,8%) (Merck) e  $\text{DMSO}-d_6$  (99,9%) (Aldrich). Os deslocamentos químicos foram expressos  $\delta$  ou ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

#### **3.5.2- Espectrometria de massas**

Cromatografia líquida de alta eficiência da Agilent Technologies equipado com uma bomba quaternária Agilent 1200, um autosampler de alta performance Agilent 1200 e um detector diodo Agilent 1260 acoplado a um Espectrômetro de Massa 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quad LC / MS / MS Mass Spectrometer), AB Sciex Instruments operando no modo positivo e ionização Turboion. Os parâmetros

utilizados foram: gás hélio: 10 psi, IonSpray: 5500 V, Gás 1: 50 psi, Gás 2: 50 psi, Temperatura: 700° C, potencial de agrupamento: 30,00 V, potencial de entrada: 5,00 V e aquecedor de interface: ON, energia de colisão: 30 eV. A coluna utilizada durante as análises de LC-EM/EM foi uma coluna Phenomenex Luna C18 (2) 5 um (250 mm x 4,6 mm). A gama FULLSCAN era 100-350 Da. O volume injetado foi 10 µl e a temperatura da coluna foi de 40 ° C.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Estudo fitoquímico de *Piper fuliginum*

#### 4.1.1. Perfil cromatográfico

##### 4.1.1.1. Obtenção dos extratos

O material seco de *Piper fuliginum* foi separado em frutos e folhas. Após pulverização do material em moinho de facas foram obtidos 420 g das folhas e 80 g dos frutos. Este material foi então submetido à extração por maceração em etanol (500 mL para as folhas e 80 mL para os frutos), durante 30 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes. As soluções foram filtradas e concentrada em rotaevaporador. Obteve-se 23,11 g de extrato dos frutos e 54,40g de extrato das folhas.

Os extratos obtidos foram submetidos a extração em fase sólida prévia, para retirada de compostos apolares. Foi utilizado cartuchos SPE Chromabond® (C-18 ec, 500 mg/6 mL), os quais foram ativados com 6 mL de metanol e depois condicionados com MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção 9:1. Os extratos (1,0 g de cada) foram dissolvidos em 1 mL da mesma fase móvel utilizada para condicionar o cartucho SPE. Em seguida as amostras foram aplicadas e eluídas com 5 mL de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1) .

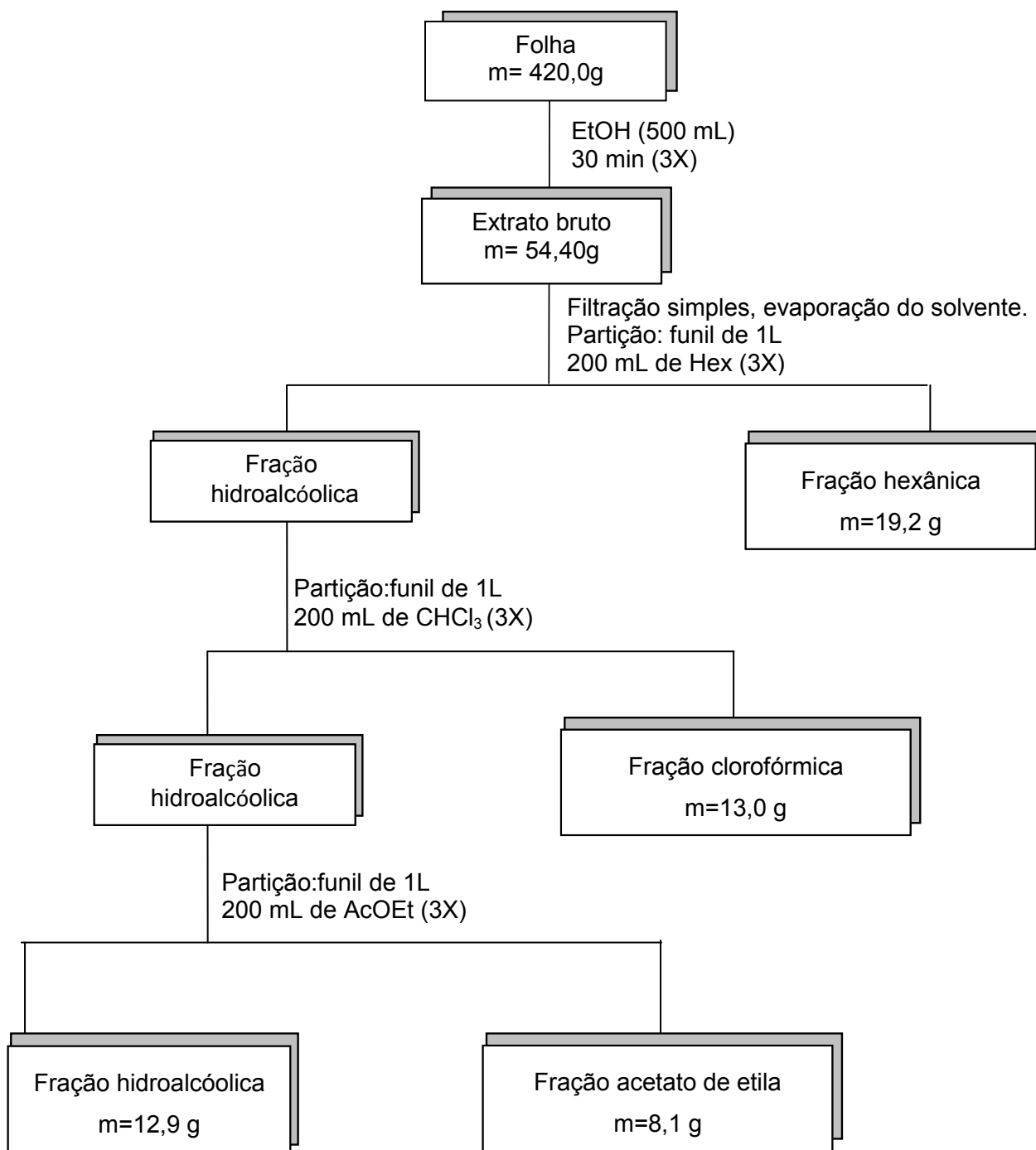
A condição de análise utilizada em CLAE foi um gradiente iniciando com metanol/água (30:70) até 100% de MeOH, em 50 minutos, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Foram injetados 30 µL de cada extrato. A coluna utilizada foi uma Phenomenex C-18.

##### 4.1.1.2. Obtenção das frações

Em seguida, os extratos das folhas foram submetidos a extração líquido-líquido com 200 mL de solventes com polaridade crescente. Foram utilizados hexano, clorofórmio e acetato de etila, que deram origem as frações FH, Fcl e FAc, respectivamente. A fração aquosa restante após as extrações com os solventes foi denominada fração final. O procedimento foi repetido três vezes (Fluxograma 1, p.

45). As frações foram concentradas em rotaevaporador, resultando nas massas descritas na tabela 3 (p. 46).

**Fluxograma 1:** Obtenção do extrato bruto e frações a partir dos folhas triturados e partição liquido-liquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila.



**Tabela 3:** Quantidade obtida das frações das folhas de *P. fuliginum*

<b>Extrato</b>	<b>Quantidade obtida (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Fração Extrato	54,4	12,95
Fração Hexânica	19,2	35,29
Fração Acetato de Etila	8,10	14,88
Fração Clorofórmica	13,0	23,89
Fração Final (Hidroalcoólica)	12,9	23,71

#### 4.1.2. Purificação de substâncias

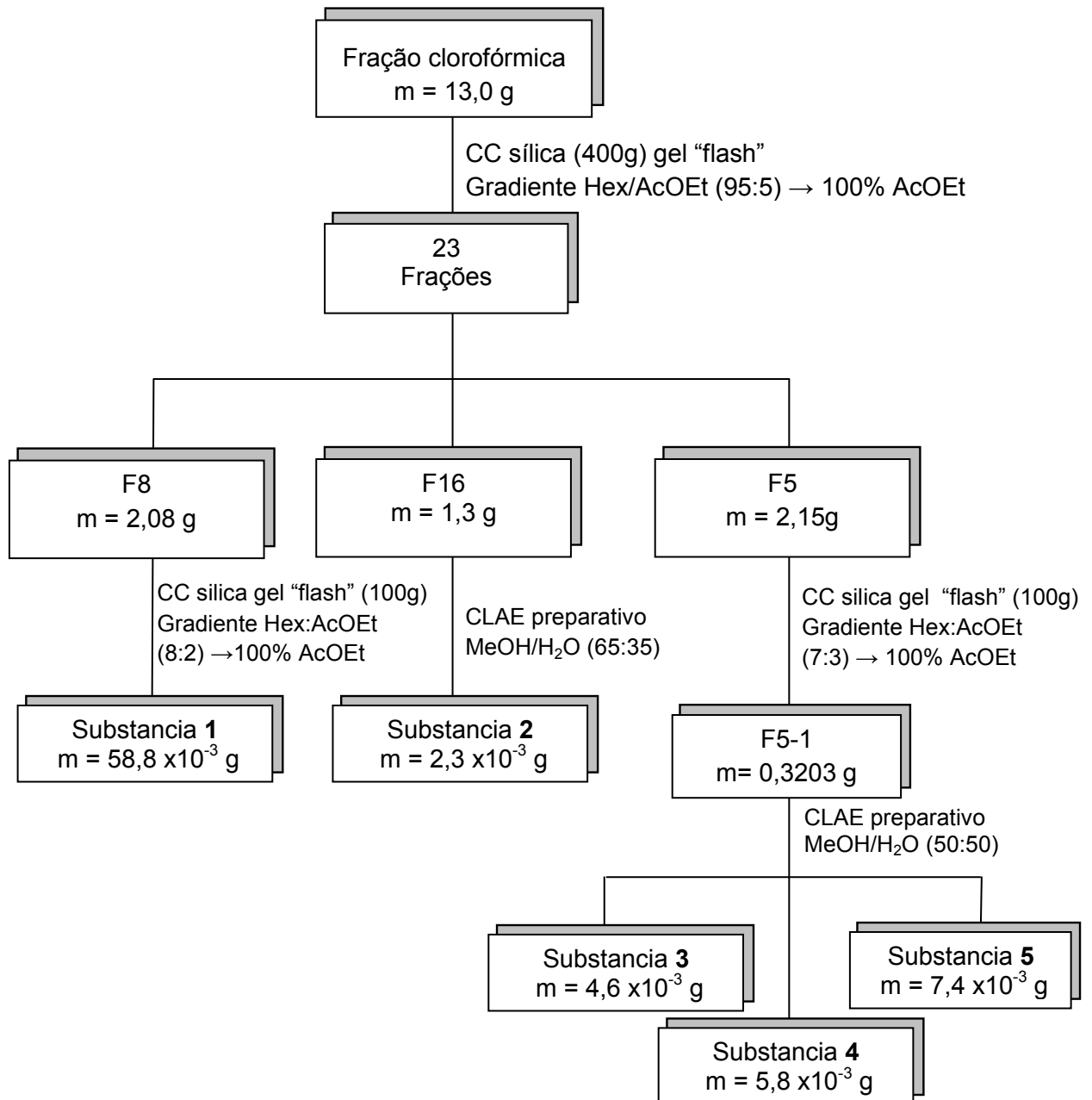
A fração clorofórmica das folhas de *Piper fuliginum* (13,0 g) foi selecionada para continuar o estudo fitoquímico devido ao perfil químico apresentado após análise cromatográfica por CCDC. Esta fração foi submetida à cromatográfica em coluna (400g de sílica), utilizando o modo gradiente iniciando com hexano/acetato de etila (95:5) até 100% de AcOEt, obtendo-se 23 frações.

A fração F8 (2,08 g) foi submetida a novo fracionamento cromatográfico, utilizando sílica flash (100 g) e um sistema gradiente de solvente que constituem fase móvel Hex:AcOEt (8:2) até 100% de AcoEt, culminando no isolamento da substância **1** ( $58,8 \times 10^{-3}$  g).

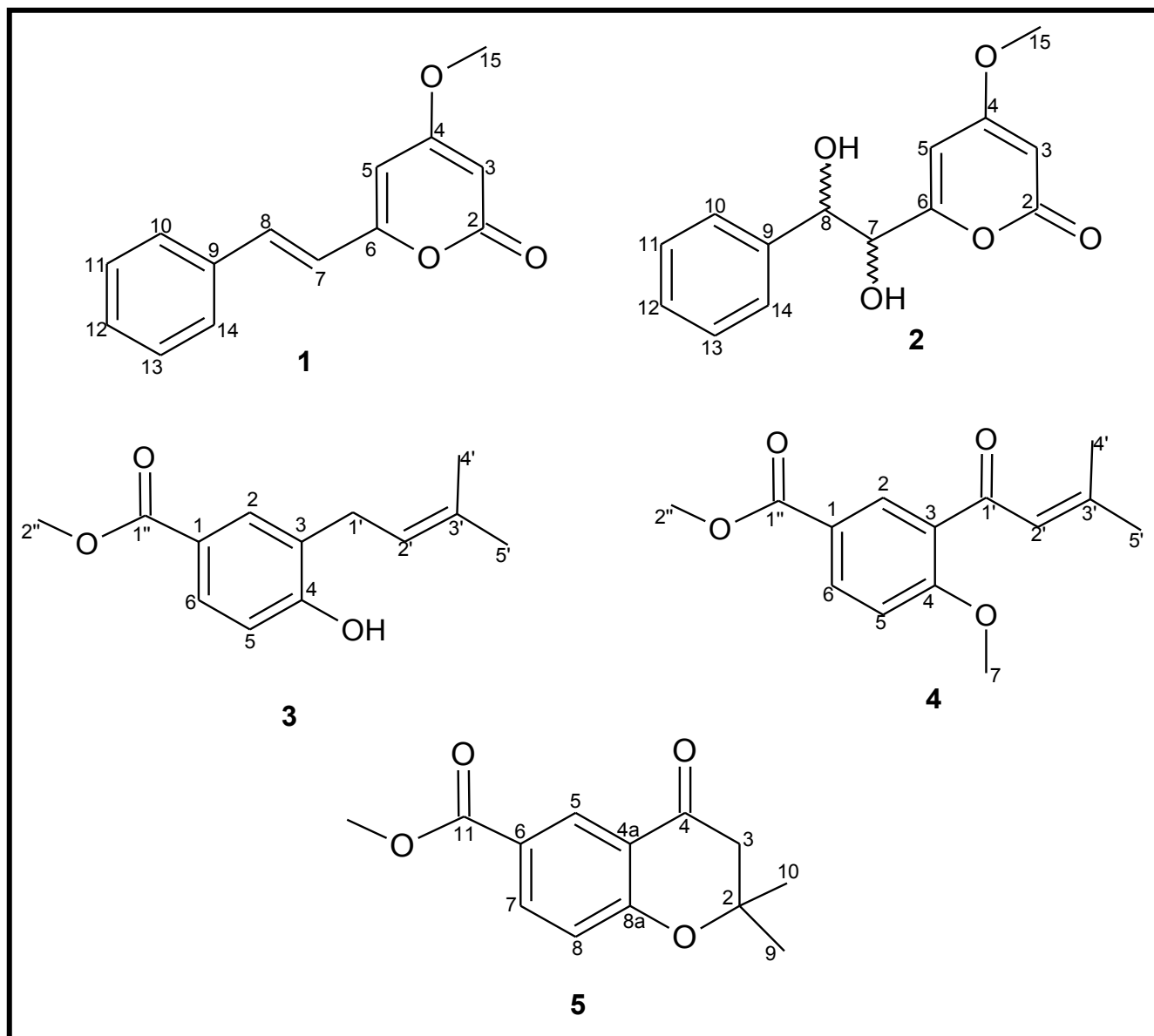
A fração F16 (1,3 g) foi então submetida à cromatografia líquida de alta eficiência, escala preparativa, modo isocrático MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35), obtendo-se o isolamento da substância **2** ( $2,3 \times 10^{-3}$  g).

A fração F5 (2,15 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica flash (100 g) e um sistema gradiente da fase móvel Hex:AcOEt (7:3) até 100% de AcOEt. A fração F5-1 (0,3203 g) foi purificada por CLAE em escala preparativa, modo isocrático MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50), culminando no isolamento das substâncias **3** ( $4,6 \times 10^{-3}$  g), **4** ( $5,8 \times 10^{-3}$  g) e **5** ( $7,4 \times 10^{-3}$  g) (Fluxograma 2, p. 47).

A Figura 8 (p. 48) mostra as estruturas químicas das substâncias identificadas em *P. fuliginum*.

**Fluxograma 2:** Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica.



**Figura 8:** Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Piper fuliginum*

## 4.2. Atividades biológicas

### 4.2.1. Avaliação da atividade antifúngica

Os testes para determinação da atividade antifúngica foram realizados sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria José Soares Mendes Gianinni (Laboratório de Micologia Clínica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara).

Os microrganismos alvos deste estudo foram a *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012). Os microorganismos foram obtidos do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP. As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose por 24 h, em temperatura ambiente.

Teste de sensibilidade: Os testes da atividade antifúngica foram executados usando o método da microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A2 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) com modificações. Foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-glutamina em pH 7,0 mantido com ácido morpholinopropanosulfônico (MOPS) 0,165 M, enriquecido com 2% de glicose.

As substâncias analisadas foram dissolvidas em DMSO e o volume adicionado à placa com meio de cultura para células (RPMI) foi calculado para que a concentração da primeira substância foi 250 µg/mL. A suspensão das células foi preparada com solução fisiológica 0,85% com uma turbidez equivalente a da escala McFarland 0,5 e diluído 1:100 em RPMI para a concentração final  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Esta suspensão foi inoculada na placa de microdiluição preparada previamente com as substâncias analisadas e diluídas na concentração entre 250 a 0,48µg/mL. As placas foram incubadas sob agitação a 37 °C por 24 h para as espécies do gênero *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. O controle positivo foi a anfotericina B. As soluções estoque foram preparadas em DMSO com concentrações que variaram de 0,03 a 16 µg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição do caldo, para a anfotericina B foi definida como a concentração mais baixa que inibiu completamente o crescimento dos microorganismos. Para as substâncias analisadas, as CIMs foram definidas como as concentrações mais baixas capazes

de inibir todo o crescimento visível do fungo. Os resultados foram analisados visualmente e por leitura espectrofotométrica.

#### 4.2.2. Avaliação da atividade tripanocida

Os testes para determinação da atividade tripanocida foram realizados pela mestranda Gabriela Passerini sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria Barreto Cicarelli (Laboratório de Imunologia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara).

O teste colorimétrico MTT foi descrito por Muelas-Serrano e colaboradores (2000), e utiliza as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, na câmara de fluxo laminar.

Para o teste foram colocados 3 µL da substância em cada concentração desejada (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, respectivamente), não ultrapassando o limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores apresentaram toxicidade para o parasita. A seguir, foram adicionados 97 µL de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (fase log) na concentração desejada nos poços para teste e 97 µL de meio LIT nos poços controles. Foram realizados 2 controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, com a presença da substância e outro na ausência, mas contendo os parasitas. A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 72 horas. A seguir, foi adicionado 10 µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços e a placa foi incubada na ausência de luz por 75 minutos a 28 °C.

Coloca-se então 100 µL da solução 10% SDS-0,01N HCl, incubando à temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz.

A leitura da densidade ótica (DO) é realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados são expressos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos – C% (citotoxicidade) - é calculada segundo a equação abaixo

$$\% C = [(Gc - Gp)/Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

Sendo que, Gc representa o número de parasitas/mL nos poços controles e GP representa o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. Ac corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitas; Am corresponde ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasita; Ap representa o valor da absorbância nos testes e Apm representa o valor da absorbância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita.

#### **4.2.3. Avaliação da atividade antiviral**

A substância **1** foi avaliada frente ao vírus da hepatite C. Os testes foram realizados pela aluna Ana Carolina Gomes Jardim sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Rahal (Departamento de Biologia - Instituto de Biociência, Linguagem e Ciências Exatas (IBILCE) – UNESP- São José do Rio Preto –SP).

O composto foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO). As diluições dos compostos foram feitas imediatamente antes das experiências para alcançar uma concentração máxima final de 0,5% de DMSO. Para todos os ensaios realizados, as células de controle foram tratadas com DMSO adicionado a uma concentração final de 0,5%. A ciclosporina A foi usado como controle positivo para a inibição da replicação.

Inicialmente, foram realizados ensaios de triagem com células Huh-7.5 tratadas com 100, 10, 1 e 0,1  $\mu$ M dos compostos que foram incubados durante 48 horas para determinar a citotoxicidade dessas substâncias. Em seguida, células Huh-7.5 foram eletroporadas com SGR- JFH1 -luc e os compostos foram adicionado às células em 4 horas após a eletroporação em concentrações específicas. Níveis de replicação foram avaliados 48 horas mais tarde pelo ensaio da luciferase.

Para analisar melhor os efeitos de **1** na replicação do virus , foi utilizada uma linhagem de células Huh7.5 estável abrigo os replicons SGR-JFH-1 FEO . Doses crescentes de composto foram adicionadas a estas células e a eficiência da replicação e viabilidade celular foram determinadas 48 horas após a adição do composto **1**.

### 4.3. Estudos biossintéticos de *Piper fuliginum*

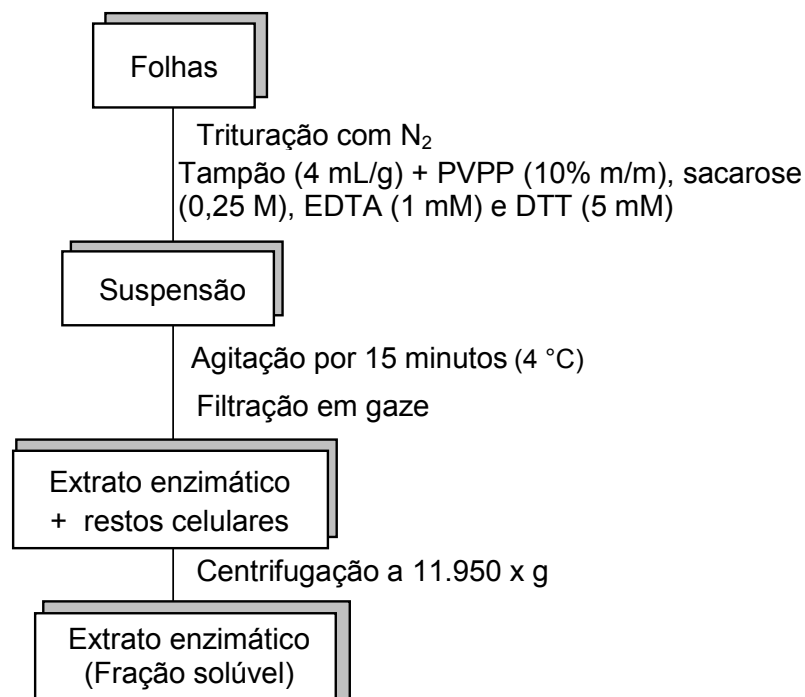
#### 4.3.1. Estudo da fenilalanina amônia liase (PAL) em *Piper fuliginum*

##### 4.3.1.1. Extração enzimática

O extrato enzimático das folhas de *Piper fuliginum* foi obtido a partir de 20 g de folhas trituradas em gral e pistilo com N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de solução tampão borato 0,1 M (pH 8,8). A solução tampão continha PVPP (10% m/m), sacarose (0,25 M), EDTA (1 mM) e DTT (5 mM).

A suspensão obtida foi agitada por 15 minutos em banho de gelo. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze e transferido para um tubo de centrífuga (4 °C) e centrifugado a 11.950 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi armazenado em banho de gelo e o precipitado foi descartado (Fluxograma 3, p. 52).

**Fluxograma 3:** Obtenção do extrato enzimático das folhas de *Piper fuliginum*



##### 4.3.1.2. Precipitação fracionada

Com o intuito de enriquecer a fração com a enzima PAL, foi realizada precipitação fracionada utilizando sulfato de amônio. A concentração do sal, a ser

adicionada para atingir a saturação desejada, foi determinada utilizando a tabela descrita por England, (1990) (Tabela 4, p. 53).

**Tabela 4:** Precipitação com sulfato de amônio – concentração de sal a ser adicionado a 0°C.

<b>saturação (%)</b>	<b>sulfato de amônio (g/L)</b>
0 – 25	134
25 – 55	179
55 – 85	161

Inicialmente, foi adicionado sulfato de amônio ao extrato enzimático para atingir a saturação de 25%. A solução foi mantida sob agitação por 30 minutos a 4 °C, e posteriormente, centrifugada a 16.300 x g por 30 minutos. O precipitado foi congelado a -20°C e o sobrenadante levado a 55% de saturação, como descrito anteriormente. Uma última adição de sulfato de amônio foi realizada para que o sobrenadante atingisse 85% de saturação. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 3 mL de solução tampão borato 0,1M (pH 8,8).

#### **4.3.1.3. Determinação da concentração proteica**

A determinação da concentração da proteína foi realizada utilizando-se o método de Bradford modificado. O reagente foi preparado utilizando 500 µL de HCl 0,6 M e adicionado Coomassie blue até a absorbância entre 1,3 e 1,5 a 465 nm. A curva padrão foi realizada utilizando albumina bovina (fração V) (1 mg/mL). Foram utilizados volumes de 5 a 50 µL dessa solução, os quais foram colocados em uma cubeta de poliestireno e incubados com 1 mL de água e 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 minutos foram feitas duas leituras a 595 nm. O teste foi realizado utilizando-se 10 µL das frações ressuspensas, 1000 µL de água e 1000 µL do reagente Coomassie Blue. A solução foi agitada e transferida para uma cubeta de 1 cm. Após 5 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm. A determinação da concentração protéica foi realizada em duplicata.

#### 4.3.1.4. Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se em um Eppendorf 250  $\mu\text{L}$  de tampão borato 0,1 M (pH 8,8), 125  $\mu\text{L}$  de solução enzimática, que foi mantido em banho aquecido a 40°C por cinco minutos. A reação foi então iniciada com a adição de 150  $\mu\text{L}$  de fenilalanina (10 mM) e incubada a 40 °C sob agitação. A reação foi finalizada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de HCl (6 M). A solução foi agitada e centrifugada a 14.000 rpm por alguns segundos.

O procedimento descrito no Fluxograma 4 (p. 54) foi repetido em diferentes intervalos de tempo: 1, 3 e 24 horas. Esses ensaios foram realizados em duplicata, e em cada período foram realizados os experimentos controles, com apenas o extrato enzimático e substrato.

As amostras obtidas foram analisadas por CLAE, nas seguintes condições:  
Volume de amostra injetado: 10  $\mu\text{L}$

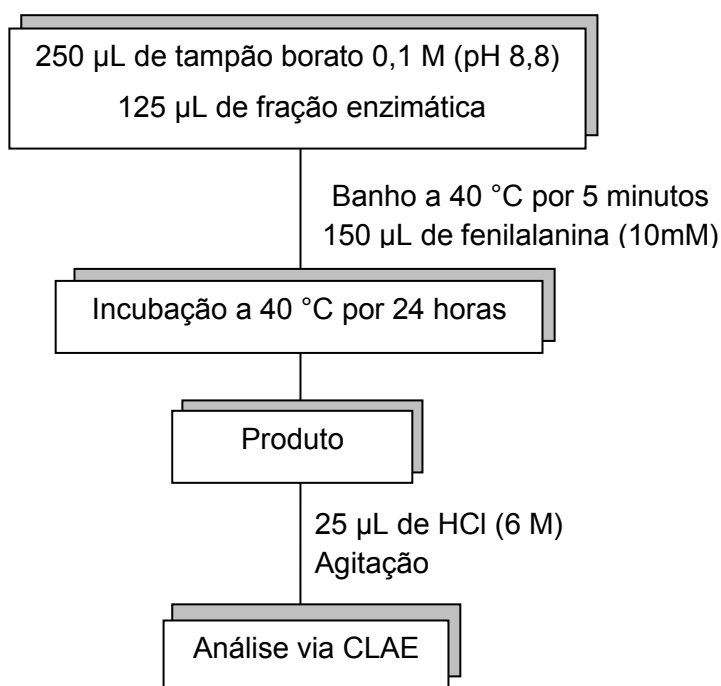
Fluxo = 1,0 mL/min

$\lambda$  = 275 nm

Coluna: supelcosil LC-18

Fase móvel: MeOH:H<sub>2</sub>O (+0,1% de HAc) / 60:40

**Fluxograma 4:** Procedimento geral para o ensaio enzimático.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Estudo fitoquímico de *Piper fuliginum***

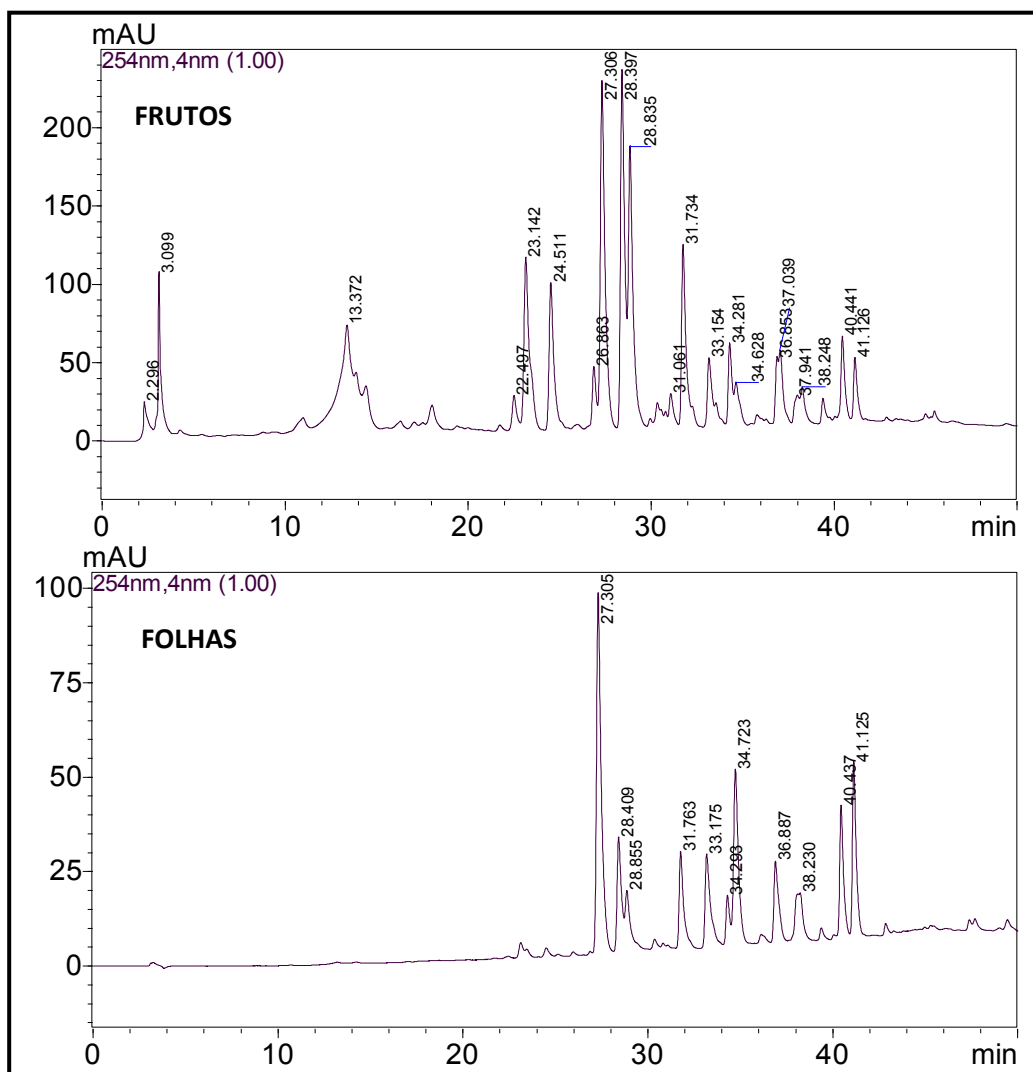
#### **5.1.1. Perfil cromatográfico**

As análises por CLAE dos extratos etanólicos foram obtidas com a finalidade de compará-los quanto suas composições. Considerando que as folhas e os frutos de *P. fuliginum* foram submetidos às mesmas condições de secagem, moagem, extração, extração em fase sólida e análise, assim foi possível identificar algumas diferenças nos cromatogramas quanto à composição e concentração dos seus metabólitos (Figura 9, p. 56). Avaliando os cromatogramas, foi possível observar que todos os metabólitos presentes nas folhas também estavam presentes nos frutos, no entanto, foi observado que o extrato etanólico dos frutos também apresentou constituintes de maior polaridade.

É importante ressaltar, porém, que as diferenças observadas nos extratos são específicas para as amostras coletadas no mês de outubro de 2006 e podem variar ao longo do período sazonal e/ou circadiano.



**Figura 9:** Cromatogramas obtidos via CLAE dos extratos etanólicos dos frutos e folhas de *P. fuliginum*. (Condições de análise: 30% MeOH → 100% MeOH em 50 min., fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna C-18 Phenomenex)



## 5.1.2. Determinação e Identificações estruturais

### 5.1.2.1. Kavalactonas

Foram isoladas duas kavalactonas (**1** e **2**) da fração CHCl<sub>3</sub> das folhas de *Piper fuliginum*. A substância **1a** (Figura 12, p. 62) identificada por espectrometria de massas, apresentando-se como um intermediário biossintético das substâncias **1** e **2** (Figura 8, p. 48).

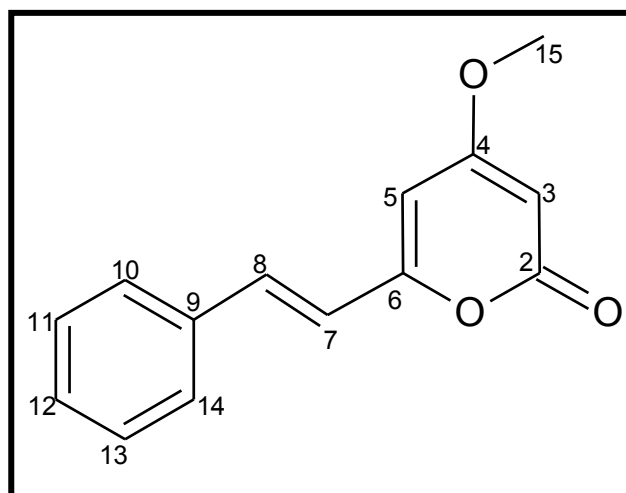
Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Espectros 1-2 e 10-11; p. 97-98 e 106-107; Tabela 5, p. 60) das substâncias **1** e **2** são característicos de kavalactonas com anel lactônico insaturado, pois exibem um par de dupletos em torno de δ 5,87 (H-5)

e  $\delta$  5,42 (H-3) e um simpleto em  $\delta$  3,76, característico de metoxila ligada a este anel. Além disso, a substância **1** apresenta dois dupletos em torno de  $\delta$  6,51 (H-7) e  $\delta$  7,45 (H-8) com constante de acoplamento de 16 Hz, característico de ligação *trans*.

#### 5.1.2.1.1. Substância **1**

A substância **1** (Figura 10, p. 57) foi obtida após uma etapa cromatográfica em coluna de sílica da fração F8 e apresentou-se sob a forma de um sólido branco amorfo.

**Figura 10:** Estrutura química da substância **1**



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectros 1-2, p. 97-98; Tabela 5, p. 60) apresenta sinais na região dos hidrogênios aromáticos, em torno de  $\delta$  7,26 (m) - 7,45 (m), característicos de anel monossustituído, sendo atribuídos aos hidrogenios H-10, H-11, H-12, H-13 e H-14. O simpleto em  $\delta$  3,76 (s, 3H) foi atribuído a um grupo metoxílico ligado ao carbono C-4 do anel lactônico. Um duplete observado em  $\delta$  5,88 (*d*,  $J=2,0$  Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio H-5 e o duplete em  $\delta$  5,43 (*d*,  $J=2,0$  Hz, 1H) foi atribuído ao H-3. Os sinais observados em  $\delta$  6,51 (*d*,  $J = 16$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,43 (*d*,  $J=16$  Hz, 1H), foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente, correspondendo a uma ligação dupla em *trans*.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 3-4, p. 99-100; Tabela 6, p. 61) foi observado um sinal em  $\delta$  56,12, característico de grupo metoxílico; dois sinais em  $\delta$

118,8 e 136,0, característicos de carbonos  $sp^2$ , que foram atribuídos a C-7 e C-8, respectivamente. São observados também três sinais característicos de carbonos aromáticos em  $\delta$  127,6, 129,6 e 129,1 referentes aos C-10 e 14, C-12, C-11 e 13 e um sinal em  $\delta$  135,4 referente ao C-9. O sinal em  $\delta$  164,2 é característico de carbonila de lactona (C-2) e os sinais em  $\delta$  89,0, 171,3, 101,5 e 158,8 são referentes aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6, respectivamente, deste anel.

As atribuições foram confirmadas através da inspeção dos mapas de contorno gHSQC (Espectros 5-6, p. 101-102) e gHMBC (Espectros 7-9, p. 103-105). O sinal em  $\delta$  3,76, referente aos hidrogênios da metoxila apresenta correlação com o sinal do carbono C-4 em  $\delta$  171,3. Além disso, o carbono C-4 também apresenta correlação com os sinais  $\delta$  5,43 e 5,87, referente aos hidrogênios H-3 e H-5, respectivamente.

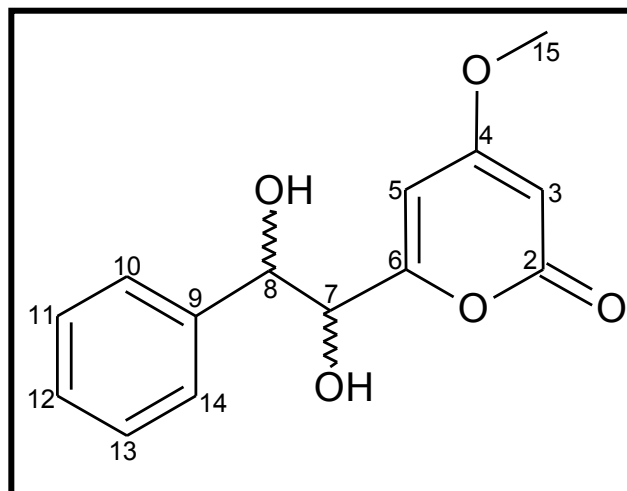
O experimento gHMBC mostra também a correlação do sinal em  $\delta$  118,8 do carbono C-7 com os sinais em  $\delta$  5,87 referente ao H-5 e  $\delta$  7,45 referente ao H-8. O sinal em  $\delta$  136,0 referente ao carbono C-8 apresenta correlação com o sinal  $\delta$  7,45 referente ao hidrogênio aromático H-10.

Esta substância, denominada desmetoxyagonina (RANJITH et al., 2002) ou 5,6-desidro kavaina (OTOGURO et al., 2012, ABOUL-ENEIN et al., 2011) pertencente à classe das kavalactonas, foi isolada anteriormente de *Piper methysticum* (RANJITH et al., 2002), *Piper sanctum* (MATA et al., 2004) e *Piper cubeba* (ABOUL-ENEIN et al., 2011). É uma das substâncias encontrada em maior concentração nas raízes de *P. methysticum* (SMITH et al., 1983) e em *Piper sanctum* foi isolada de seu caule. Esta substância possui atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*, a qual provoca a maioria dos casos de tuberculose (MATA et al., 2004). Apresentou também promissora atividade antioxidante (ABOUL-ENEIN et al., 2011). Em *Piper fuliginum*, está sendo relatada pela primeira vez.

#### **5.1.2.1.2. Substância 2**

A substância **2** (Figura 11, p. 59) foi isolada da fração 16 após uma etapa cromatográfica em coluna de sílica seguido de separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

**Figura 11:** Estrutura química da substância 2



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectros 10-11, p. 106-107; Tabela 5, p. 60) apresenta sinais na região dos hidrogênios aromáticos, característicos de anel monossustituído, em torno de  $\delta$  7,22 (m) - 7,34 (m) que correspondem aos hidrogênios H-10, H-11, H-12, H-13 e H-14. O simpleto em  $\delta$  3,78 (s, 3H) foi atribuído a um grupo metoxílico ligado ao carbono C-4 do anel lactônico. O duplete observado em  $\delta$  6,07 (d;  $J = 2,0$  Hz, 1H) foi atribuído a H-5. Os sinais observados em  $\delta$  4,24 (m, 1H) e  $\delta$  4,66 (m, 1H), característico de hidrogênios carbinólicos, foram atribuídos aos H-7 e H-8, respectivamente, e o dubleto em  $\delta$  5,55 (d;  $J = 2,0$  Hz, 2H) foi atribuído ao H-3.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 12-13, p. 108-109; Tabela 6, p. 61) foi observado um sinal em  $\delta$  57,1, característico do grupo metoxílico; dois sinais em  $\delta$  75,2 e  $\delta$  74,6 atribuídos aos carbonos carbinólicos C-7 e C-8, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  101,0 e 166,3 foram atribuídos aos carbonos  $\text{sp}^2$  C-5 e C-6 respectivamente. São observados também quatro sinais característicos de carbonos aromáticos em  $\delta$  128,0, 128,3, 127,9 referentes aos C-10 e C-14, C-11 e C-13, C-12, respectivamente e um sinal em  $\delta$  143,2 referente ao C-9. O sinal em  $\delta$  164,2 é característico de carbonila de lactona e os sinais em  $\delta$  88,8 e  $\delta$  171,6 são referentes aos carbonos C-3 e C-4.

A confirmação destes sinais foi feita observando-se o mapa de contorno gHSQC (Espectro 14, p. 110) e gHMBC (Espectros 15-17, p. 111-113), que mostra a correlação do sinal em  $\delta$  75,2 referente ao carbono C-7 com os sinais em  $\delta$  6,07 e

4,66 referente ao H-5 e H-8, respectivamente; e a correlação do sinal em  $\delta$  143,2 do carbono aromático C-9 com o sinal em  $\delta$  4,66 referente ao hidrogênio H-8.

Além disso, este experimento mostra a correlação entre o sinal  $\delta$  3,78 dos hidrogênios da metoxila com sinal em  $\delta$  171,6 referente ao carbono C-4, que também apresenta correlação com os sinais  $\delta$  5,55 e 6,07 referente aos hidrogênios H-3 e H-5, respectivamente.

Esta substância, inédita em *Piper fuliginum*, é uma kavalactona isolada anteriormente de *Piper rusbyi* (FLORES et al., 2007).

**Tabela 5:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias 1-2.

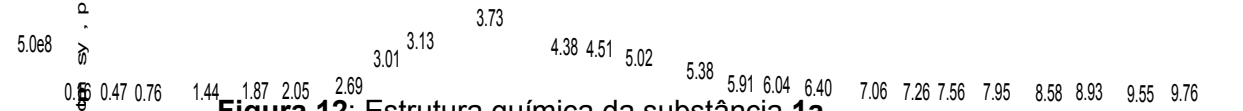
Posição	<b>1</b>	<b>2</b>
	$\delta_{\text{H}}$ ( mult; J/Hz) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_{\text{H}}$ ( mult; J/Hz) (500 MHz, DMSO $d_6$ )
2	-	-
3	5,43 (d; 2,0)	5,55 (d; 2,0)
4	-	-
5	5,88 (d; 2,0)	6,07 (d; 2,0)
6	-	-
7	6,51 (d; 16,0)	4,24 (m)
8	7,43 (m)	4,66 (m)
9	-	-
10-14	7,26 (m) – 7,45 (m)	7,22 (m) – 7,34 (m)
11-13	7,26 (m) – 7,45 (m)	7,22 (m) – 7,34 (m)
12	7,26 (m) – 7,45 (m)	7,22 (m) – 7,34 (m)
15-OCH <sub>3</sub>	3,76 (s)	3,78 (s)

**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1-2**

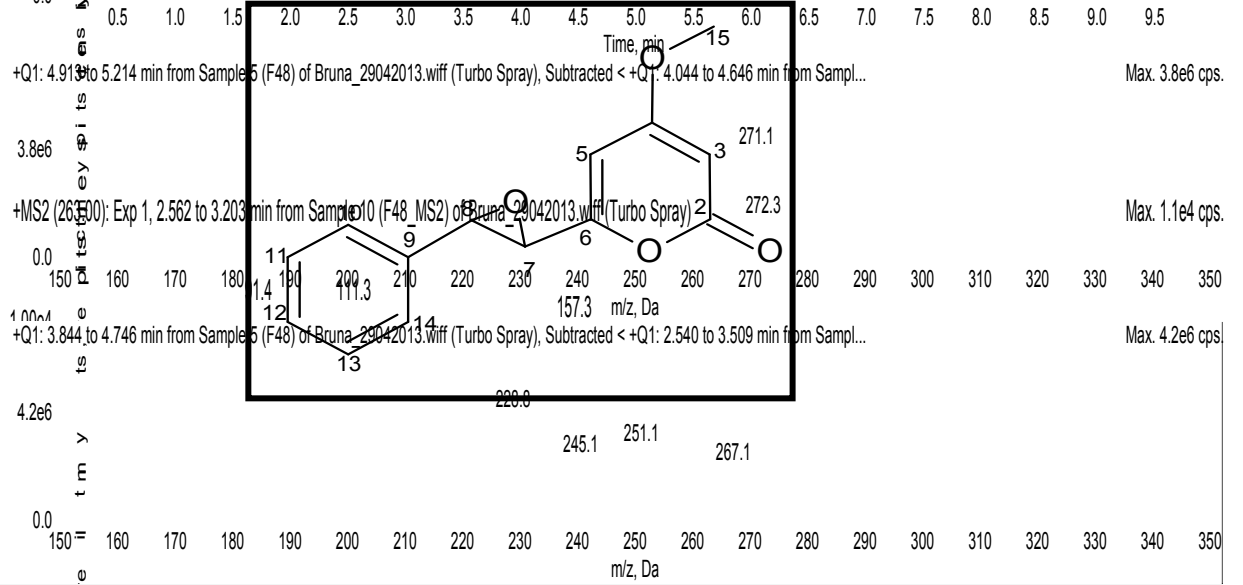
Posição	<b>1</b> $\delta_{\text{C}}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	<b>2</b> $\delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO $d_6$ )
2	164,2	164,2
3	89,0	88,8
4	171,3	171,6
5	101,5	101,0
6	158,8	166,3
7	118,8	75,2
8	136,0	74,6
9	135,4	143,2
10-14	127,6	128,0
11-13	129,1	128,3
12	129,6	127,9
15-OCH <sub>3</sub>	56,1	57,1

### 5.1.2.1.3. Substância **1a**

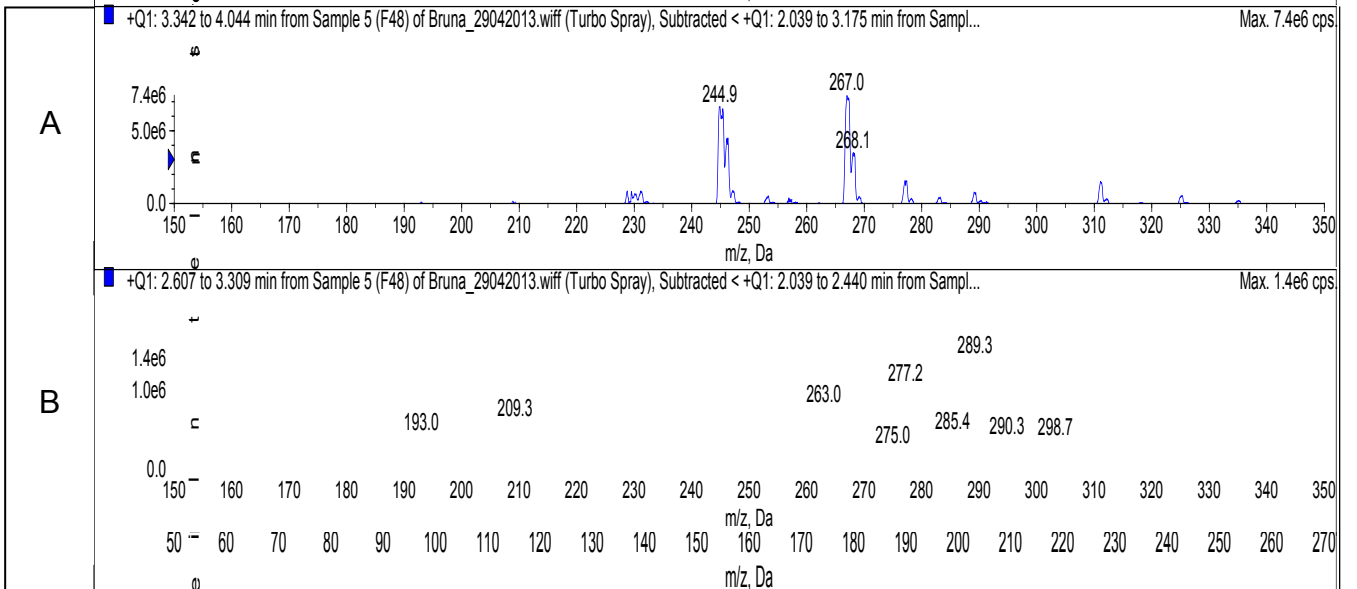
A substância **1a** (Figura 12, p. 62) foi detectada na fração F8 e sua estrutura foi sugerida com base na análise do espectro de massas, apresentando  $m/z$  245 e  $m/z$  267, correspondente ao peso molecular e ao aduto de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , respectivamente (Figura 13, p. 62). Segundo Flores e colaboradores trata-se de um epóxido (FLORES et al., 2007) e analisando sua estrutura foi possível sugerir que seja um precursor biossintético da via de formação da kavalactona **2**. A figura 14 (p. 63) mostra uma proposta de fragmentação para **1a**.



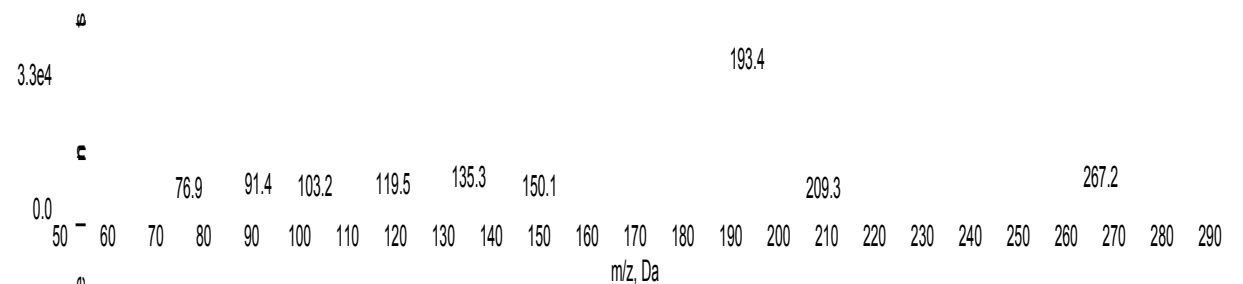
**Figura 12: Estrutura química da substância 1a**



Figuras



+MS2 (267.00) CE (30): Exp 4, 3.157 to 3.554 min from Sample 10 (F48\_MS2) of Bruna\_29042013.wiff (Turbo Spray) Max. 3.3e4 cps.



+MS2 (271.00) CE (30): Exp 5, 4.932 to 5.664 min from Sample 10 (F48\_MS2) of Bruna\_29042013.wiff (Turbo Spray) Max. 1.6e5 cps.

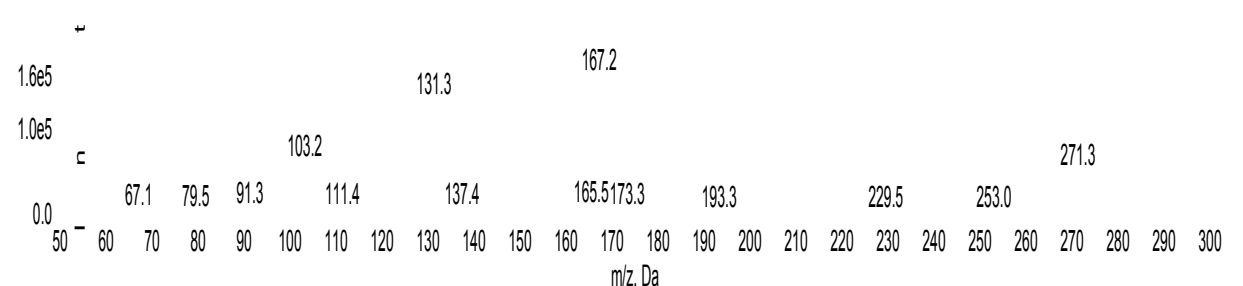
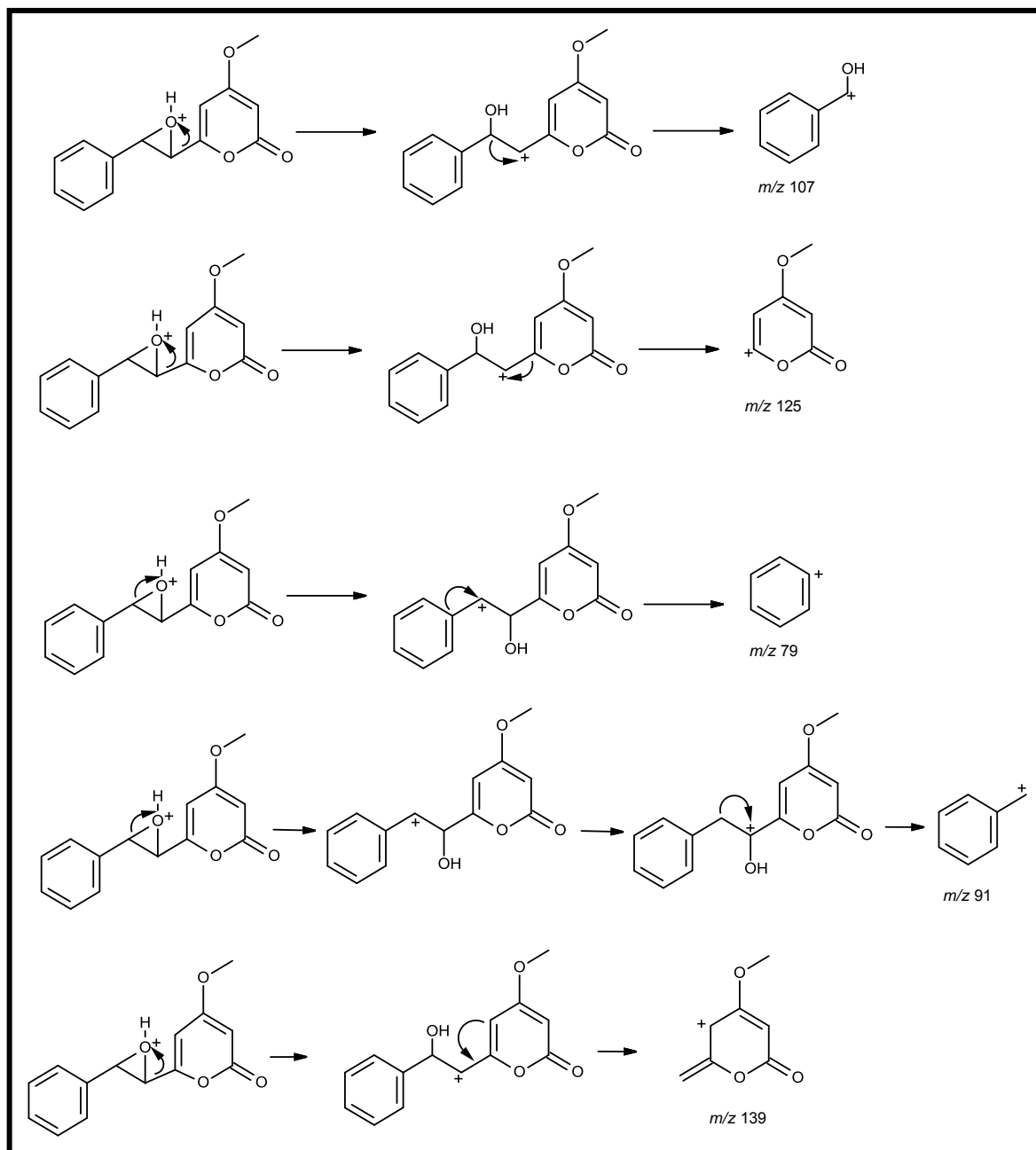


Figura 14: Proposta de fragmentação para 1a



Inúmeras técnicas cromatográficas foram empregadas na tentativa de isolar a substância 1a presente na fração F8. No entanto, dificuldades inerentes às características estruturais da mesma dificultou seu isolamento. É importante destacar que, além da presença do epóxido, a substância 1a pode ser considerada um intermediário para a formação da substância 2. Consequentemente, deve ser consumida para a produção da mesma.



Este composto foi isolado de *Piper rusbyi*, e apresentou moderada atividade leishmanicida (FLORES et al., 2007).

### 5.1.2.2. Derivados do ácido benzóico

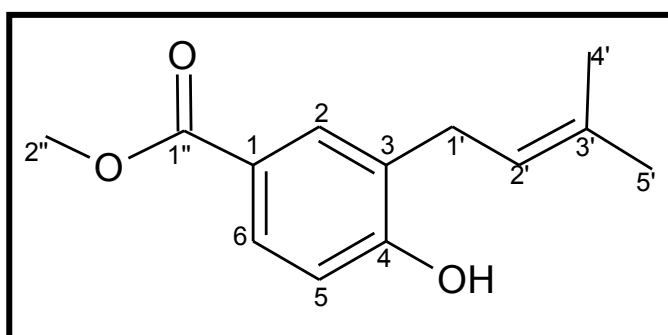
A substância **5**, pertencente à classe das cromanonas, e seus precursores, dois derivados do ácido benzóico **3** e **4** foram isoladas da fração  $\text{CHCl}_3$  de *Piper fuliginum* (Figura 8, p. 48).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectros 18-19, 28-29 e 37-38; p. 114-115, 124-125 e 133-134; Tabela 7, p. 69 e Tabela 8, p. 70) das substâncias **3-5** revelam sinais característicos de anel aromático trissubstituído. O sinal da metoxila em  $\delta$  3,8 (H-2'') também é característico desta classe de substâncias. O grupo prenila das substâncias **4** e **5** é bem caracterizado pelos hidrogênios com deslocamento químico em torno de  $\delta$  6,0 (H-2') ligado a carbono  $\text{sp}^2$ .

#### 5.1.2.2.1. Substância **3**

A substância **3** (Figura 15, p. 64) foi isolada da fração 5 após uma etapa cromatográfica em coluna de sílica seguido de separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

**Figura 15:** Estrutura química da substância **3**



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 18-19, p. 114-115; Tabela 7, p. 69) foi observado um simpleto em  $\delta$  3,82 (s; 3H) que foi atribuído a uma metoxila (H-2'') com a integração do sinal para três hidrogênios; um sinal em  $\delta$  3,31 (d,  $J = 7,5$  Hz; 2H), atribuído ao hidrogênio da posição H-1'; um sinal em  $\delta$  1,71 (s; 6H), integrando para seis hidrogênios, atribuído aos H-4' e H-5', caracterizando a existência de

duas metilas; um sinal em  $\delta$  5,25 (*m*; 1H), relativo a um hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  da posição H-2'. Todos esses dados indicam a existência de um grupo prenila nesta molécula. Observa-se também sinais em  $\delta$  7,73 (*d*,  $J = 2,5$ , 1H),  $\delta$  6,76 (*d*,  $J = 8,5$ , 1H) e  $\delta$  7,75 (*dd*,  $J = 8,5$ ; 2,5, 1H), caracterizando um sistema aromático trissubstituído.

No espectro de RMN  $^{13}C$  (Espectros 20-21, p. 116-117; Tabela 9, p. 70) foi observado um sinal em  $\delta$  51,8, característico de metoxila (C-2''); dois sinais em  $\delta$  25,7 e  $\delta$  17,9 característico das metilas nas posições C-4' e C-5', respectivamente; um sinal em  $\delta$  29,3, atribuído a carbono metilênico C-1'. Foram observados também dois sinais característicos de carbono  $sp^2$ , atribuídos aos carbonos da ligação dupla do grupo prenila,  $\delta$  121,1 (C-2') e 135,0 (C-3'); seis sinais atribuídos aos carbonos do sistema aromático:  $\delta$  115,3, 122,3, 127,0, 129,5, 131,7 e 158,7. O sinal em  $\delta$  167,3, característicos de carbonila de éster foi atribuído ao carbono C-1''.

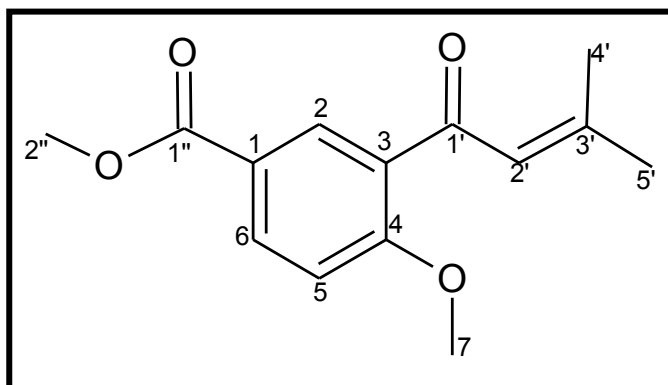
Estas hipóteses foram confirmadas após a análise das correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC, *g*HMBC e COSY (Espectros 22-27, p. 118-123). O mapa de contorno *g*HMBC mostrou a posição da carbonila C-1'' ( $\delta$  167,3), pela correlação com os sinais em  $\delta$  3,83 referente aos hidrogênios da metoxila C-2'' e  $\delta$  7,75, referente ao hidrogênio aromático H-6. A presença do grupo prenila foi confirmada pela correlação do sinal  $\delta$  121,2 do carbono C-2' com os sinais  $\delta$  1,76 referente aos hidrogênios metílicos H-4' e H-5' e com os hidrogênios metilênicos H-1' ( $\delta$  3,39). Além disso, este experimento também mostra a correlação deste hidrogênio em  $\delta$  3,39 com os carbonos C-3 ( $\delta$  127,4) e C-4 ( $\delta$  158,7), e do carbono C-4 com o hidrogênio aromático H-5 ( $\delta$  6,75).

Esta substância é um derivado prenilado do ácido benzóico, isolada anteriormente de *Piper guanacastensis* (MIRANDA et al., 1996), *P. glabratum*, *P. acutifolium* (FLORES et al., 2008) e *P. aduncum* (OLIVEIRA, et al., 2005). Em *Piper guanacastensis* este composto é majoritário sendo conhecido por sua atividade inseticida contra *Aedes atropalpus* (MIRANDA et al., 1996). Em *P. fuligineum* está sendo descrito pela primeira vez.

#### 5.1.2.2.2. Substância 4

A substância 4 (Figura 16, p. 66) foi isolada da fração 5 após uma etapa cromatográfica em coluna de sílica seguido de separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

**Figura 16:** Estrutura química da substância 4



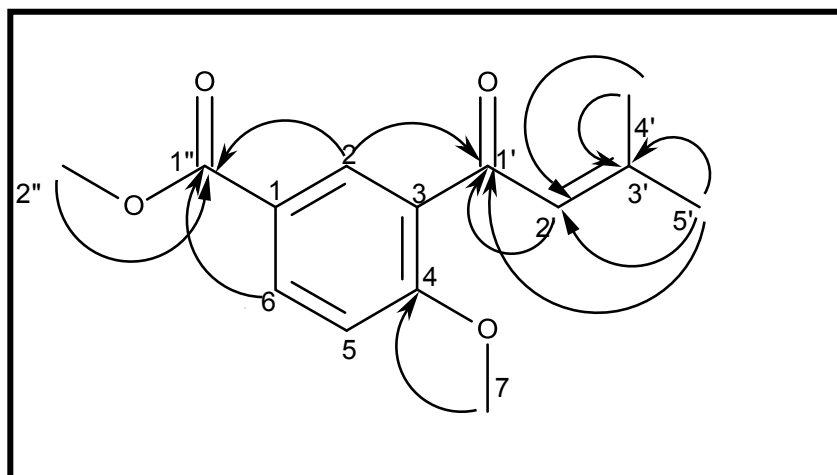
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 28-29, p. 124-125; Tabela 7, p. 69) foi observado sinais em  $\delta$  8,13 (*d*,  $J = 2,5$  Hz; 1H),  $\delta$  6,91 (*d*,  $J = 8,5$  Hz; 1H) e 8,02 (*dd*,  $J = 8,5$ ; 2,5 Hz; 1H), caracterizando um sistema aromático trissubstituído. Observa-se também um simpleto em  $\delta$  3,87 (*s*; 3H) atribuído à metoxila em H-7, e um simpleto em  $\delta$  3,82 (*s*; 3H) atribuído à metila do grupo éster (H-2''). Sinais em  $\delta$  1,90 (*d*,  $J = 1,0$  Hz; 3H) e  $\delta$  2,16 (*d*,  $J = 1,0$  Hz; 3H), foram atribuídos aos grupos metílicos em H-4' e H-5' e um sinal em  $\delta$  6,49 (*m*; 1H), característico de um hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$  foi atribuído à H-2'. Esses dados indicaram a existência de um grupo prenila nesta molécula.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 30-31, p. 126-127; Tabela 9, p. 70) foi observado um sinal em  $\delta$  192,3, característico de cetona atribuído a carbonila C-1'; dois sinais em  $\delta$  21,7 e  $\delta$  28,4 característicos de grupos metílicos ligados a carbono  $\text{sp}^2$ , que foram atribuídos à C-4' e C-5'. Foram observados também dois sinais característicos de carbono  $\text{sp}^2$ ,  $\delta$  125,2 e 156,8, atribuídos aos carbonos C-2' e C-3' da ligação dupla do grupo prenila. Os sinais em  $\delta$  56,3 e  $\delta$  52,3 foram atribuídos aos C-7 e C-2'', respectivamente. O sinal em  $\delta$  166,7 é característico de carboxila de éster e foi atribuído ao carbono C-1''. Seis sinais foram atribuídos ao sistema aromático:  $\delta$  123,06,  $\delta$  161,3,  $\delta$  111,6,  $\delta$  134,2,  $\delta$  131,3 e 132,1 referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6, respectivamente. Estas hipóteses foram

confirmadas após a análise das correlações observadas nos mapas de contorno gHMQC, gHMBC e COSY (Espectros 32-36, p. 128-132).

Os mapas de contorno gHMBC determinaram a posição da metila da posição H-2'' ( $\delta$  3,82) que mostra correlação com o sinal do carbono da carbonila C1'' ( $\delta$  166,7). O sinal do H-7 ( $\delta$  3,87) apresenta correlação com o carbono em  $\delta$  161,3, fixando este substituinte na posição 4 do anel aromático. Este experimento também comprovou a presença do grupo prenila com a correlação dos hidrogênios H-4' e H-5' com deslocamentos em  $\delta$  1,90 e 2,16, respectivamente com o sinal em  $\delta$  125,2 do carbono C-2' (Figura 17, p. 67).

**Figura 17:** Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC da substância 4.



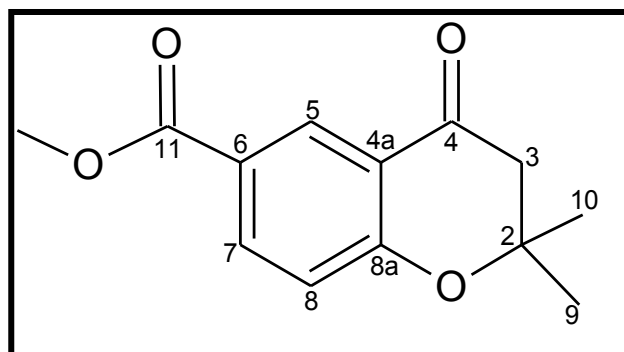
Esta substância foi identificada como um éster benzoico prenulado, inédito como produto natural, porém já foi sintetizada com algumas modificações químicas a partir de uma molécula extraída de *Piper toboganum*. Segundo estudos, a substância sintetizada apresentou potente atividade contra tumores broncopulmonares, inibindo a proliferação de células tumorais (CARBONNELLE, et al.; 2001).

#### 5.1.2.2.3. Substância 5

A substância 5 (Figura 18, p. 68), foi identificada como sendo uma cromanona. Existem poucos relatos na literatura da presença desta classe em

espécies de *Piper*, sendo descrita apenas em *Piper gaudichaudianum*, *P. taboganum*, *P. Obliquum* e *Piper dilatatum* (ROUSSIS et al., 1990; TERREAUX, et al., 1998; TEIXEIRA, 2003; VALDIVIA et al., 2008).

**Figura 18:** Estrutura química da substância 5



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectros 37-38, p. 133-134; Tabela 8, p. 70) apresenta três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, sendo um sinal em  $\delta$  8,49 (*d*,  $J = 2,0$  Hz; 1H) referente ao H-5; um sinal em  $\delta$  8,07 (*dd*,  $J = 2,0$  e 8,5 Hz; 1H) referente ao H-7 e um sinal em  $\delta$  6,91 (*d*,  $J = 8,5$  Hz; 1H) correspondente ao hidrogênio H-8. O simpleto em  $\delta$  2,69 (*s*; 2H) foi atribuído aos hidrogênios do grupo metilênico H-3. O outro simpleto em  $\delta$  1,41 (*s*; 6H) foi atribuído aos hidrogênios das metilas ligadas na posição 9 e 10; o sinal em  $\delta$  3,83 (*s*; 3H) foi atribuído ao hidrogênio do grupo metílico (éster).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 39-40, p. 135-136; Tabela 10, p. 71) são observados sinais em  $\delta$  129,3,  $\delta$  137,1 e 118,9 que foram atribuídos aos carbonos  $\text{sp}^2$  do anel aromático. O sinal em  $\delta$  123,30 foi atribuído ao C-4a; o sinal em  $\delta$  119,9 foi atribuído ao C-6; e o sinal em  $\delta$  163,5 ao C-8a. Foi também observado um sinal em  $\delta$  191,8, atribuído a uma carbonila na posição C-4 e um sinal em  $\delta$  80,5 correspondente ao carbono C-2. O sinal em  $\delta$  49,0 foi atribuído ao grupo metilênico C-3. Em  $\delta$  166,4 foi observado sinal corresponde à outra carboxila em C-11, e em  $\delta$  52,4 o sinal foi atribuído a metoxila. O deslocamento químico para as metilas em C-10 e C-9 foi observado em  $\delta$  26,9.

Todas as atribuições foram confirmadas através da análise dos sinais dos mapas de contorno *g*HSQC, *g*HMBC e COSY (Espectros 41-44, p. 137-142). Os

mapas de contorno *g*HMBC confirma a posição da carbonila C-4, em  $\delta$  191,5, que mostra correlação com o hidrogênio aromático H-5 ( $\delta$  8,49) e com o hidrogênio da posição H-3 ( $\delta$  2,69). Além disso, observamos a correlação do carbono na posição C-8a ( $\delta$  163,2) com o hidrogênio aromático H-8 ( $\delta$  6,91) e do carbono C-2 ( $\delta$  80,2) com os hidrogênios metílicos H-9 e H-10 ( $\delta$  1,41) e com o hidrogênio da posição H-3 ( $\delta$  2,69). Este experimento mostra também a correlação da carboxila C-11 ( $\delta$  166,1) com os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,83.

Esta substância foi isolada anteriormente de *Piper gaudichaudianum*, *Piper taboganum* e *Piper dilatatum* (ROUSSIS et al, 1990; TERREAUX et al., 1998; TEIXEIRA 2003). Em *Piper dilatatum* o composto isolado apresentou atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* (TERREAUX et al., 1998). Em *Piper fuliginum* está sendo descrita pela primeira vez.

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **3-4**

Posição	<b>3</b> $\delta_{\text{H}}$ ( mult; J/Hz)	<b>4</b> $\delta_{\text{H}}$ ( mult; J/Hz)
1	-	-
2	7,73 ( <i>d</i> ; 2,5)	8,13 ( <i>d</i> ; 2,5)
3	-	-
4	-	-
5	6,76 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,91 ( <i>d</i> ; 8,5)
6	7,76 ( <i>dd</i> ; 8,5; 2,5)	8,02 ( <i>dd</i> ; 8,5 e 2,5)
7	-	3,85
1'	3,33 ( <i>d</i> ; 7,5)	-
2'	5,25 ( <i>m</i> )	6,49 ( <i>m</i> )
3'	-	-
4'	1,71 ( <i>s</i> )	1,90 ( <i>d</i> ; 1,0)
5'	1,71 ( <i>s</i> )	2,16 ( <i>d</i> ; 1,0)
1''	-	-
2''	3,82 ( <i>s</i> )	3,82 ( <i>s</i> )

**Tabela 8:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **5**

Posição	<b>5</b> $\delta_{\text{H}}$ ( mult; J/Hz)
2	-
3	2,69 (s)
4	-
4a	-
5	8,49 (d; 2,0)
6	-
7	8,07 (dd; 2,0 e 8,5)
8	6,90 (d; 8,5)
8a	-
9	1,41 (s)
10	1,41 (s)
$\text{OCH}_3$	3,83 (s)

**Tabela 9:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **3-4**

Posição	<b>3</b> $\delta_{\text{C}}$	<b>4</b> $\delta_{\text{C}}$
1	122,3	123,0
2	131,8	161,3
3	127,1	111,6
4	158,7	134,2
5	115,4	131,3
6	129,6	132,1
7	-	56,3
1'	29,3	192,3
2'	121,2	125,8
3'	135,0	156,8
4'	25,7	21,7
5'	17,9	28,4
1''	167,3	166,7
2''	51,8	52,3

**Tabela 10:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **5**

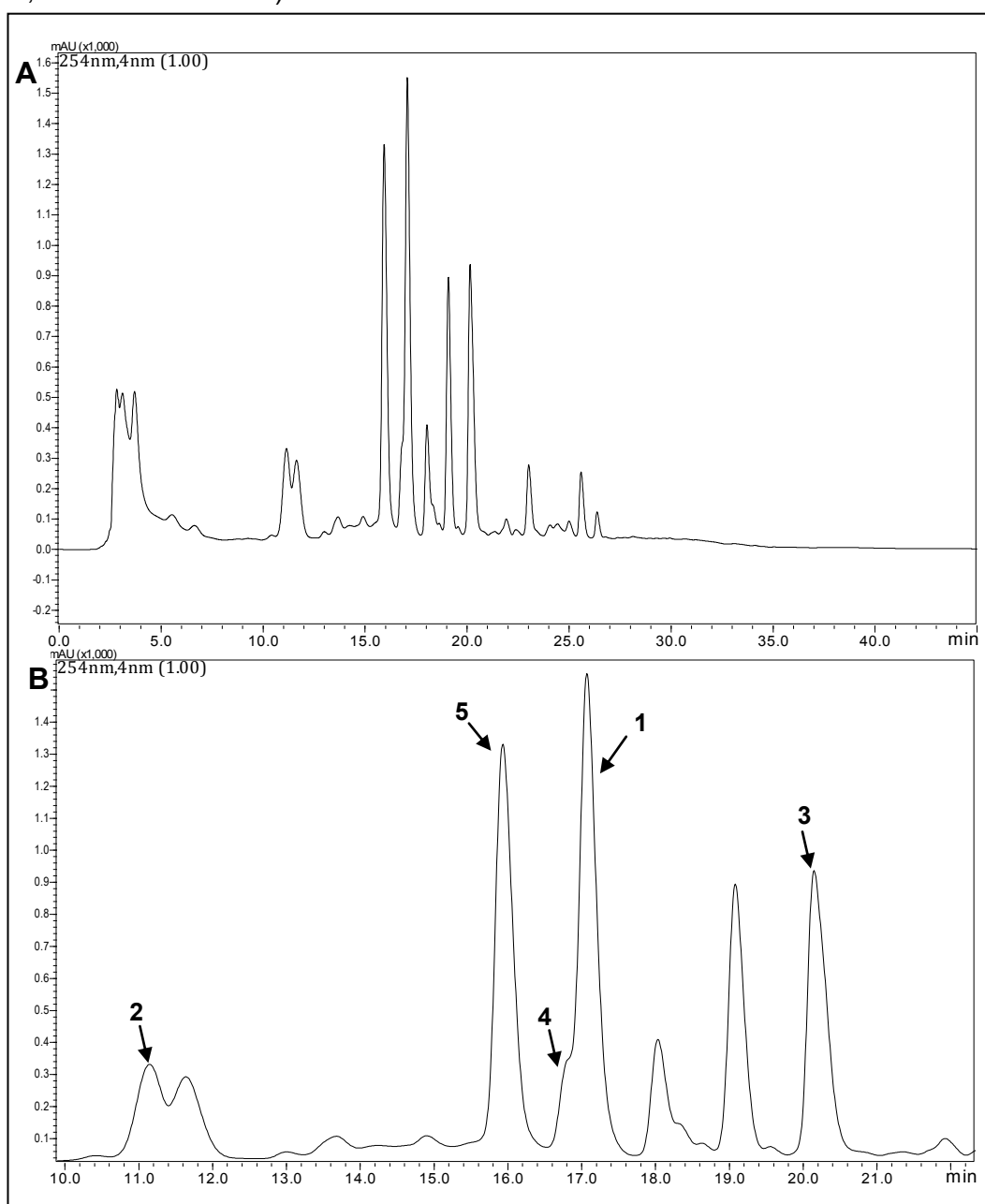
Posição	<b>5</b> $\delta_{\text{C}}$
2	80,5
3	49,0
4	191,8
4a	118,9
5	129,3
6	119,9
7	118,9
8	137,1
8a	163,5
9	26,9
10	26,9
11	166,4
$\text{OCH}_3$	52,4



## 5.2. Análise do perfil cromatográfico do extrato EtOH das folhas de *Piper fuliginum*

As substâncias isoladas de *Piper fuliginum* foram identificadas nos cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas coletadas em 2006, por comparação com os tempos de retenção dos padrões isolados e analisados nas mesmas condições cromatográficas (Figura 19, p. 72, Tabela 11, p. 73).

**Figura 19:** A – Cromatograma do extrato etanólico das partes aéreas de *Piper fuliginum* coletadas em 2006. B – Ampliação com identificação das substâncias isoladas (1-5). (Condições de análise: 50% MeOH → 100% MeOH em 30 min e mais 10 min em 100% de MeOH, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>).



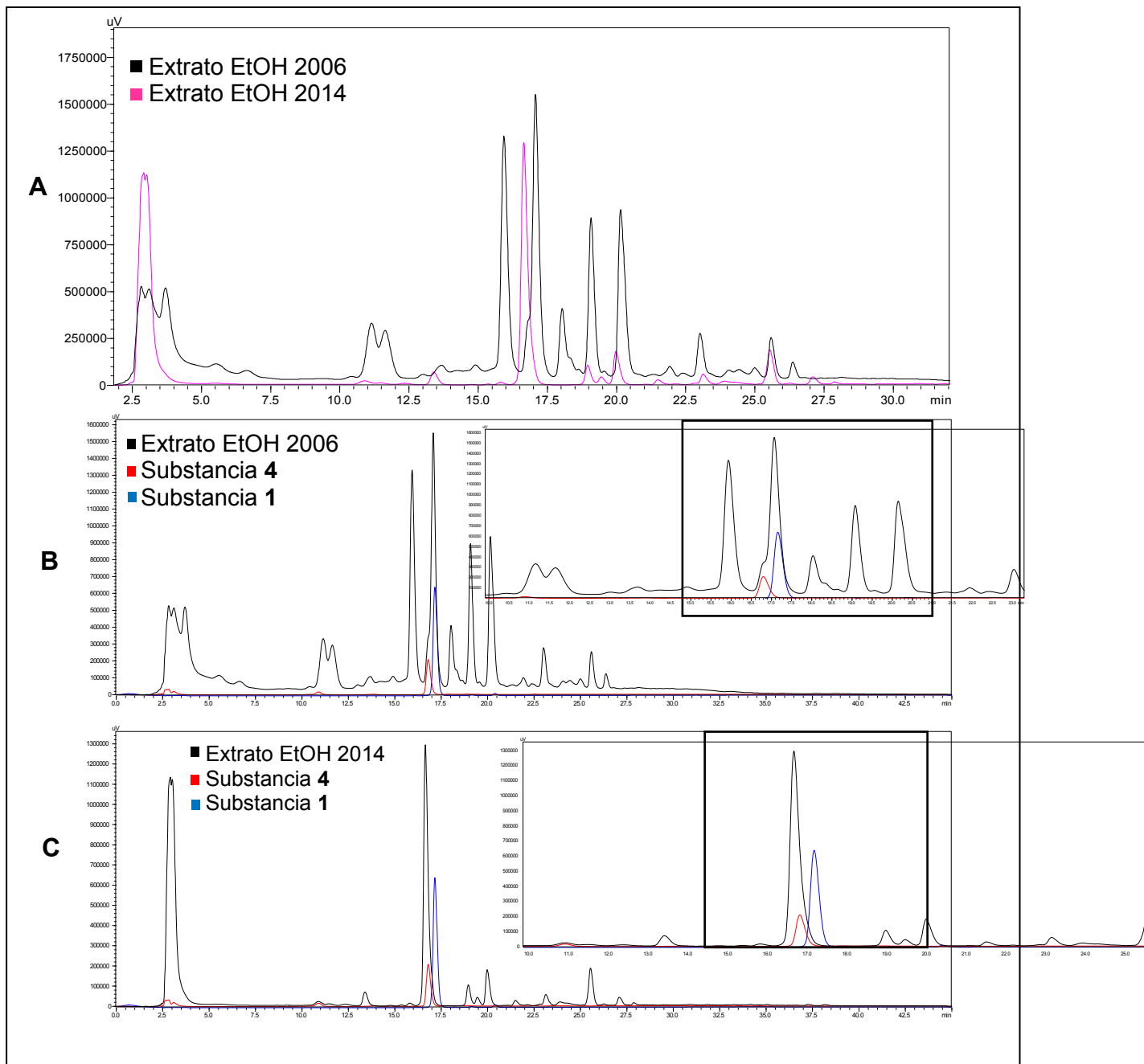
**Tabela 11:** Tempo de retenção das substâncias isoladas de *P. fuliginum*.

<b>Substância</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>1</b>	17,1
<b>2</b>	11,2
<b>3</b>	20,2
<b>4</b>	16,8
<b>5</b>	16,0

Os estudos iniciais de *Piper fuliginum* indicaram uma variação no acúmulo de substâncias, sugerindo maior diversidade de metabólitos no extrato bruto das folhas coletadas em 2006. É possível observar no cromatograma, a presença das substâncias **1-5** no extrato preparado a partir do material vegetal coletado no ano de 2006 (Figura 20, p. 74), porém, no extrato feito com folhas coletadas em 2014, as análises por CLAE mostraram o acúmulo majoritário de **4** (Figura 20C, p. 74). Vale ressaltar que foi realizada uma análise do perfil cromatográfico do extrato etanólico obtido das folhas coletadas em 2010. O mesmo apresentou perfil químico semelhante ao extrato obtido em 2006. Esses dados sugerem que rotas biossintéticas foram desviadas para grande produção do derivado de ácido benzoico prenilado **4** no último período analisado, provavelmente por necessidade de proteção e/ou adaptação da espécie.

Para compreensão da dicotomia quanto à biossíntese das diferentes classes de metabólitos secundários serão necessários estudos adicionais, principalmente relacionados à identificação do perfil metabólico, gerenciado por análises ecofisiológicas, incluindo sazonal e circadiana.

**Figura 20:** A – Cromatograma obtido do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2006, comparado com o mesmo extrato obtido em 2014. B – Cromatograma do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2006, comparado com as substâncias **1** e **4**. C – Cromatograma do extrato etanólico de *P. fuliginum*, em 2014, comparado com as substâncias **1** e **4**. (Condições de análise: 50% MeOH → 100% MeOH em 30 min., fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna C-18 Phenomenex)



### 5.3. Atividades biológicas

#### 5.3.1. Avaliação da atividade antifúngica

O extrato acetato de etila, a fração clorofórmica e a substância **1**, obtidos de *P. fuliginum* foram avaliados frente aos fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e a levedura *Cryptococcus neoformans*.

A Tabela 12 (p. 75) indica a concentração inibitória mínima (CIM) da substância **1**, extrato ActOEt, fração CHCl<sub>3</sub> e o controle positivo anfotericina B. Comparando os compostos analisados com o controle positivo, conclui-se que o extrato ActOEt possui forte atividade contra *Candida tropicalis* e a fração clorofórmica também apresentou forte atividade contra o fungo *C. albicans*. Os extratos e frações que apresentarem uma CIM menor que 75µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250µg/mL, fraca e maior que 250µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

**Tabela 12:** Resultado do ensaio antifúngico frente a diferentes patógenos humanos.

CIM (µg/mL)					
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>
Substância <b>1</b>	>250	>250	>250	>250	>250
Extrato ActOEt	250	125	62,50	125	125
Fração CHCl <sub>3</sub>	125	62,50	250	125	125
Anfotericina B	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00

#### 5.3.2. Avaliação da atividade tripanocida

O extrato etanólico e as frações obtidas das folhas de *P. fuliginum* foram submetidas à avaliação do potencial tripanocida frente às formas epimastigotas, com o objetivo de determinar as frações mais ativas. Os extratos etanólicos das folhas mostrou potente atividade tripanocida (IC<sub>50</sub> = 26,67 µg/mL). A bioatividade inerente ao extrato das folhas foi mantida na partição clorofórmica (Tabela 13, p. 76).

**Tabela 13:** Atividade tripanocida do extrato etanólico das folhas e frações de *Piper fuliginum* frente à forma epimastigota de *T. cruzi*.

Amostras testadas	Concentração (mg/mL)							IC <sub>50</sub> (mg/mL)
	100	50	25	10	5	2,5	1,0	
Benznidazol (Controle positivo)								11,11
Extrato etanolico das folhas	-	-	-	-	-	-	-	26,67
Fração Hexanica	73%	34%	s.a	s.a	s.a	s.a	s.a	69,01
Fração Cloroformica	100%	52%	s.a	s.a	s.a	s.a	s.a	48,19
Fração Acetato	s.a	s.a	s.a	s.a	s.a	s.a	s.a	-

s.a. = sem atividade significativa

### 5.3.3. Avaliação da atividade antiviral

A substância **1** foi avaliada frente ao vírus da hepatite C. O ensaio foi realizado em duas etapas. A primeira etapa mostrou que o composto purificado inibiu significativamente a replicação do vírus subgenómico. Os níveis de expressão de proteínas também foram significativamente reduzidos na presença de **1**.

A segunda etapa do ensaio revelou que apesar da forte atividade observada anteriormente, na redução dos níveis de expressão de RNA e proteína, não foi possível estabelecer EC<sub>50</sub> para a substância **1**, pois a replicação é reduzida somente quando concentrações citotóxicas são utilizados.

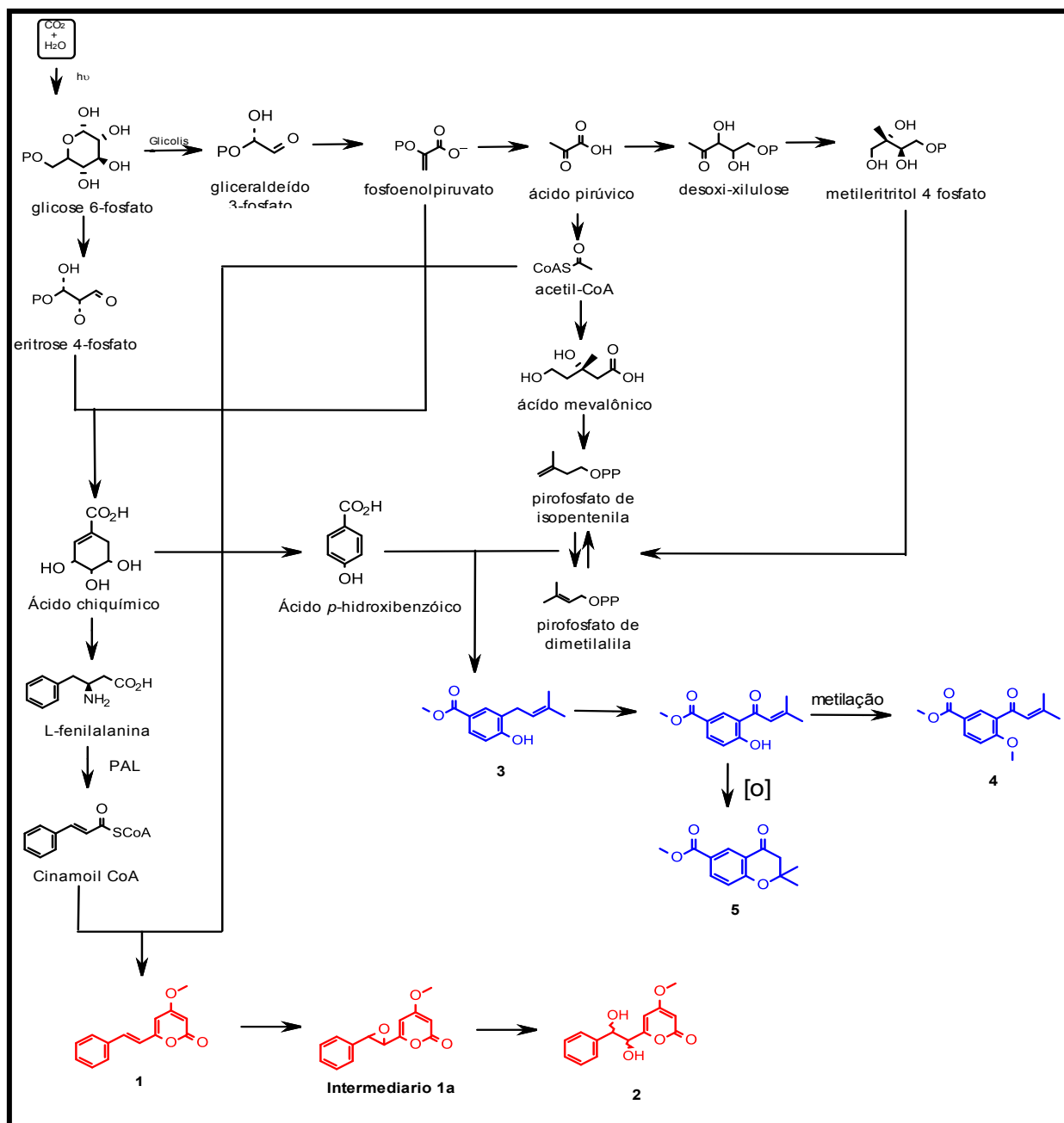
Em resumo, a kavalactona **1** apresentou uma moderada atividade frente ao vírus da hepatite C. Estes dados estão descritos em um recente artigo submetido ao periódico *Antiviral Research*, e está em fase de análise.

### 5.4. Estudos biossintéticos de *Piper fuliginum*

Substâncias fenólicas podem derivar do ácido chiquímico que é o principal precursor de aminoácidos aromáticos. Os fenilpropanóides são derivados do aminoácido fenilalanina que dá origem a diversas classes de substâncias incluindo lignanas, ligninas, cumarinas, estilbenos, flavonóides, xantonas, ésteres fenólicos e amidas. Entretanto, em uma etapa anterior a formação dos fenilpropanóides, o ácido chiquímico pode formar o ácido *p*-hidroxibenzóico, que por sua vez origina

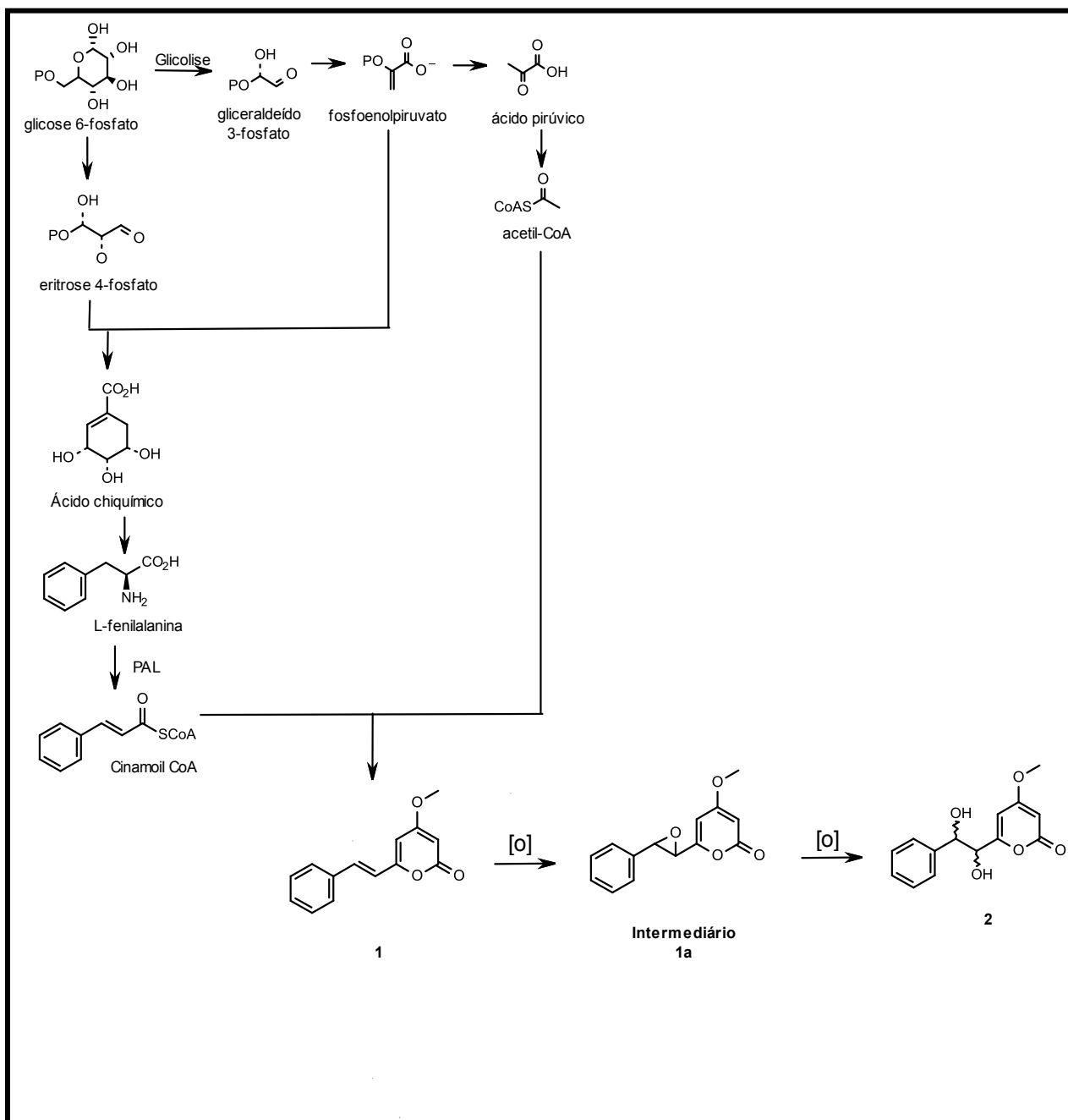
substâncias derivadas do ácido benzóico, como a substância **4**, a cromanona **5** e seu precursor **3**. Estas substâncias apresentam rota biossintética com etapas chave de oxidação na unidade isoprênica anterior a ciclização e formação de **5** (Figura 21, p. 77).

**Figura 21:** Proposta biossintética para as substâncias identificadas em *P. fuligineum* Kunth



A biogênese inicial proposta no estudo das kavalactonas seria de uma via mista com acoplamento entre uma unidade  $C_6C_3$  da via fenilpropanoídica com uma unidade de acetatoacetil-CoA da via do acetato, que após sucessivas oxidações e ciclizações enzimáticas levam a **1**, **1a** e **2**. (Figura 22, p. 78).

**Figura 22:** Proposta biossintéticas das kavalactonas identificadas em *P. fuligineum* Kunth



#### 5.4.1. Ensaio enzimáticos

A espécie *Piper fuliginum* mostra o acúmulo de kavalactonas. Para avaliar a participação da via fenilpropanoídica na rota biossintética das kavalactonas isoladas de *P. fuliginum*, foi realizado um experimento baseado na incubação da *L*-fenilalanina em extratos enzimáticos enriquecidos com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL).

O uso de tampão extrator adequado ao processo de extração enzimática é muito importante, pois em uma reação enzimática hidrogênios podem ser consumidos ou liberados, o que pode afetar os processos bioquímicos, sendo importante manter o pH estável (JOHNSON, 1971). No caso da enzima PAL, o tampão extrator foi escolhido com base em dados disponíveis na literatura, que extraem esta enzima de espécies vegetais quanto de microorganismos utilizando tampão borato (pH = 8,8 - 9,2) (CUNHA et al. 1996; FRITZ 1976). O tampão utilizado na homogeneização de tecidos de plantas deve conter altas concentrações de agentes redutores, inativadores de polifenóis e inibidores de proteases (GEGENHEIMER, 1990). Os processos de oxidação foram inibidos pela adição de DTT, um potente agente oxidante que inibe a ação das enzimas fenol oxidases. Os compostos fenólicos que estão presentes nas células vegetais podem inibir a atividade da PAL, pois tem a capacidade de formar ligação de hidrogênio com o oxigênio da ligação peptídica.

Tais compostos são removidos do extrato bruto pela complexação com polivinilpolipirrolidona (PVPP) ou pela adição de agentes redutores fortes para a inativação das enzimas fenol oxidases (GEGENHEIMER, 1990).

Outro fator que prejudica a estabilidade da enzima é a presença de metais pesados, pois podem promover a oxidação dos grupos tióis pelo oxigênio molecular, e/ou podem formar complexos com grupos específicos da enzima. O uso de agentes quelantes remove os metais pesados presentes, sendo o EDTA mais utilizado. No entanto, o que mais prejudica a estabilidade da proteína durante o procedimento de extração é a presença de proteases. Por esse motivo foi adotado o procedimento mais simples para evitar a degradação proteolítica, fazendo a extração em baixas temperaturas. Existem outros inibidores de proteases que podem ser adicionados ao tampão extrator, porém são caros e em

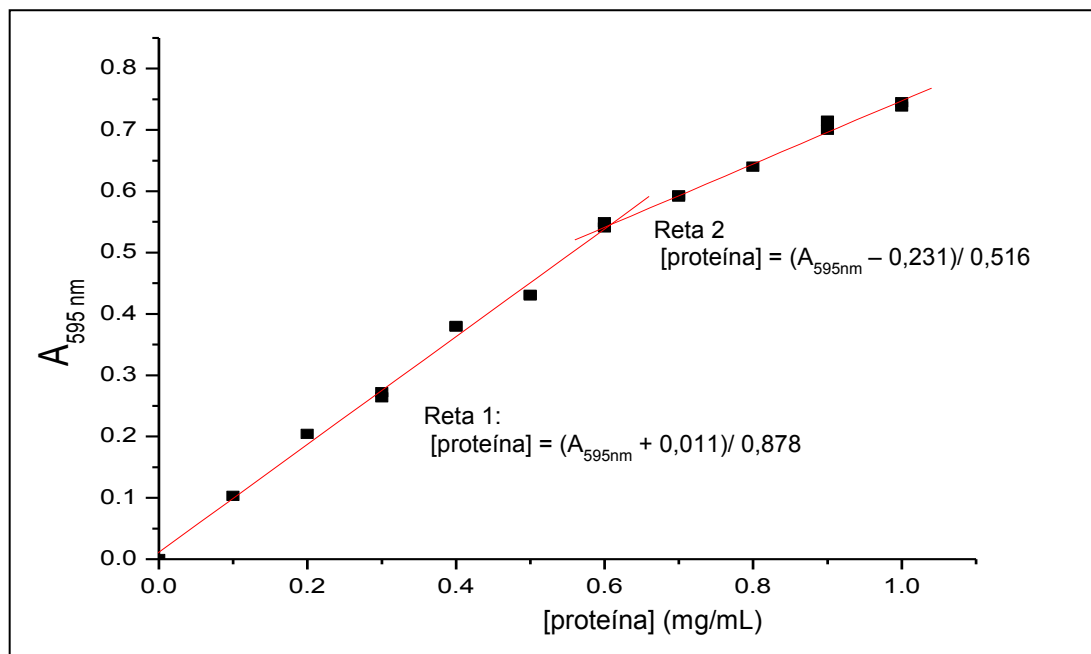


muitos casos, tóxicos (JANSON E RYDÉN, 1989). Neste procedimento não foi usado este tipo de inibidor de protease.

O processo de clarificação do extrato foi realizado com uma centrifugação a 16.300 x g por trinta minutos. A etapa de centrifugação é utilizada para retirar dos extratos restos celulares, tais como: partes das membranas, organelas e enzimas insolúveis na solução tampão extratora.

A precipitação salina foi utilizada como técnica para a concentração da PAL, uma vez que a solubilidade desta proteína está relacionada à distribuição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da molécula. Desta maneira, proteínas diferentes respondem de modo distinto a agentes precipitantes, se configurando, com isso, em misturas complexas de proteínas. Foram obtidas as frações de 0 a 25%, de 25 a 55%, de 55 a 85% de saturação, sendo que esses valores foram escolhidos com base em trabalhos de purificação da PAL de outras espécies vegetais e microorganismos. Estes trabalhos demonstraram que a PAL precipita quando a saturação alcançar entre 25 e 55% (CHEN et. al, 1988, HAO et al, 1996). A precipitação ocorre pela neutralização das cargas da superfície do sal pela redução da atividade química da enzima (SCOPES, 1987).

As frações obtidas na precipitação fracionada foram ressuspensas em 3 mL de solução tampão borato 0,1 M (pH 8,8). As concentrações proteicas do extrato e das frações foram determinadas pelo método de Bradford modificado. Optou-se por trabalhar com o método de Bradford modificado, no qual o reagente é preparado com ácido clorídrico, ao contrário do método tradicional, que é utilizado ácido fosfórico. Neste método, a impregnação do corante nas cubetas é menor do que no método tradicional, o que aumenta o tempo de vida útil das mesmas. A curva padrão foi obtida utilizando uma solução de albumina bovina (fração V) na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 23, p. 81). A leitura das absorbâncias de cada fração foi realizada adicionando-se um volume de 10 µL de solução. A Tabela 14 (p. 81) mostra a quantificação das proteínas nas amostras.

**Figura 23:** Curva analítica da albumina bovina (fração V).**Tabela 14:** Diferentes concentrações de proteína do extrato e das frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Amostras	A1	A2	Média A	[proteína]	Concentração (mg/mL)*
Bruto	0,312	0,350	0,0331	19,26	0,3924
0-25%	0,223	0,195	0,2090	11,44	1,1440
25-55%	0,500	0,497	0,4985	30,00	3,000
55-80%	0,244	0,279	0,2615	2,132	0,2132
Sobrenadante (80%)	0,031	0,032	0,0315	0	0

\*cálculo: conc. = ([proteína]\*50)/volume da amostra adicionada

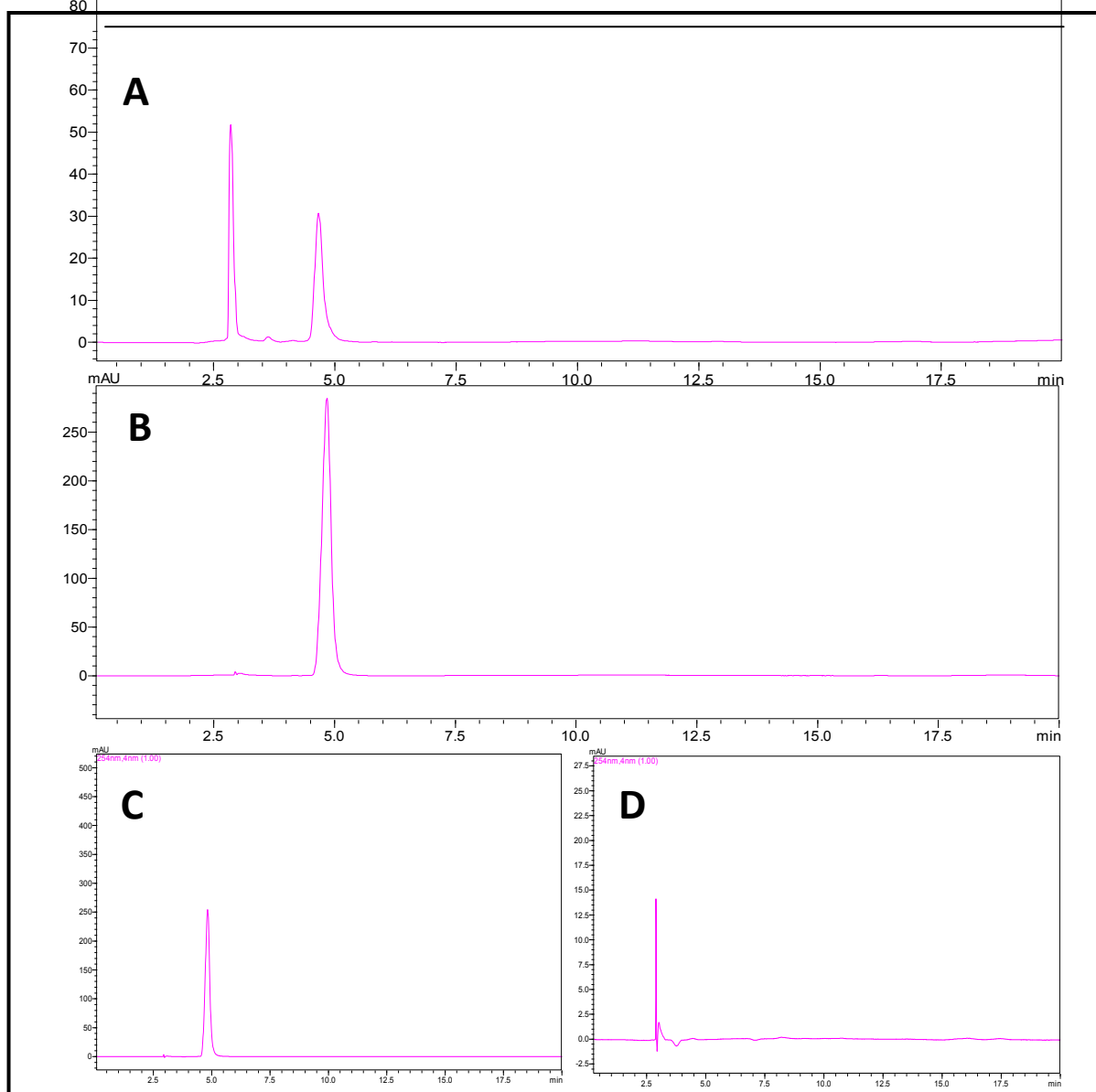
Após as diluições, os extratos e as frações obtidas foram incubadas com L-fenilalanina, para verificar a atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL). Após a incubação no intervalo de tempo de 1, 3 e 24 horas, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de HCl 6 M, centrifugada e analisada por CLAE.

A confirmação da atividade enzimática foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência analítica pelo aparecimento do pico correspondente ao ácido cinâmico em 2,9 minutos (Figura 24, p.82). A identificação do ácido cinâmico

foi realizada pela comparação entre o cromatograma da reação e o obtido pela injeção de solução de ácido cinâmico e de fenilalanina nas mesmas condições cromatográficas. Também foi analisado o branco da enzima, um ensaio realizado sem o extrato enzimático, apenas com a presença do substrato (Figura 24 B, p.82).

A atividade da enzima foi maior na fração 55-85% de saturação, com 24 horas de incubação. Em outras frações foi observada a mesma atividade enzimática.

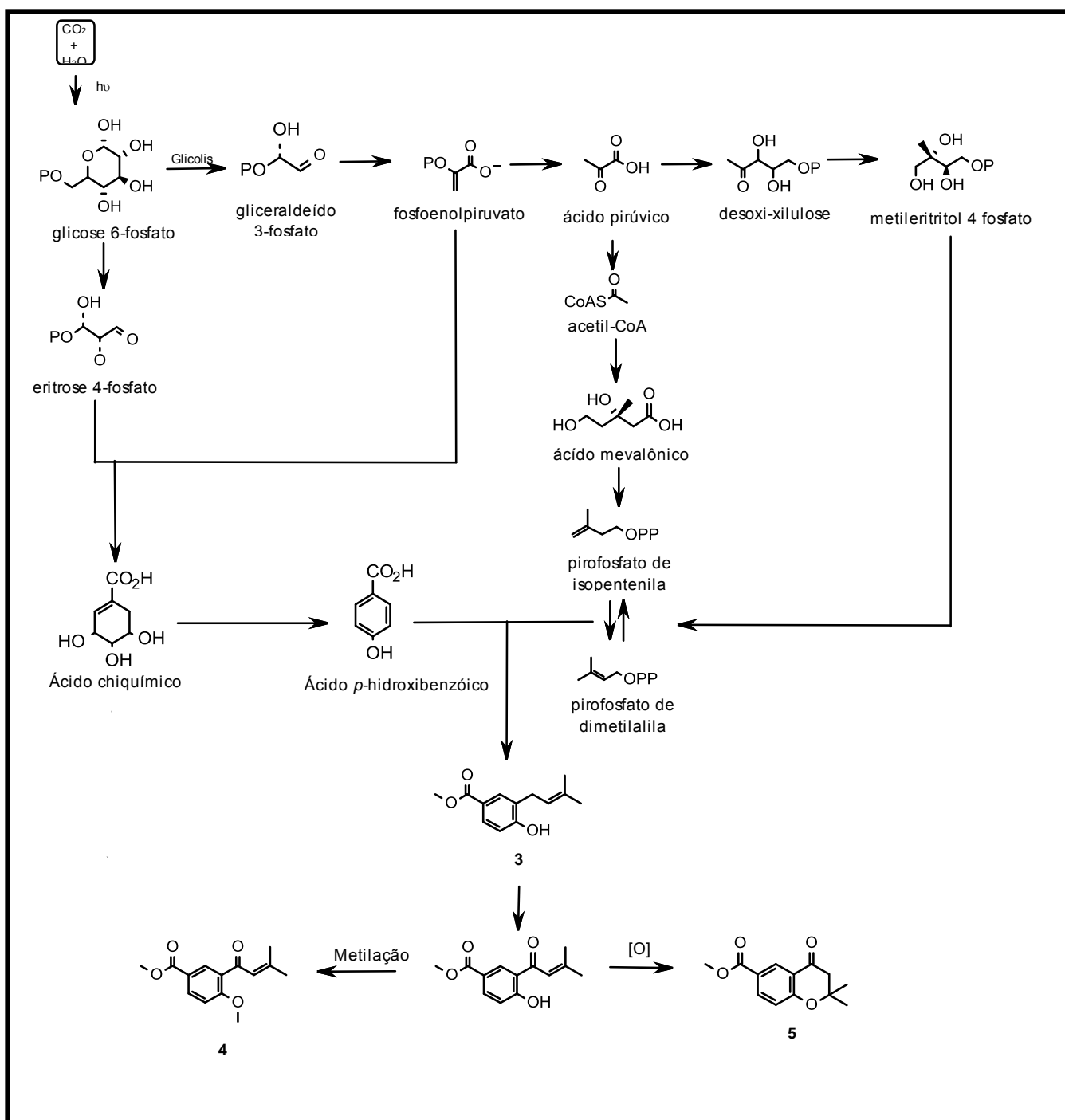
**Figura 24:** A – Cromatograma obtido após a incubação da fração 55-85% em 24 horas. B- Cromatograma do branco da enzima. C – Cromatograma do padrão fenilalanina nas mesmas condições experimentais. D - Cromatograma do padrão ácido cinâmico nas mesmas condições experimentais. (Condições de análise: MeOH:H<sub>2</sub>O (+ 0,1% de HAc) / 60:40 em 30 min., fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna supelcosil LC-18)



Os resultados obtidos da incorporação da *L*-fenilalanina nos extratos enzimáticos das folhas de *Piper fuliginum* mostraram a formação do ácido cinâmico e inferem que o mesmo pode estar envolvido na biossíntese das kavalactonas de *Piper fuliginum*, uma vez que os outros metabólitos isolados da espécie (Figura 8, p. 48) apresentam rota biossintética distinta da fenilpropanoídica, derivada do ácido benzóico e subseqüentes prenilações, intermediários das vias terpenoídicas, incluindo a via do mevalonato e/ou trioise piruvato (Figura 25, p. 85).

É importante destacar que as três classes de metabólitos secundários isolados de *P. fuliginum* apresentam etapas de oxidação determinantes que contribuem para a diversidade estrutural da espécie, como demonstrado na figura 21 (p. 77). Este estudo químico abre novas perspectivas para futuros estudos biossintéticos e a rota metabólica da cromanona deve ser investigada, principalmente, quanto a etapa de oxidação da unidade isoprênica, ou seja, se ocorre antes ou após a ciclização para dar origem ao anel pirano. Baseado nas substâncias isoladas, foi possível propor que a etapa de oxidação ocorre inicialmente no precursor **3**, anterior a ação da enzima ciclase que originará **5** (Figura 25, p. 85).

**Figura 25:** Proposta biossintética da cromanona e dos derivados prenilados do ácido benzoico isolados de *P. fuligineum* Kunth



## CONCLUSÕES

O estudo químico das folhas de *Piper fuliginum* resultou no isolamento de cinco substâncias, entre as quais duas são kavalactonas, uma cromanona e dois derivados prenilados do ácido benzoico, precursores da cromanona, sendo um deles descrito pela primeira vez.

É importante destacar que a identificação dessas substâncias mostra que a espécie *P. fuliginum* descreve uma rica diversidade de rotas biossintéticas e que as kavalactonas apresentam uma sequência biossintética em que as etapas de oxidação da cadeia alifática são determinantes para sua diversidade estrutural. Essa observação é também corroborada pela proposta biossintética da cromanona **5** e os derivados prenilados do ácido benzóico **3** e **4**, que apresentam rota biossintética com etapas chave de oxidação na unidade isoprênica anterior a ciclização e formação da cromanona **5**.

O extrato acetato de etila, a fração clorofórmica e a substância **1** foram submetidas a avaliação da atividade antifúngica. O extrato apresentou forte atividade frente ao fungo *Candida tropicalis* e moderada atividade frente aos fungos *C. krusei*, *C. parapsilosis* e a levedura *Cryptococcus neoformans*, enquanto a fração clorofórmica apresentou forte atividade frente ao fungo *C. krusei*, e moderada atividade frente aos fungos *C. albicans*, *C. parapsilosis* e a levedura *C. neoformans*. Foram realizados ensaios para a avaliação da atividade antiviral contra o vírus da hepatite C com a substância **1**, que apresentou moderada atividade. Estes dados estão descritos em um manuscrito submetido ao periódico "Antiviral Research", e está em fase de análise. O extrato etanólico e as frações foram submetidos ao ensaio tripanocida, sendo que todos apresentaram moderada atividade. O extrato etanólico das folhas de *P. fuliginem* foram os que mostraram melhores resultados, apresentando  $IC_{50}$  de  $26,67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , considerado bom, quando comparado com o controle positivo, benznidazol, com  $IC_{50}$  de  $11,11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Foi possível observar que esta espécie apresenta substâncias da classe das kavalactonas. Para determinar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), enzima envolvida na primeira etapa da biossíntese destas classes de substâncias foram realizados experimentos baseados na incubação da fenilalanina

em extratos enzimáticos enriquecidos com a enzima fenilalanina amônia liase. A PAL foi extraída das folhas utilizando tampão borato. A incubação do extrato enzimático obtido com fenilalanina levou a formação do ácido cinâmico. Os resultados mostraram que a fração com 55-85% de saturação em 24 horas de incubação teve a maior atividade enzimática.

A análise dos extratos obtidos das raízes de *P. fuligineum* em diferentes períodos mostrou que a biossíntese dos diferentes metabólitos secundários presentes na espécie segue a via do chiquimato e que em determinados períodos pode favorecer a rota dos fenilpropanóides e do ácido *p*-hidroxibenzoico dando origem a uma diversidade química maior, ou, mostra controle enzimático favorecendo a biossíntese de compostos derivados do ácido *p*-hidroxibenzoico, especialmente **4**.

A variedade de metabólitos secundários encontrados na espécie vegetal estudada e as atividades biológicas apresentadas mostraram a importância da ampliação do estudo químico e biológico de *Piper fuligineum*, que é pouco explorada em relação às outras espécies do gênero.

## REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, Y. H.; KŁADNAC, A.; KRUKD, I. Radical scavenging ability of some compounds isolated from *Piper cubeba* towards free radicals. **Luminescence**, v. 26, n. 3, p. 202-207, 2011.

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**, v. 91, n. 2/3, p. 215-218, 2004.

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**, v. 125, n. 2, p. 257-264, 2009.

BACKHAUB, C.; KRIEGLSTEIN, J. Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. **European Journal of Pharmacology**, v. 215, n. 2/3, p. 265-269, 1992.

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

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.

BAO, N.; OCHIR, S.; SUN, Z.; BORJIHAN, G.; YAMAGISHI, T. Occurrence of piperidine alkaloids in *Piper* species collected in different areas. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, p. 211-214, 2014.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.

BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. Chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

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



BURCI, L. M.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; RODRIGUES, R. V.; FACUNDO, V. A.; MILITÃO, J. S. L. T.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 165-174, 2013.

CAMPOS, M. P.; CECHINEL FILHO, V.; SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CRUZ, R. C. B.; CRUZ, A. B. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1527-1530, 2005.

CARBONNELLE, D.; JACQUOT, C.; LANCO, X.; LE DEZ, G.; TOMASONI, C.; BRIAND, G.; TSOTINIS, A.; CALOGEROPOULOU, T.; ROUSSAKIS, C. Up-regulation of a novel mrna (ny-co-1) involved in the methyl 4-methoxy-3-(3-methyl-2-butenoyl) benzoate (vt1)-induced proliferation arrest of a non-small-cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6). **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 388-397, 2001.

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 Yanessa (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

CHEN, R. Y.; CHANG, T. C.; LIU, M. S. Phenylalanine ammonia-lyase of bamboo shoots. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2137-2142, 1988.

CHEN, S.; HUANG, H. Y.; CHENG, M. J.; WU, C. C.; ISHIKAWA, T.; PENG, C. F.; CHANG, H. S.; WANG, C. J.; WONG, S. L.; CHEN, I. S. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203-209, 2013.

CUNHA, G. B.; ATYANARAYAN, V.; NAIR, P. M. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 17-20, 1996.

DEWICK, P. M. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Nottingham: John Wiley & Sons, 2002. Cap. 2, p. 7-12.

DIAZ, L. E.; MUNOZ, D. R.; PRIETO, R. E.; CUERVO, S. A.; GONZALEZ, D. L.; GUZMAN, J. D.; BHAKTA, S. Antioxidant, antitubercular and cytotoxic activities of *Piper imperial*. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4142-4157, 2012.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. **Piper. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004. Cap.7.

ELVY, S. M. R.; FARIHAH, S.; FAIRUS, A.; AHMAD, N. S.; NORAZLINA, M.; IMA, N. S. *Piper Sarmentosum*: a new hope for the treatment of osteoporosis. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 14, p. 1675-1682, 2013.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors. In: DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, p. 285-300.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 44-450, 2008.

FELTENSTEIN, M. W. L.; LAMBDIN, C. M.; GANZERA, H.; RANJITH, W.; DHARMARATNE, N. P.; NANAYAKKARA, D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic properties of *Piper methysticum* extract samples and fractions in the chick social-separation-stress procedure. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 210-216, 2003.

FLORES, N.; CABRERA, G.; JIMÉNEZ, I. A.; PIÑERO, J.; GIMÉNEZ, A.; BOURDY, G.; CORTÉS-SELVA, F.; BAZZOCCHI, I. L. Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. **Plant Medicinal**, v. 73, p. 206-211, 2007.

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-1543, 2008.

FRITZ, R. R.; HODGINS, D.; ABELL, C. W. Phenylalanine ammonia-lyase: induction and purification from yeast and clearance in mammals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 15, p. 4646-4650, 1976.

GEGENHEIMER, P. Preparation of extracts from plants. In: DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, p. 174-193.

GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

HAO, Z.; CHARLES, D. J.; YU, L.; SIMOM, J. E. Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 4, p. 735-739, 1996.

HASHIMOTO, T.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; YAMADA, H.; KOHNO, T.; ASAKAWA, Y. Isolation and synthesis of TNF- $\alpha$  release inhibitors from Fijian kava (*Piper methysticum*). **Phytomedicine**, v. 10, p. 309-317, 2003.

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.

ISNARD, S.; PROSPERI, J.; WANKE, S.; WAGNER, S. T.; SAMAIN, M. S.; TRUEBA, S.; FRENZKE, L.; NEINHUIS, C.; ROWE, N. P. Growth form evolution in piperales and its relevance for understanding angiosperm diversification: an integrative approach combining plant architecture, anatomy, and biomechanics. **International Journal of Plant Sciences**, v. 173, n. 6, p. 610-639, 2012.

JANSON, J.; RYDÉN, L. **Protein purification**: principles, high resolution methods and applications. New York: VCH Publishers, 1989.

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

JOHANN, S.; COTA, B. B.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M. A.; ZANI, C. L. Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 499-506, 2009.

JOHNSON, R. J.; METZER, D. E. Buffer preparation. In: JAKOBY, W. B. (Ed.). **Methods in enzymology**: enzyme purification and related techniques. New York: Academic Press, 1971. v. 22, p. 3-14.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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

KOEHN, F. E. Biosynthetic medicinal chemistry of natural product drugs. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 3, p. 854-865, 2012.

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**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.

LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. Dc. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 153-156, 2005.

LI, Y.; MEI, H.; WU, O.; AHANG, S.; FANG, J. L.; SHI, L.; GUO, L. Methysticin and 7,8-dihydromethysticin are two major kavalactones in kava extract to induce CYP1A1. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 388-399, 2011.

LOPES, A. A.; LOPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JUNIOR, J. M.; AMBROSIO, 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**, v. 22, n. 12, p. 1040-1046, 2008.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) Amazonensis* And *Trypanosoma Cruzi*. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 41, p. 85-94, 2005.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, P. B.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. Dc. Var. *Pallescens* (C. Dc.) Yunck Against *Trypanosoma Cruzi*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 10, p. 2126-2130, 2006.

MA, Y.; SACHDEVA, K.; LIU, J.; FORD, M.; YANG, D.; KHAN, I. A.; CHICHESTER, C. O.; YAN, B. Desmethoxyyangonin and dihydromethysticin are two major pharmacological kavalactones with marked activity on the induction of CYP3A23. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 32, n. 11, p. 317-1324, 2004.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

MATA, R.; MORALES, I.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; ENRIQUEZ-MENDOZA, I.; BYE, R.; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 1961-1968, 2004.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MIRANDA, R. P.; BERNARD, C. B.; DURST, T.; ARNASON, J. T.; VINDAS, P. S.; POVEDA, L.; ROMÁN, L. S. Methyl 4-hydroxi-3-(3'-methyl-2'-butenyl)benzoate, major insecticidal principie from *Piper guanacastensis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 282-284, 1996.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

- MORANDIM, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, C. M.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of *Piper* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 37, p. 6135-6139, 2010.
- MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. A chromene from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1075-1077, 1998.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.
- NASCIMENTO, J. C.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and <sup>13</sup>C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n.11, p. 2288-2311, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- OLIVEIRA, L. C. P.; MAUSE, R.; NUNOMURA, S. M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 6b, p. 1439-1442, 2005.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper Aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.
- OTOGURO, K.; IWATSUKI, M.; ISHIYAMA, A.; NAMATAME, M.; NISHIHARA-TSUKASHIMA, A.; KIYOHARA, H.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; OMURA, S.; YAMADA, H. *In vitro* antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kava (*Piper methysticum*). **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 558-561, 2012.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.
- PARRA, J. E.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Cumanenic acid, a new chromene isolated from *Piper Cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 226, p. 280-282, 2011.
- 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.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

RAMOS, C.; KATO, J. M. Secondary metabolites from the phloem of *Piper solmsianum* (Piperaceae) in the Honeydew of *Edessa meditabunda*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 604-606, 2012.

RANJITH, H.; DHARMARATNEA, W. P.; NANAYAKKARAA, N. P. D.; KHAN, I. A. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analyses. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 429-433, 2002.

RAPADO, L. N.; LOPES, P. O. M.; YAMAGUCHI, L. F.; NAKANO, E. Ovicidal effect of Piperaceae species on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* Host. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 421-424, 2013.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; DUO PASSERINI, G.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1B, p. 199-203, 2009a.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIM, A. A.; KATO, M. J.; SCORZONI, L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 2866-2870, 2009b.

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 alkalamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 899-903, 2007.

ROUSSIS, V.; AMPOFO S. A.; WIEMER, D. F. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1787-1788, 1990.

RUIZ, S. P.; ANJOS, M. M.; CARRARA, V. S.; LIMA, J. N.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; ABREU FILHO, B. A. Evaluation of the antibacterial activity of piperaceae extracts and *Nisin* on *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. 1772-1777, 2013.

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

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**, v. 105, n. 5, p. 677-688, 2010.

- SCODRO, R. B. L.; PIRES, C. T. A.; CARRARA, V. S.; LEMOS, C. O. T.; CARDOZO FILHO, L.; SOUZA, V. A.; CORRÊA, A. G.; SIQUEIRA, V. L. D.; LONARDONI, M. V. C.; CARDOSO, R. F.; CORTEZ, D. A. G. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. **Phytomedicine**, v. 20 p. 600-604, 2013.
- SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. New York: Springer-Verlag, 1987.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts, *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.
- SHUANG, F.; TATTAM, B. N.; DUKE, C. C.; RAMZAN, I. High-performance liquid chromatography assays for desmethoxyyangonin, methysticin, kavain and their microsomal metabolites. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 81-91, 2009.
- 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**, v. 116, n. 3, p. 569-573, 2008.
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper Regnellii* (Miq.) C. Dc. Var. *Regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.
- SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.
- SIMÕES, C. M. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999.
- SINGH, Y. N. Potential for interaction of kava and St. John's wort with drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 22, p. 108-113, 2005.
- SMITH, M. R. Kava Lactones in *Piper methysticum* from Fiji. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 1055-1056, 1983.
- SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 735-748, 2007.
- TEIXEIRA, S. D. **Estudo fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua interação com morcegos frugívoros**. 2003. 141 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 350-353, 1998.

VALDIVIA, C.; MARQUEZ, N.; ERIKSSON, J.; VILASECA, A.; MUÑOZ, E.; STERNER, O. Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4120-4126, 2008.

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**, v. 64, n. 10, p. 135-359, 2001.

WALDEN, J.; WEGERER, J. V.; WINTER, U.; BERGER, M.; GRUNZE, H. Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus. Progress in neuro-psychopharmacology and biological. **Psychiatry**, v. 21, n. 4, p.697-706, 1997.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; McPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal American Chemistry Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

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

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

WARBURTON, E.; NORRIS, P. L.; GOENAGA-INFANTE, H. Comparison of the capabilities of accelerated solvent extraction and sonication as extraction techniques for the quantification of kavalactones in *Piper methysticum* (kava) roots by high performance liquid chromatography with ultra violet detection. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 98-102, 2007.

WONHWA, L.; HAYOUNG, Y.; SAE-KWANG, K.; JEONG AH, K.; JONG-SUP, B. Anticoagulant activities of *Piper longuminine* *in vitro* and *in vivo*. **BMB Reports**, v. 46, n. 10, p. 484-489, 2013.

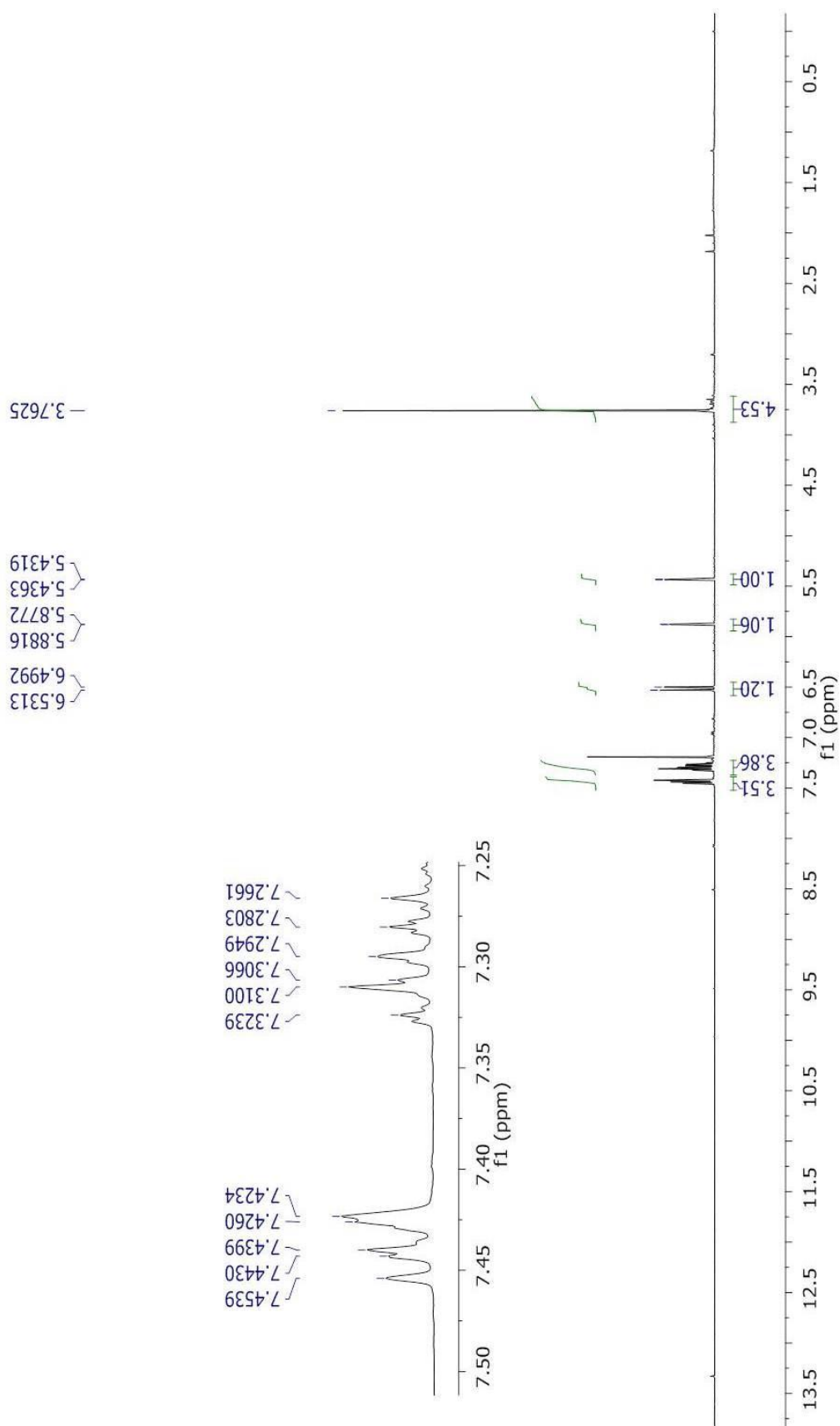
WU, D.; YU, L.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L.; RAMSEWAK, R. S. Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from *Piper methysticum* (kava kava) roots. **Phytomedicine**, v. 9, p. 41-47, 2002.

XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. Herbicidal and fungicidal activities of lactones in kava (*Piper methysticum*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 720-725, 2006.

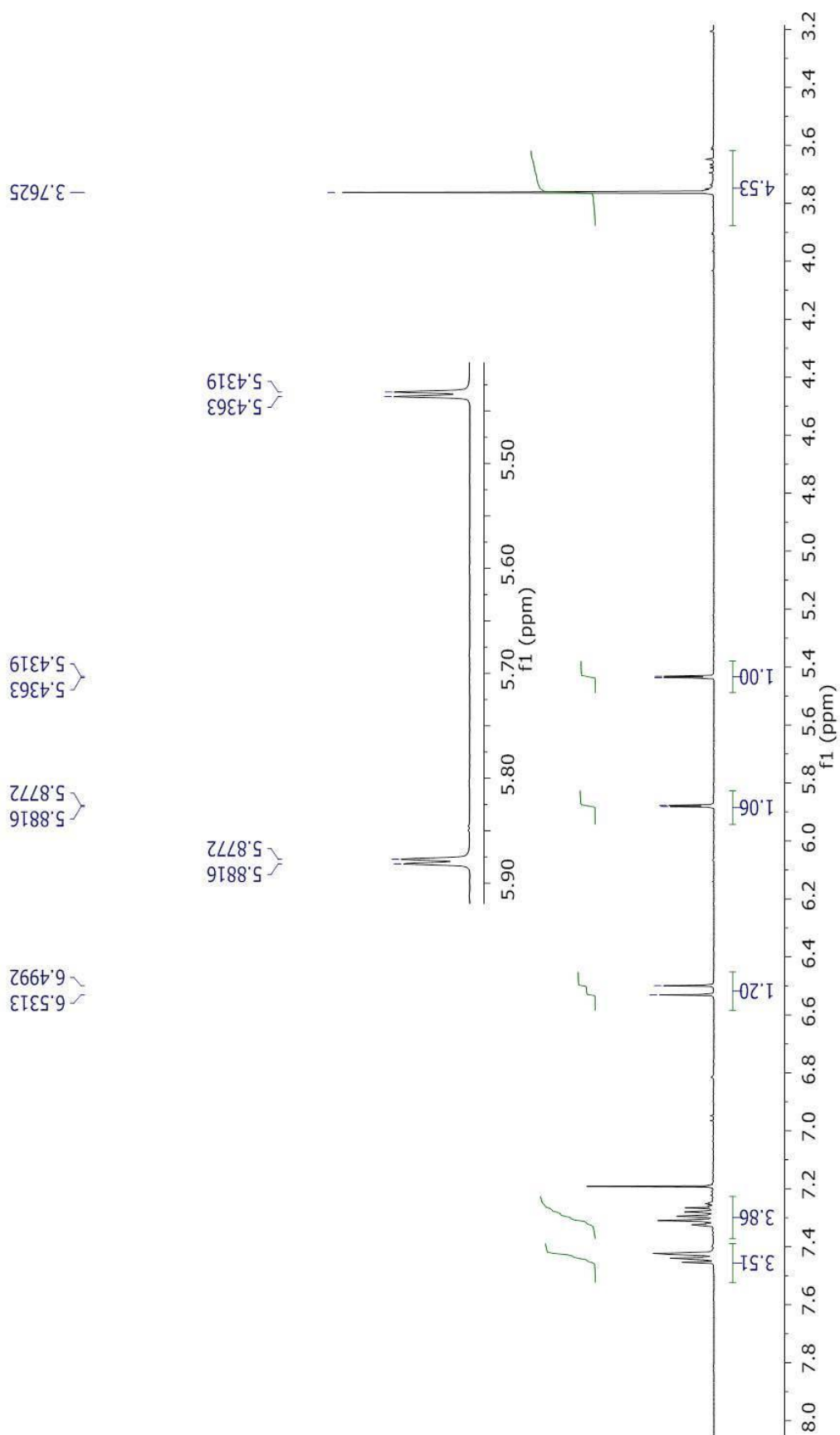


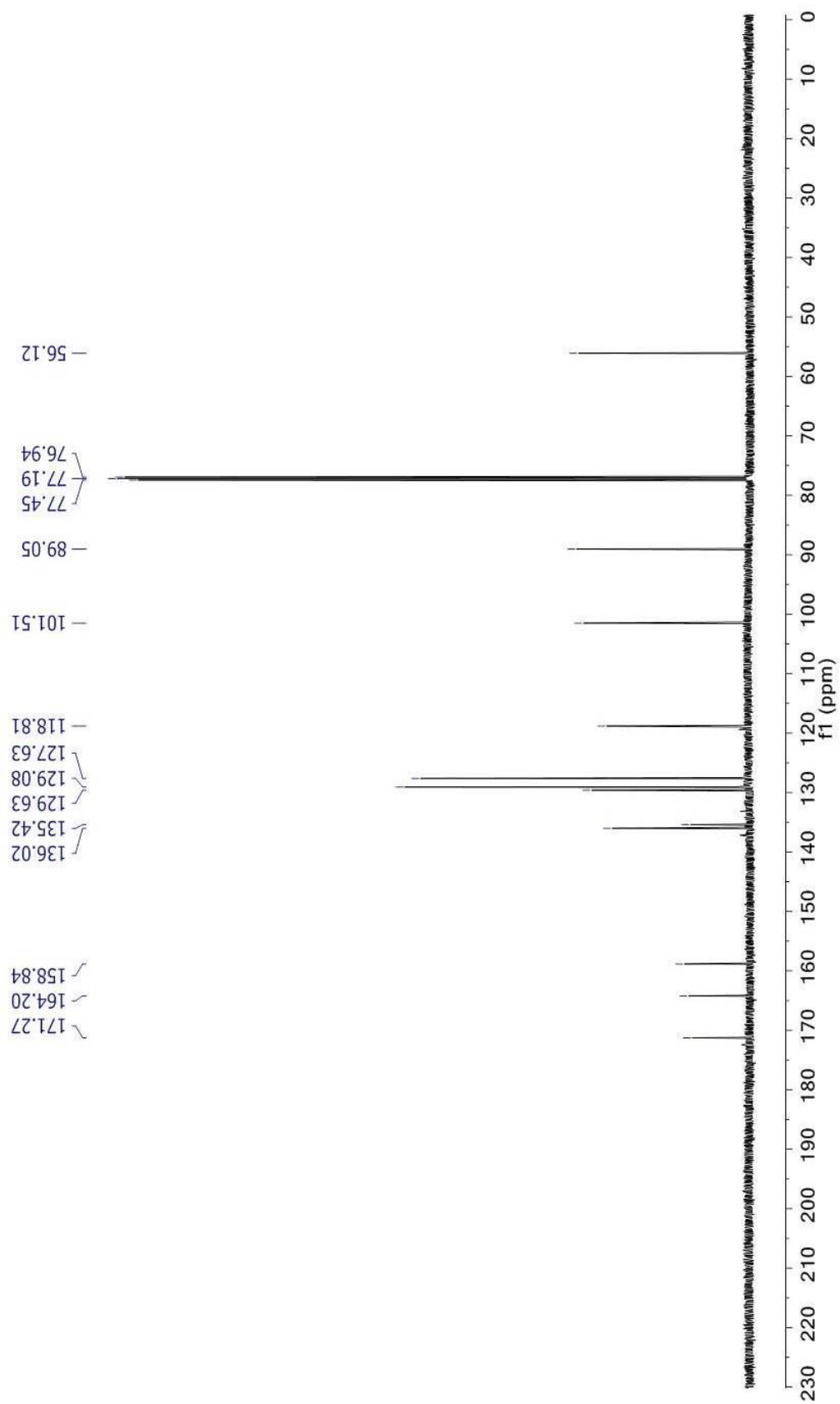
**ANEXO**

**Espectros de**  
**Ressonância Magnética**  
**Nuclear**

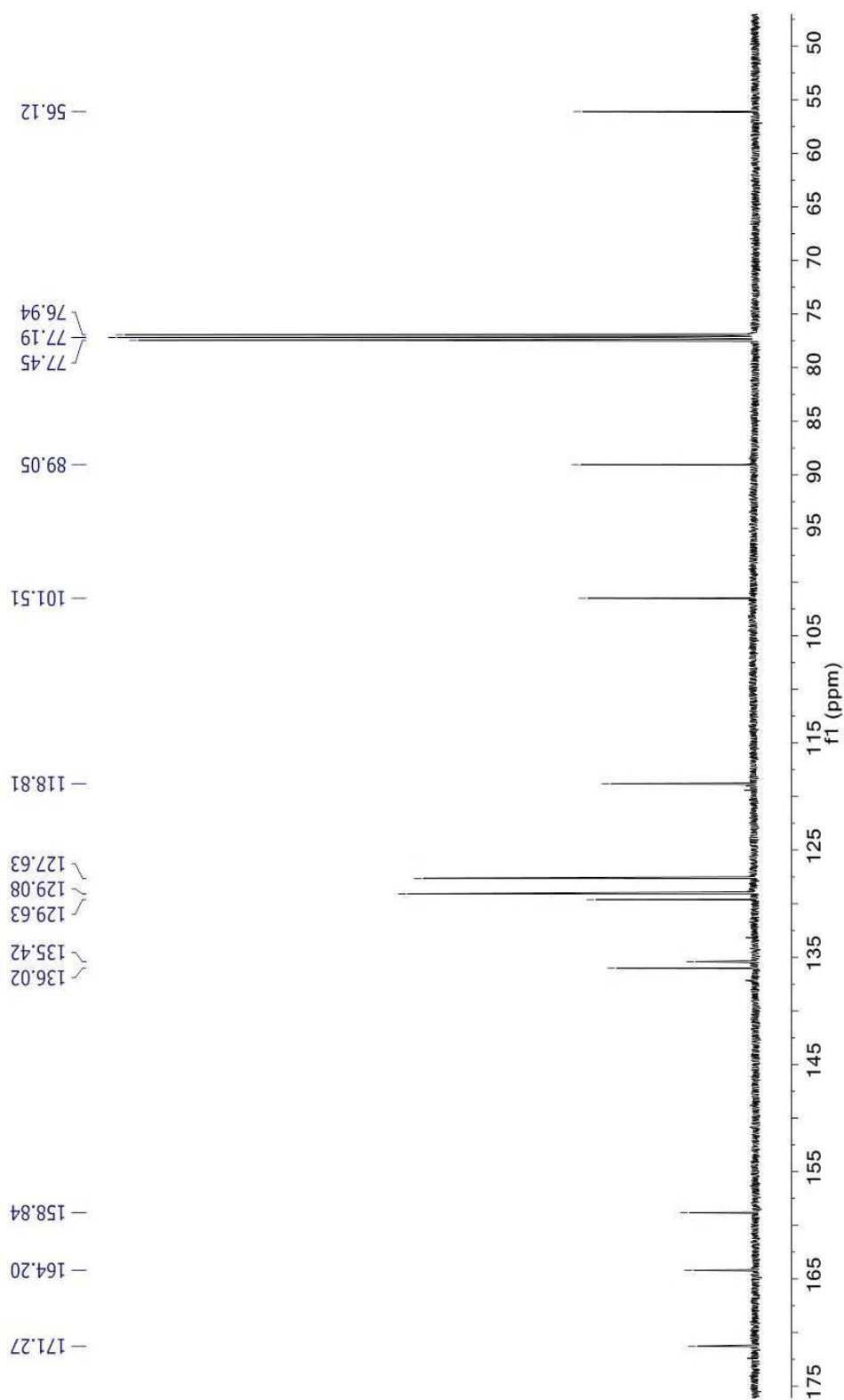
**Espectro 1:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

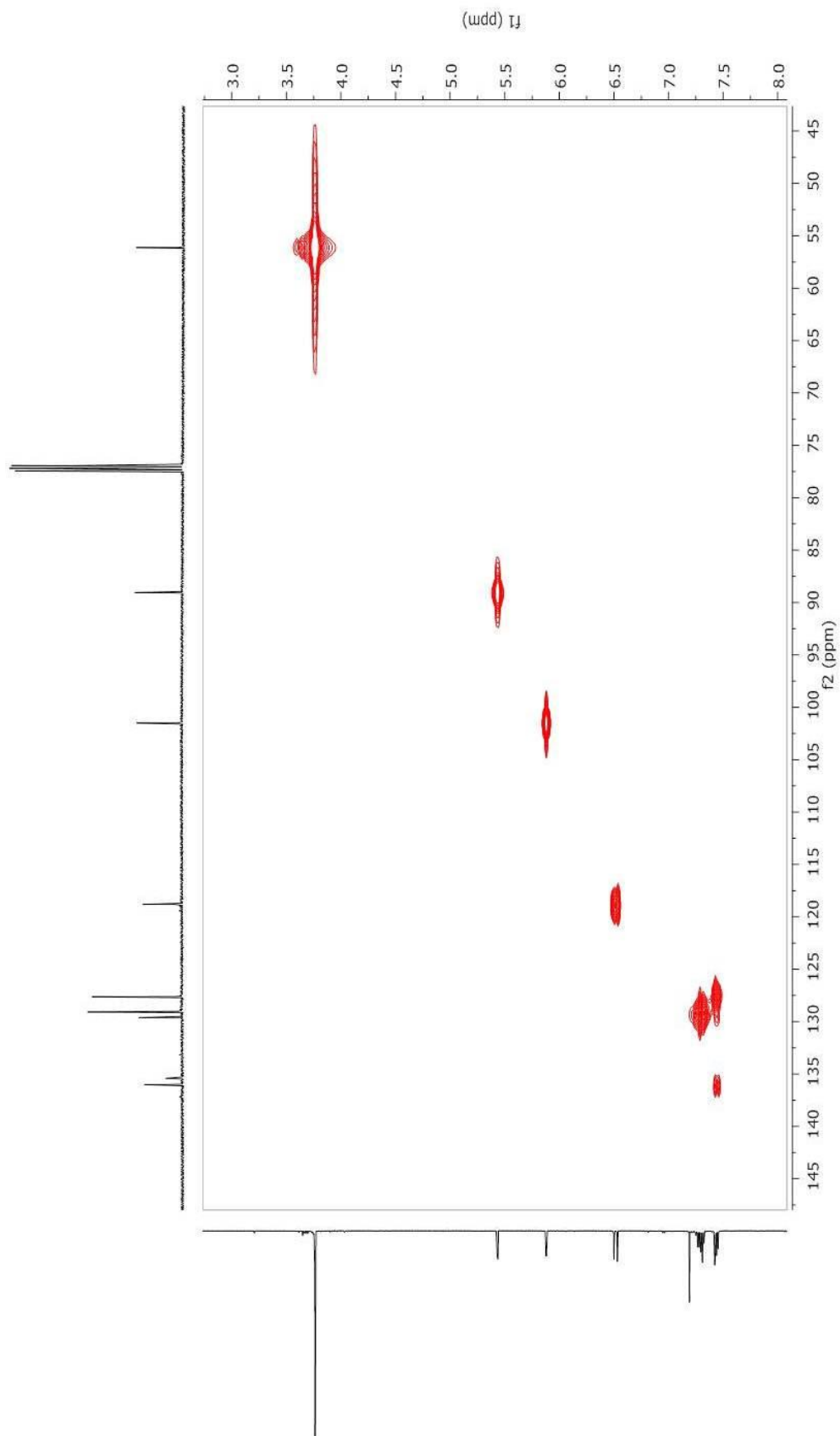
**Espectro 2:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

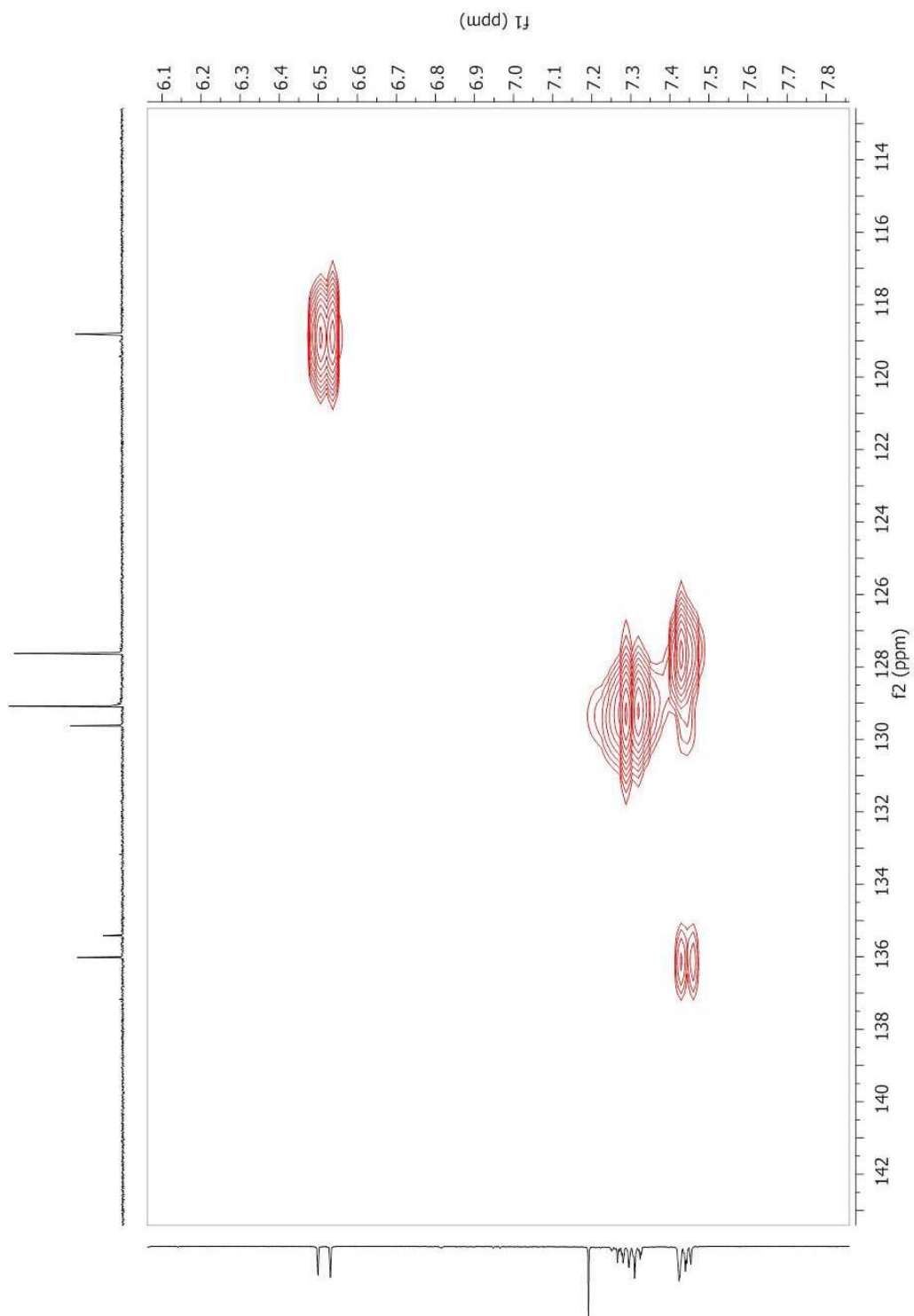


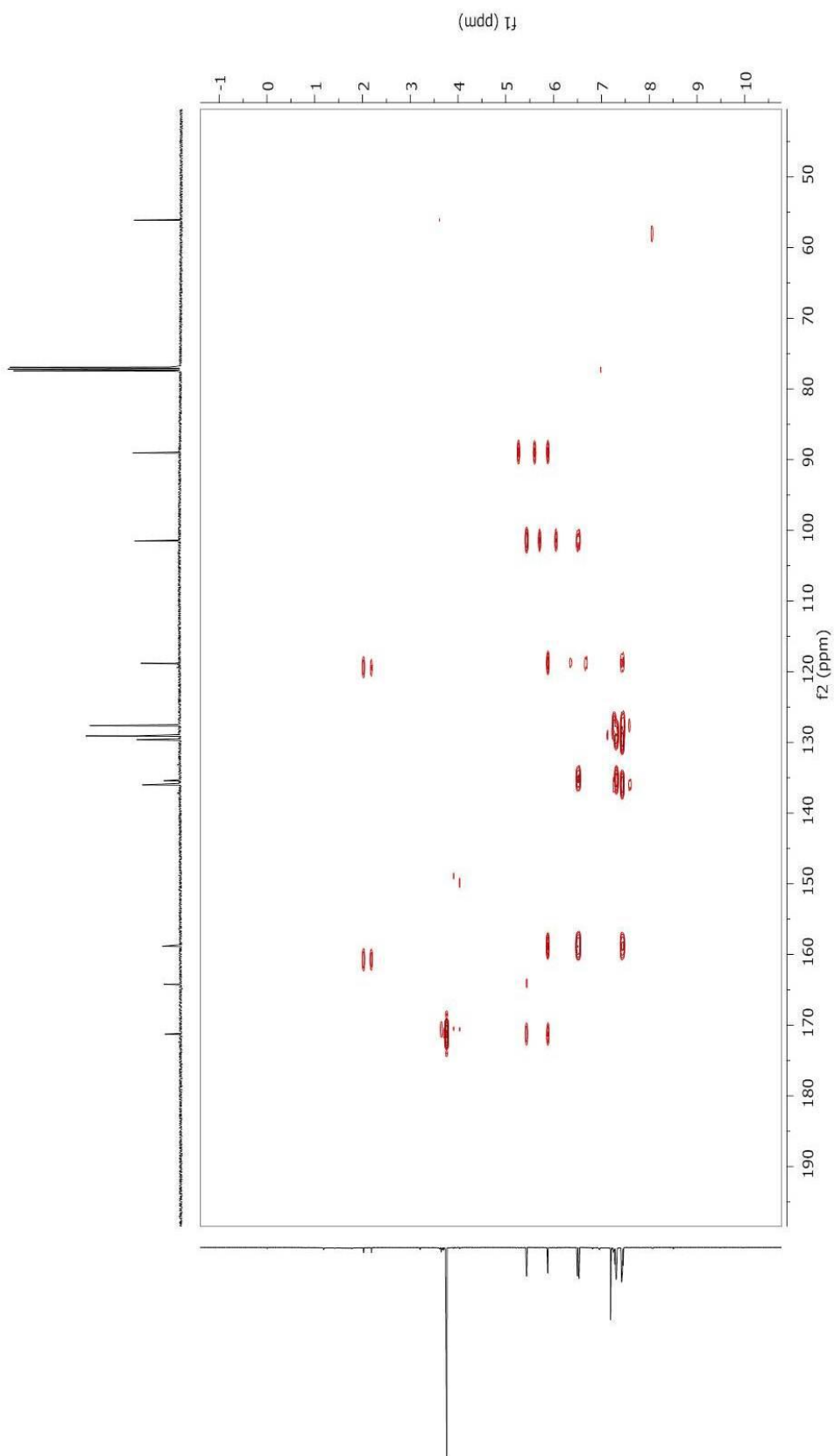
**Espectro 3:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Espectro 4:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 1 (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

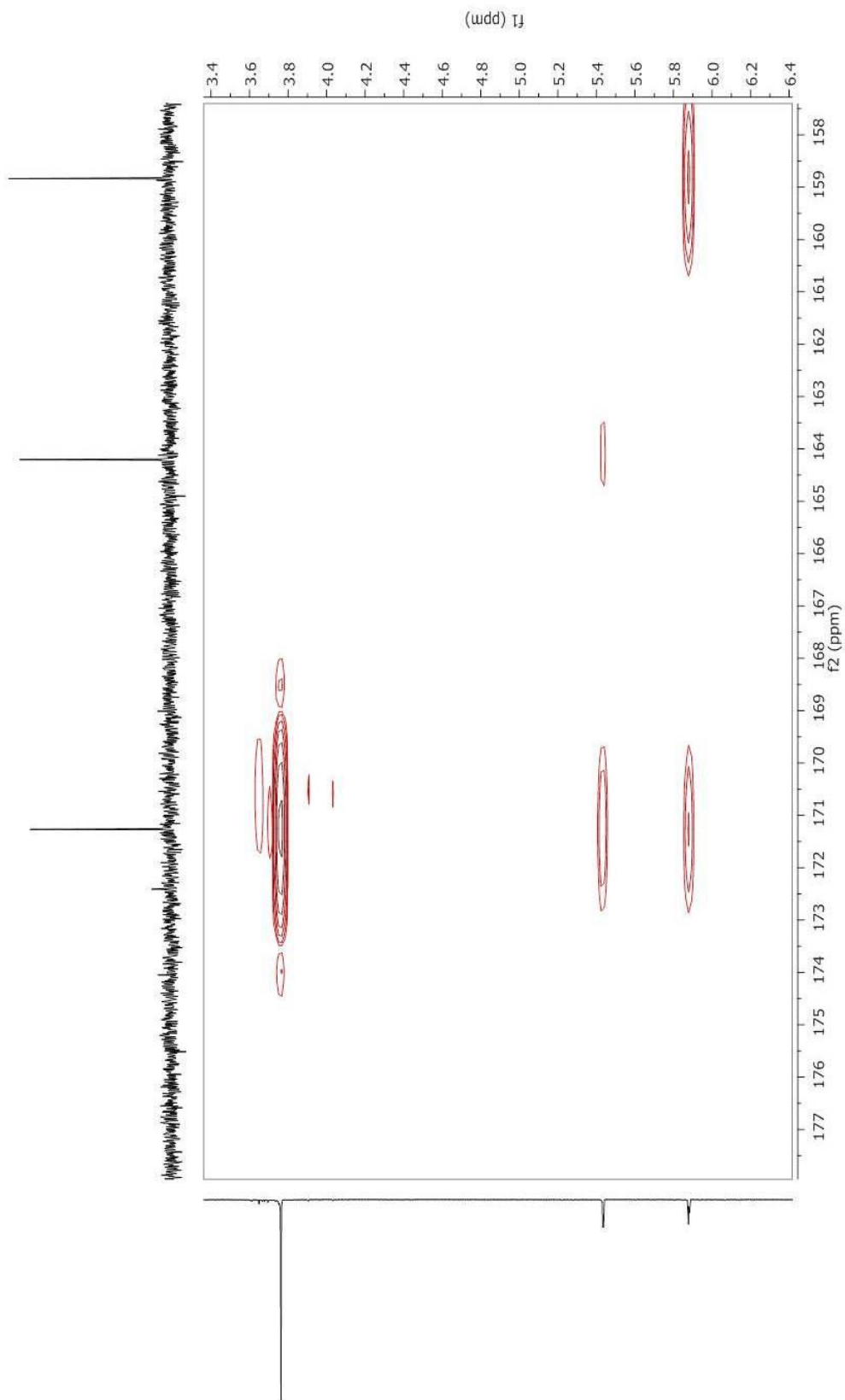


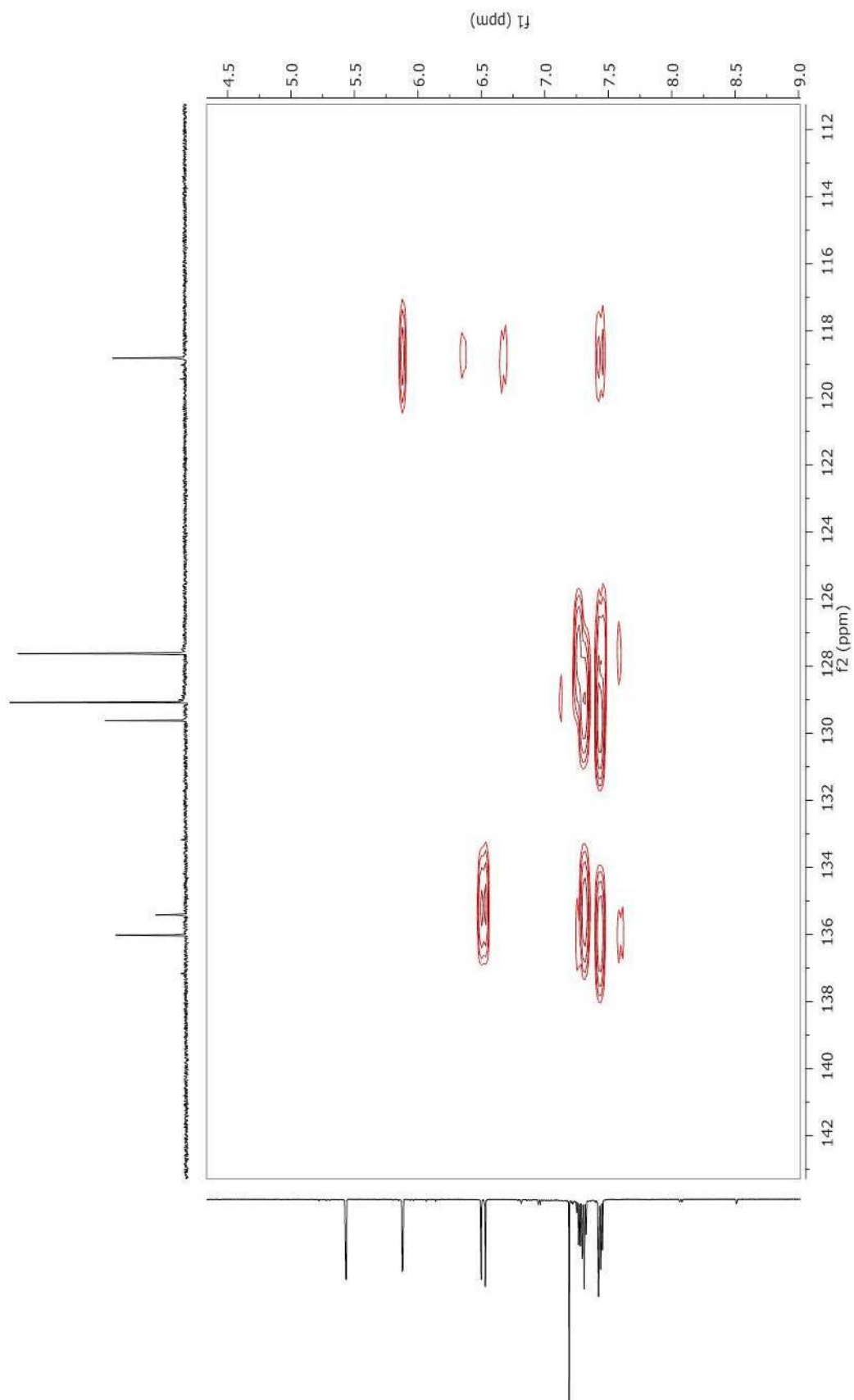
**Espectro 5:** Mapa de contorno gHSQC da substância **1**

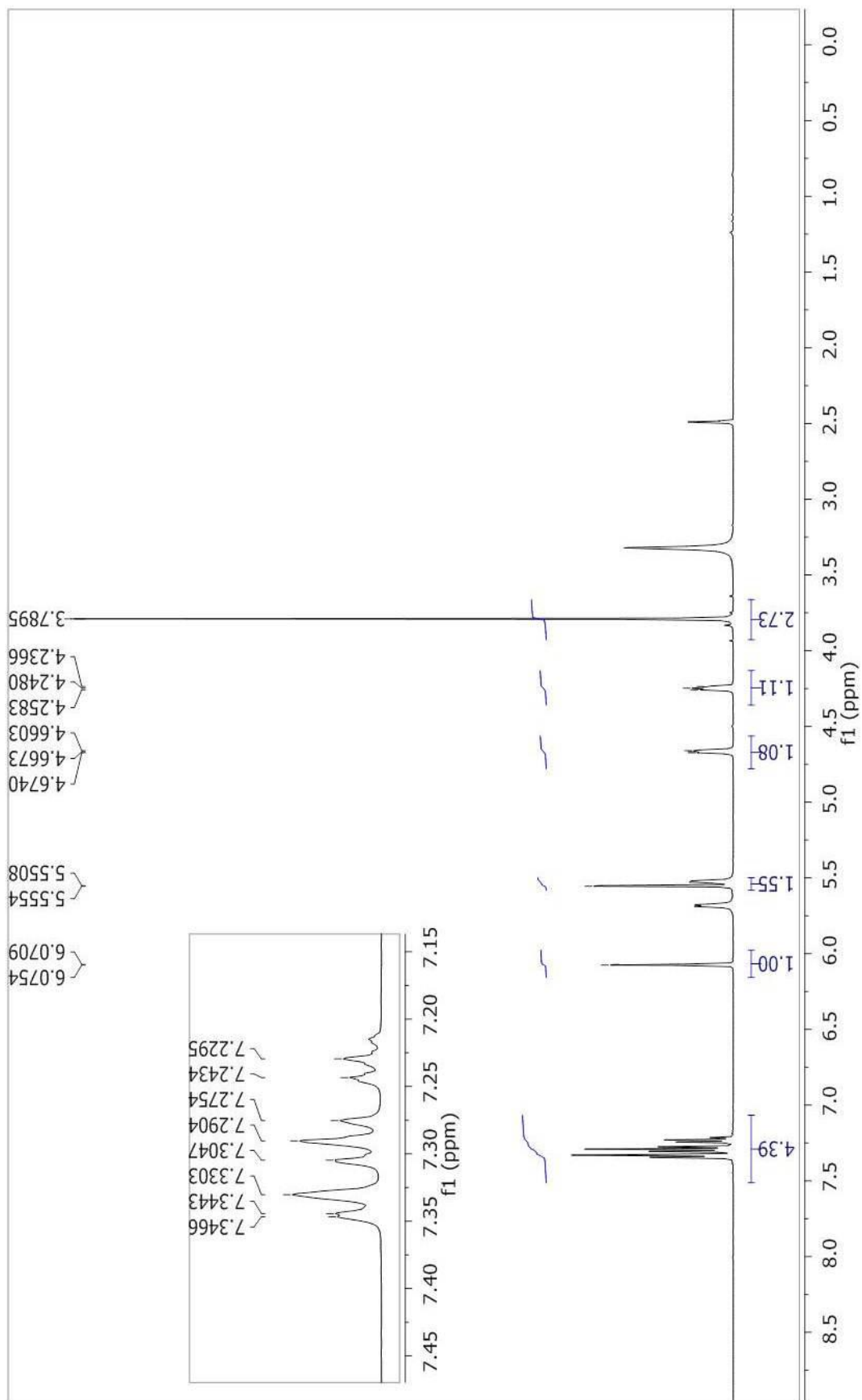
**Espectro 6:** Mapa de contorno gHSQC da substância 1- Ampliação

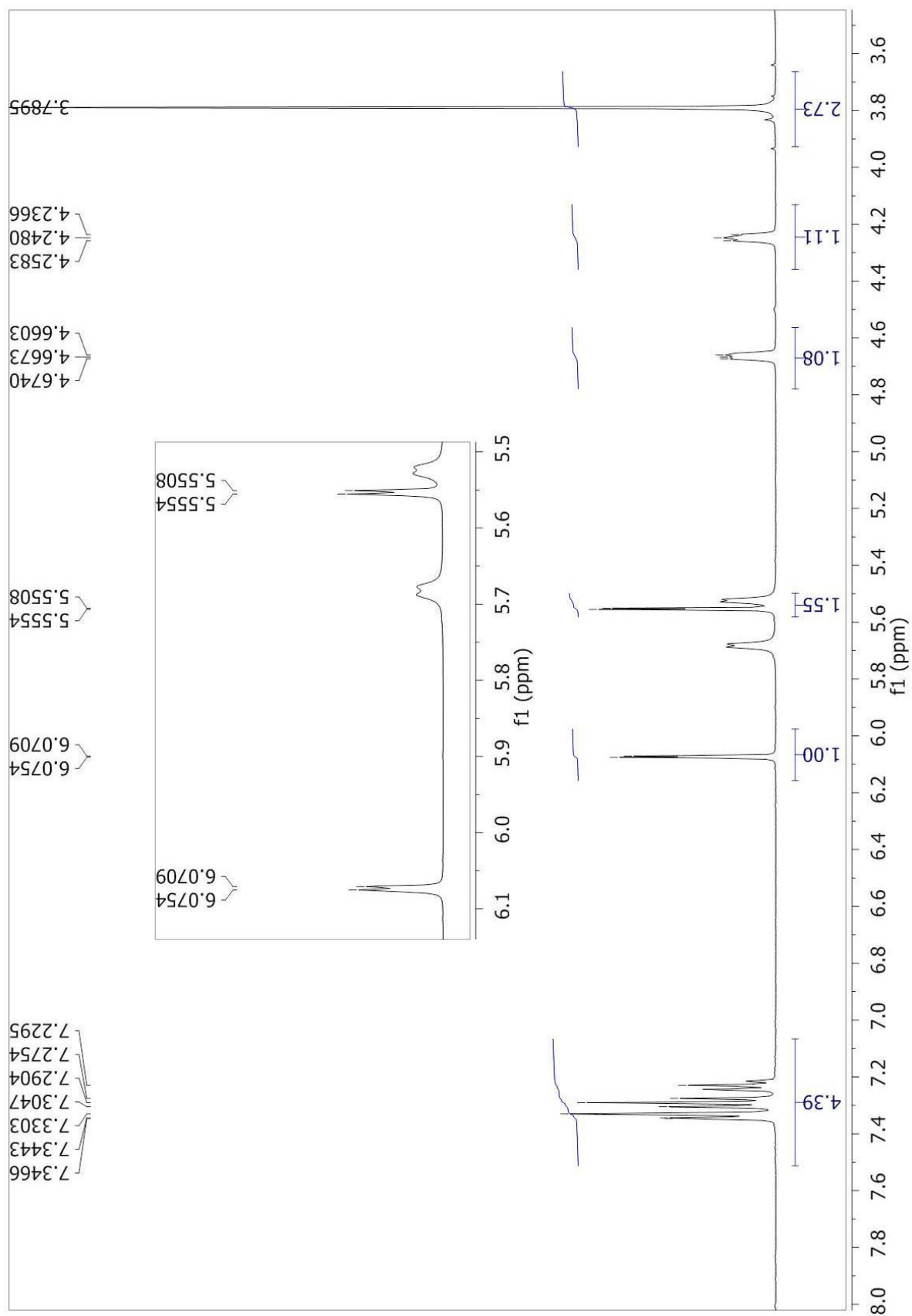
**Espectro 7: Mapa de contorno gHMBC da substância 1.**

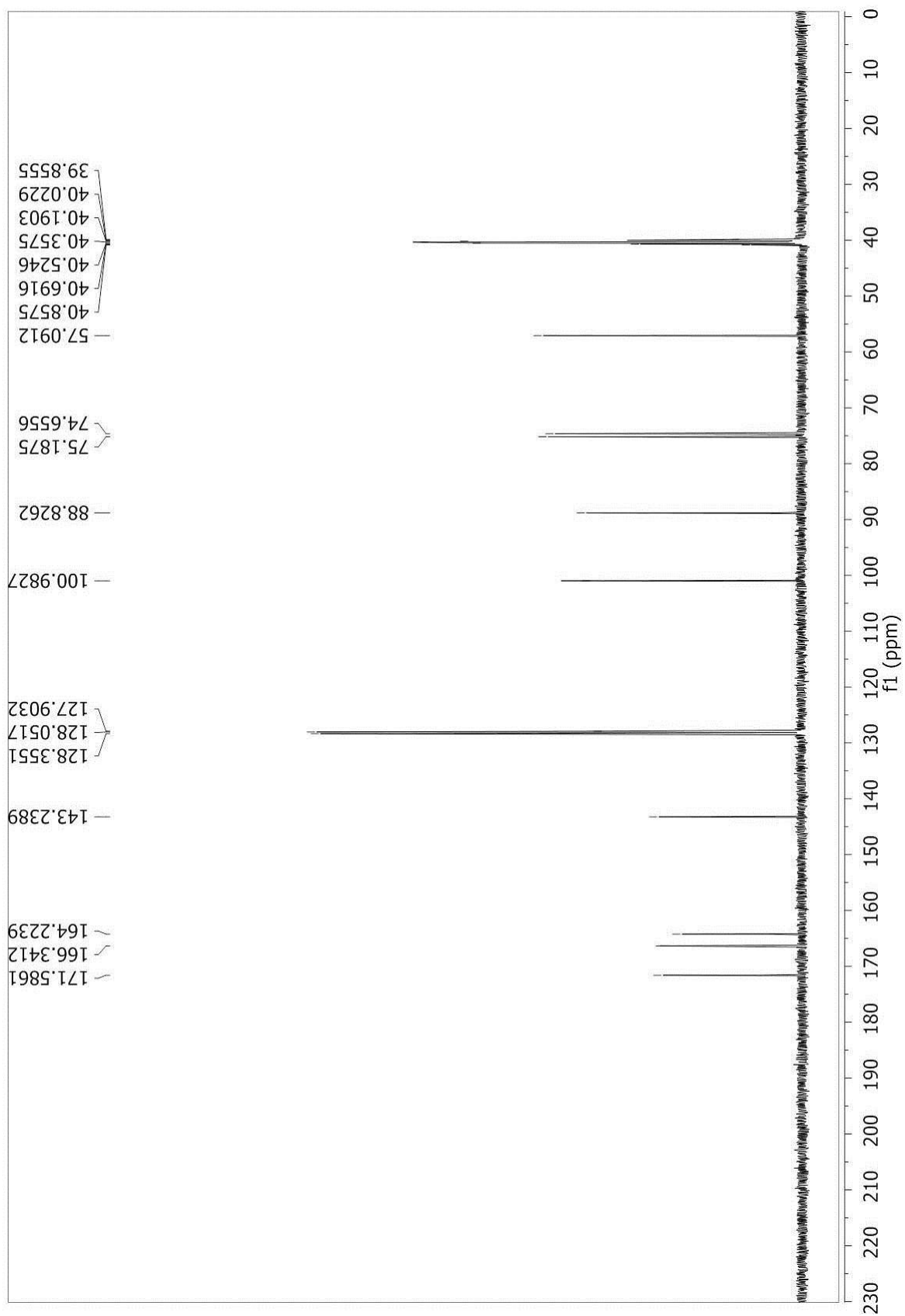


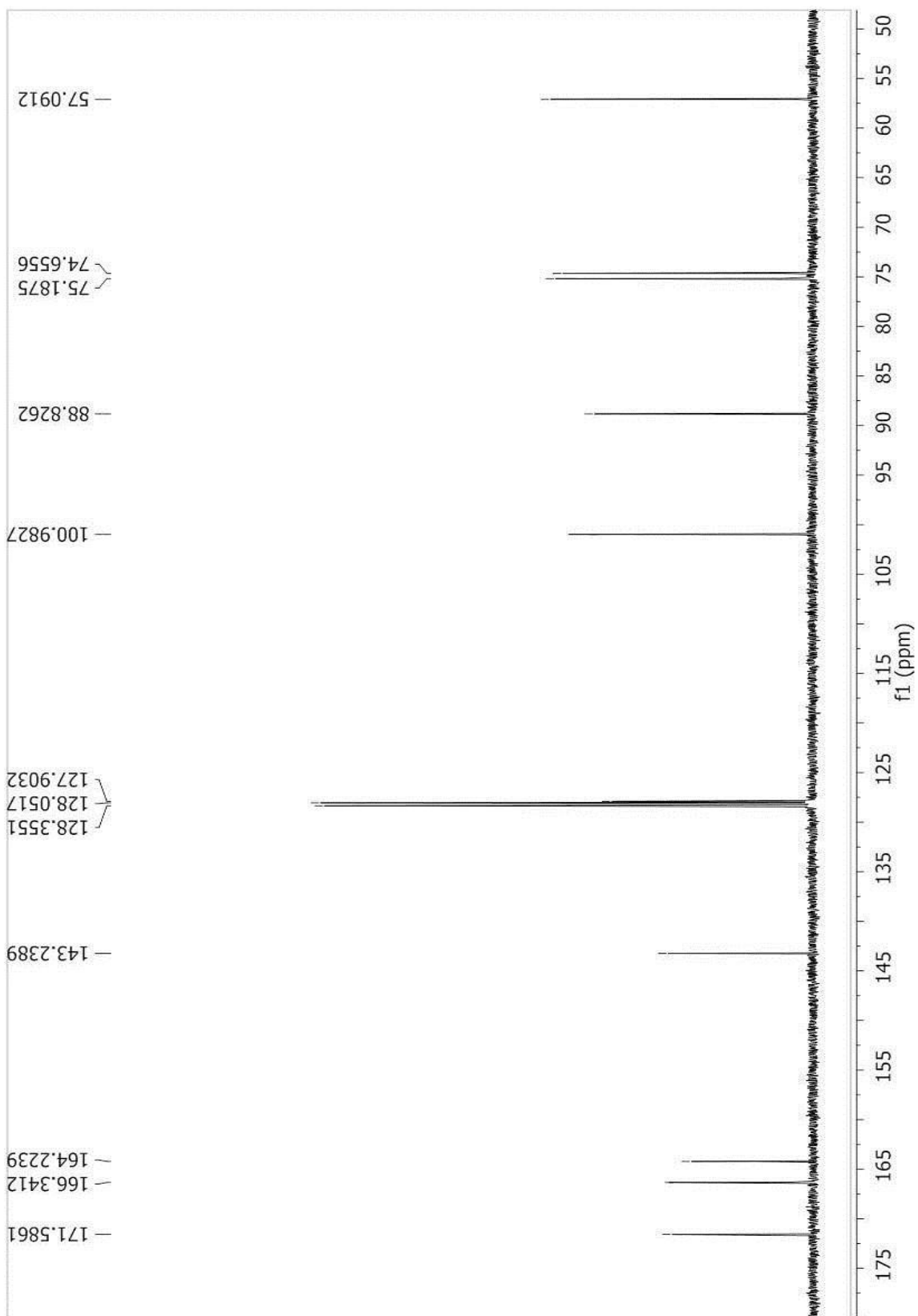
**Espectro 8:** Mapa de contorno gHMBC da substância **1** - Ampliação.

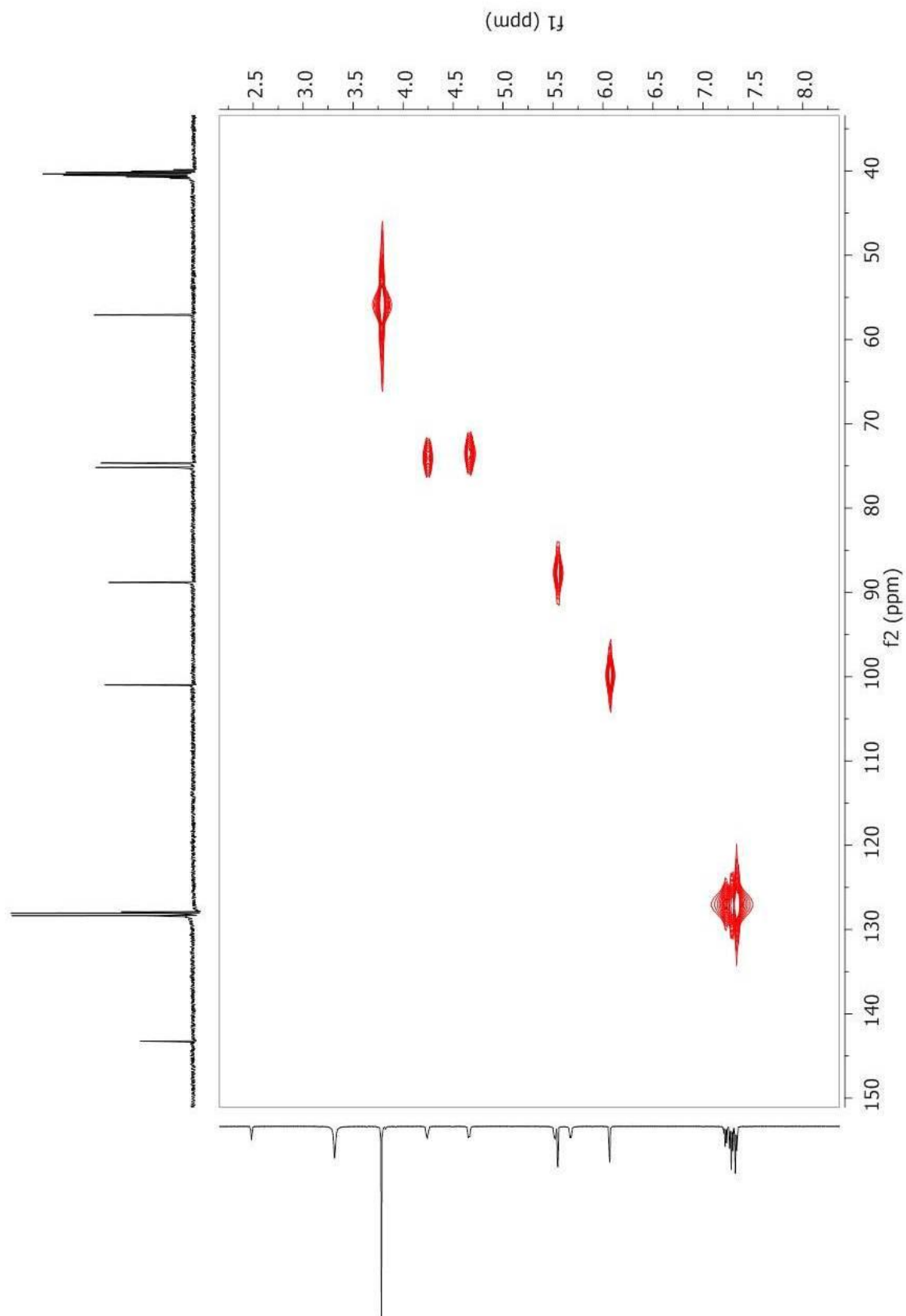
**Espectro 9:** Mapa de contorno gHMBC da substância **1** - Ampliação.

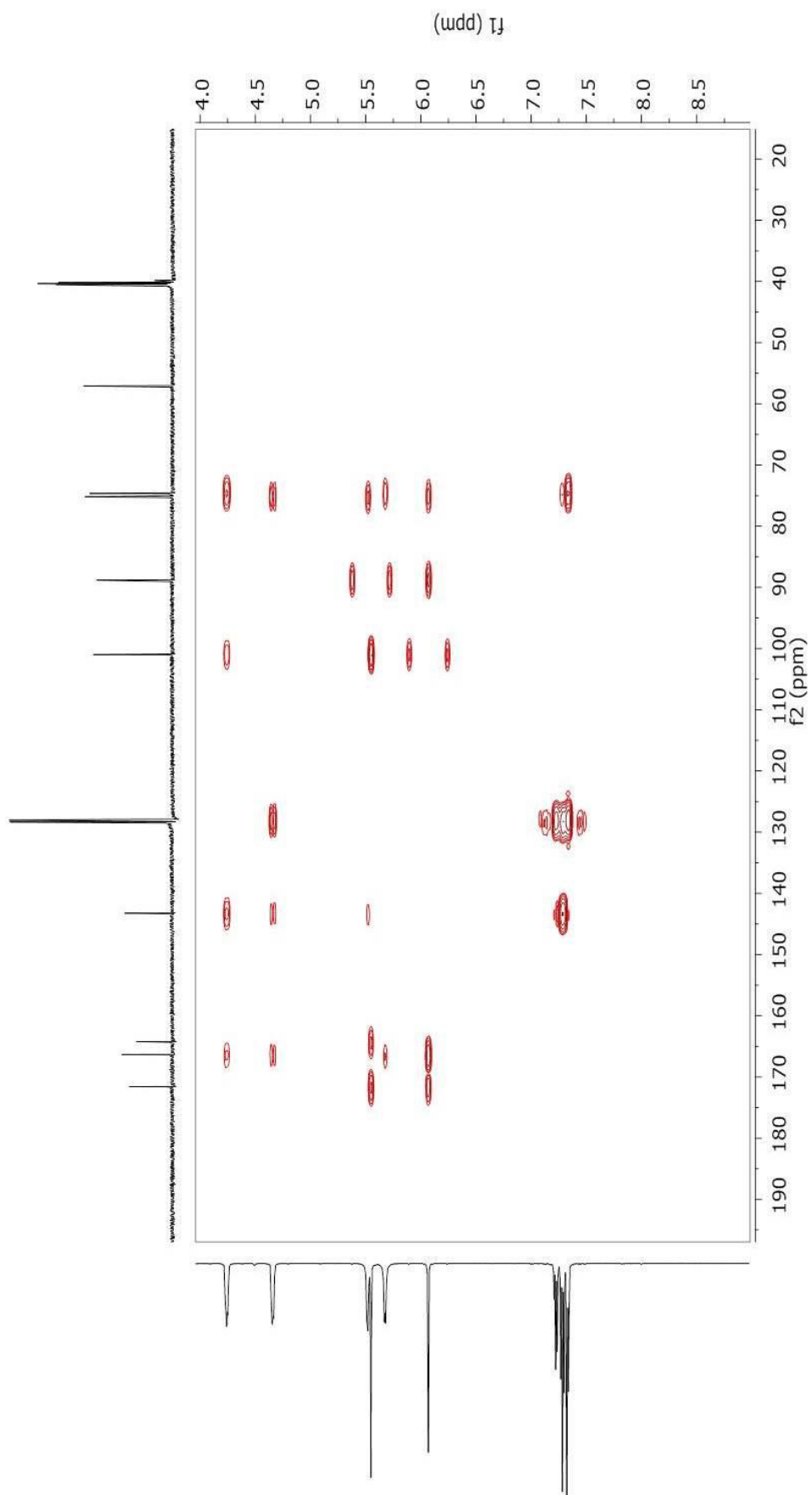
**Espectro 10:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** (500MHz, DMSO  $d_6$ ).

**Espectro 11:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** (500MHz, DMSO  $d_6$ ) - Ampliação.

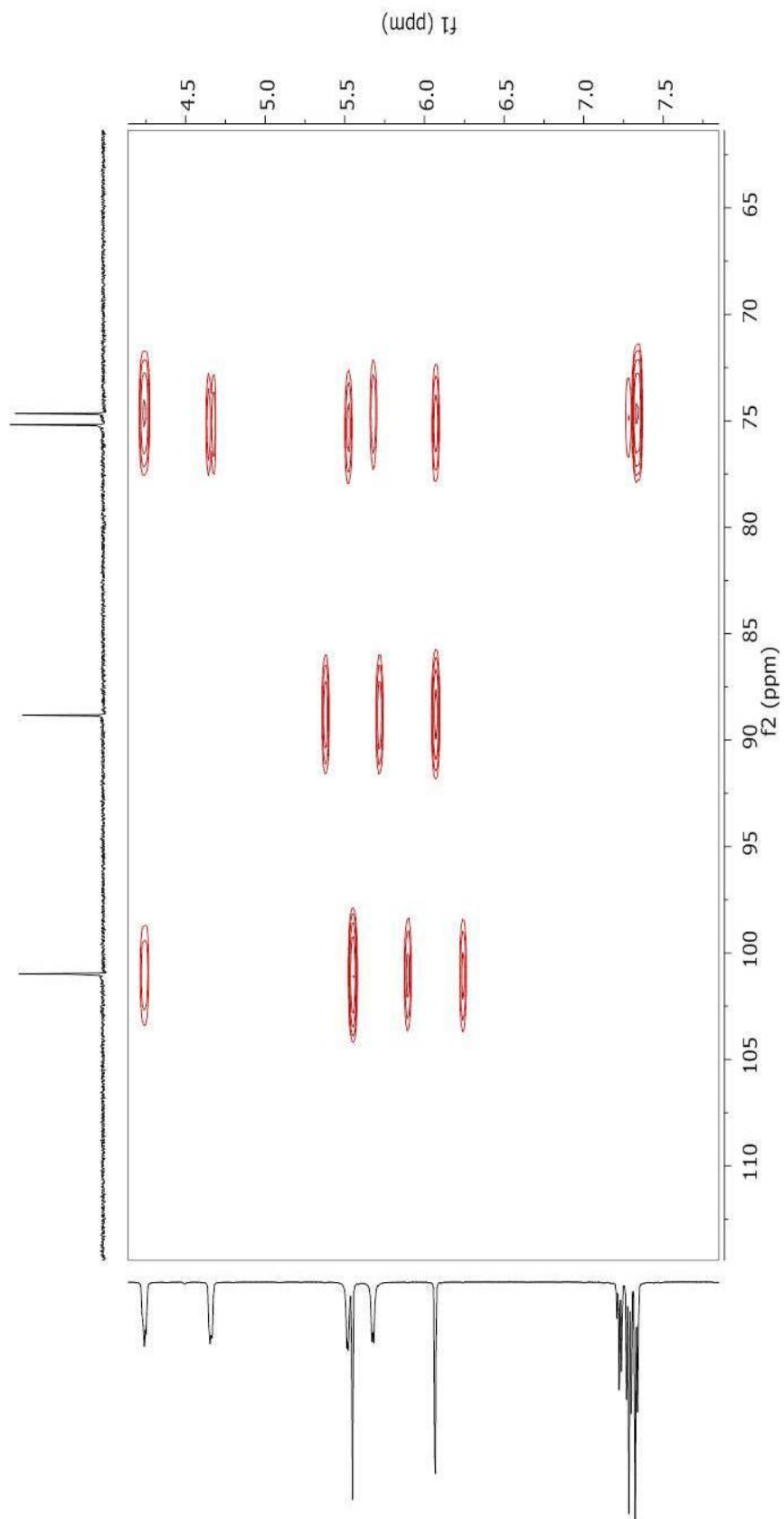
**Espectro 12:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** (125MHz, DMSO d<sub>6</sub>) .

**Espectro 13:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** (125MHz, DMSO d6) – Ampliação

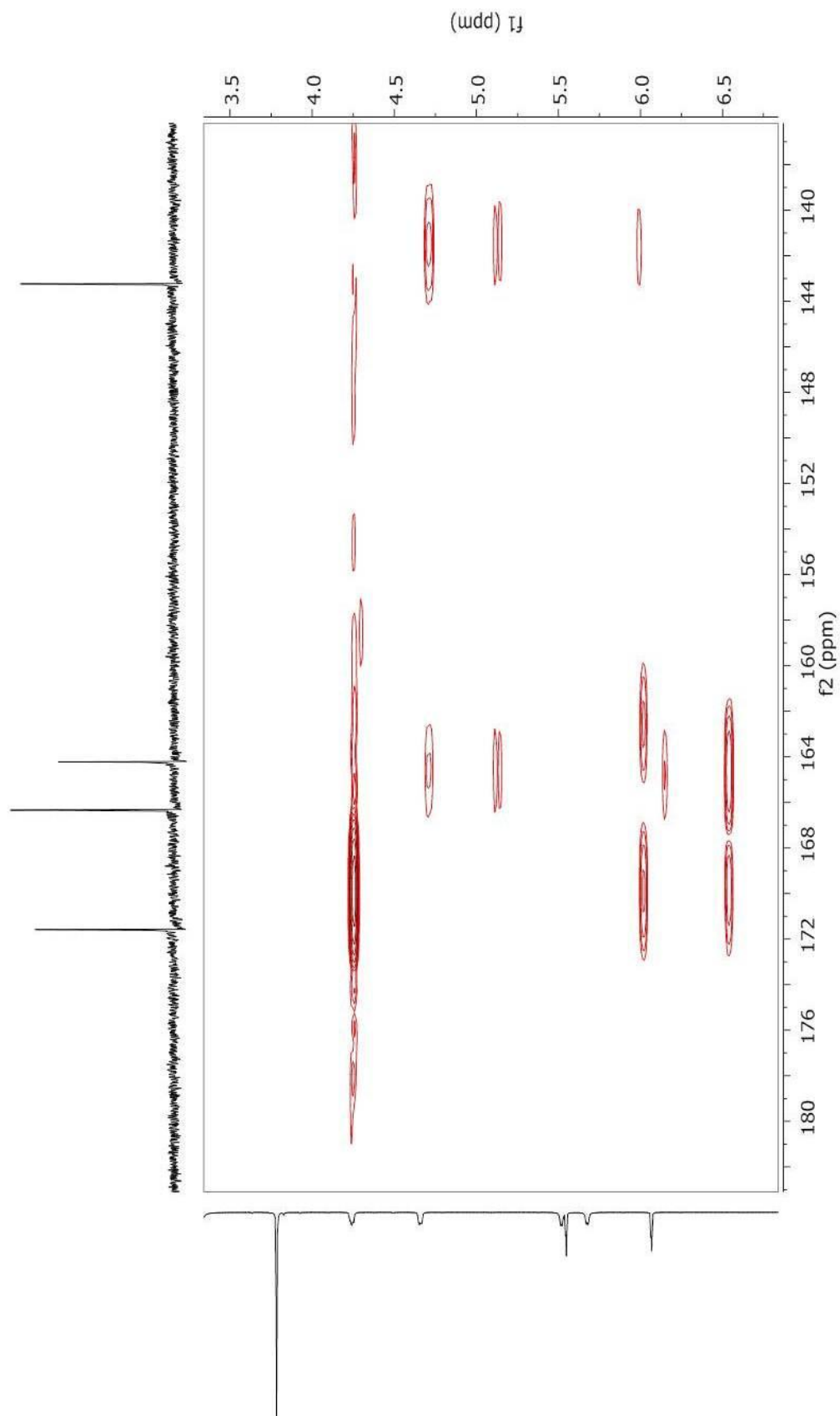
**Espectro 14: Mapa de contorno gHSQC da substância 2.**

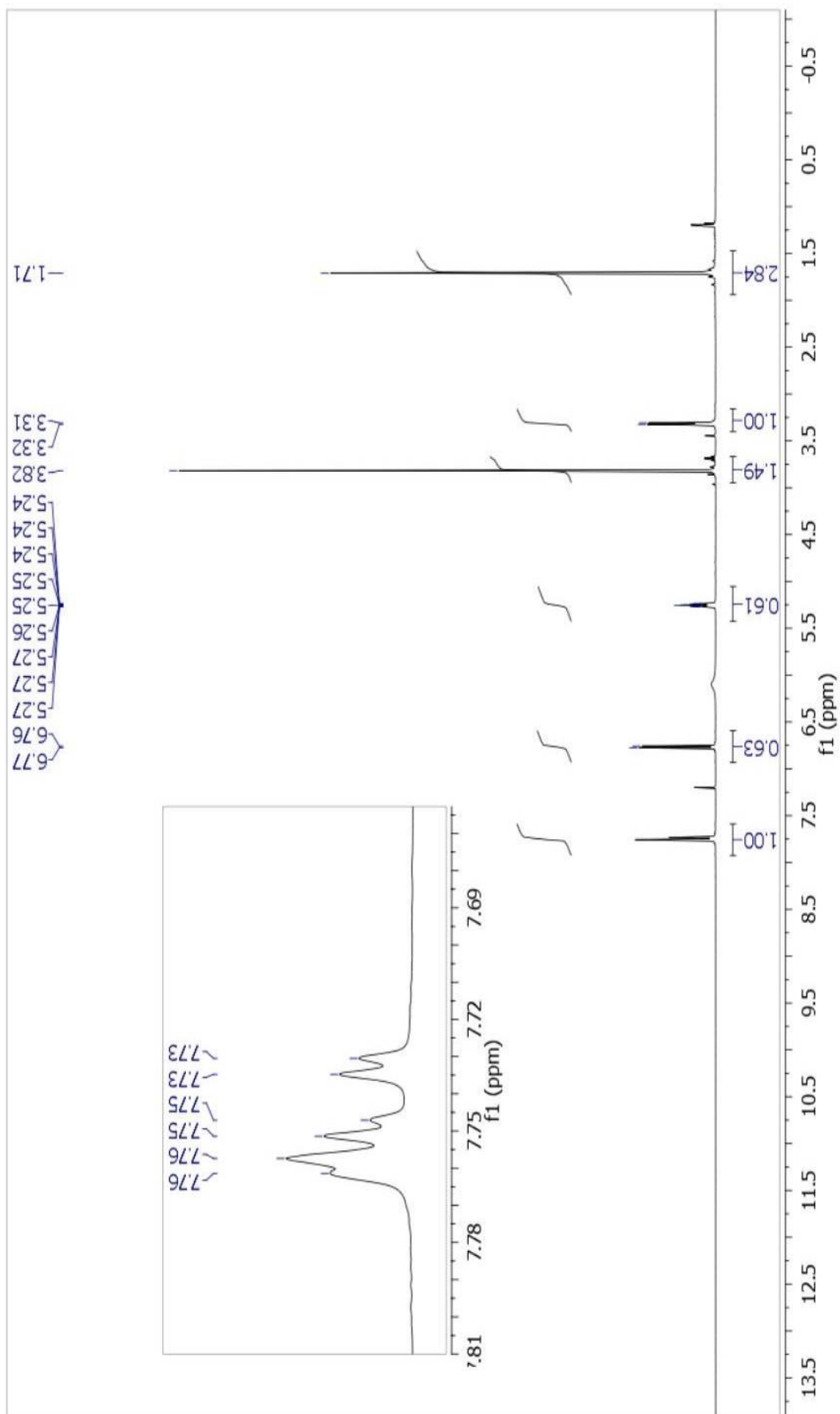
**Espectro 15: Mapa de contorno gHMBC da substância 2.**

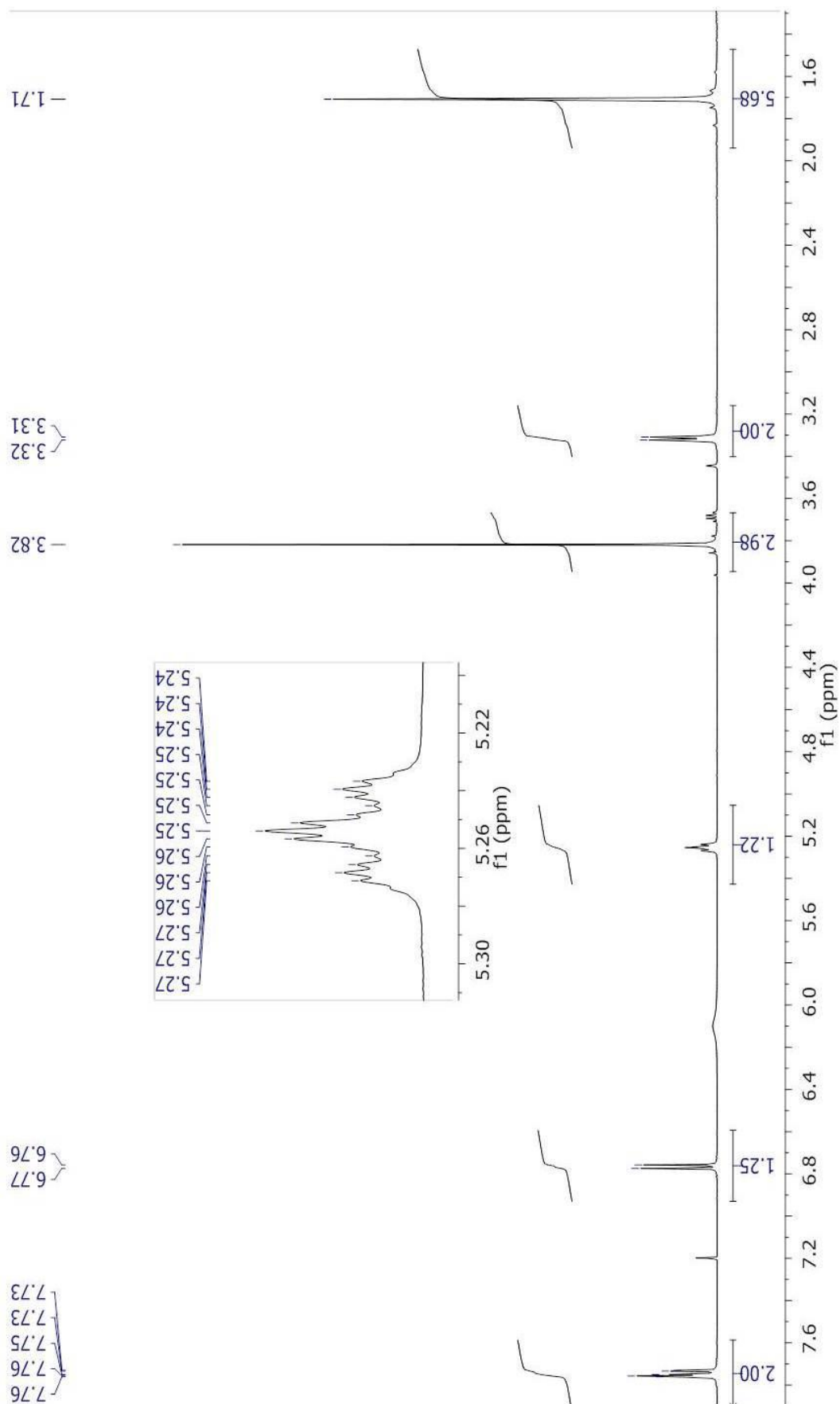


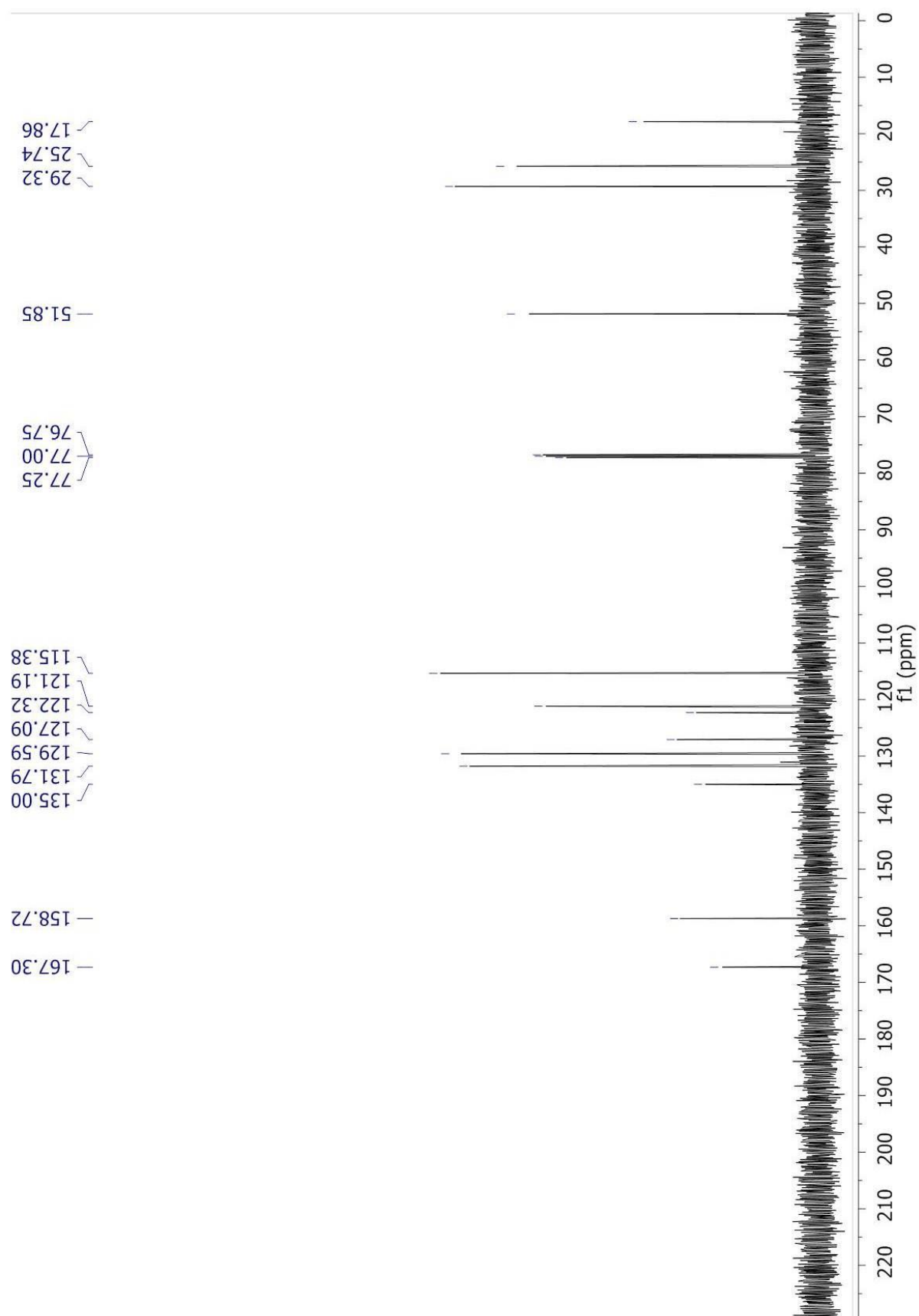
**Espectro 16:** Mapa de contorno gHMBC da substância **2** - Ampliação.

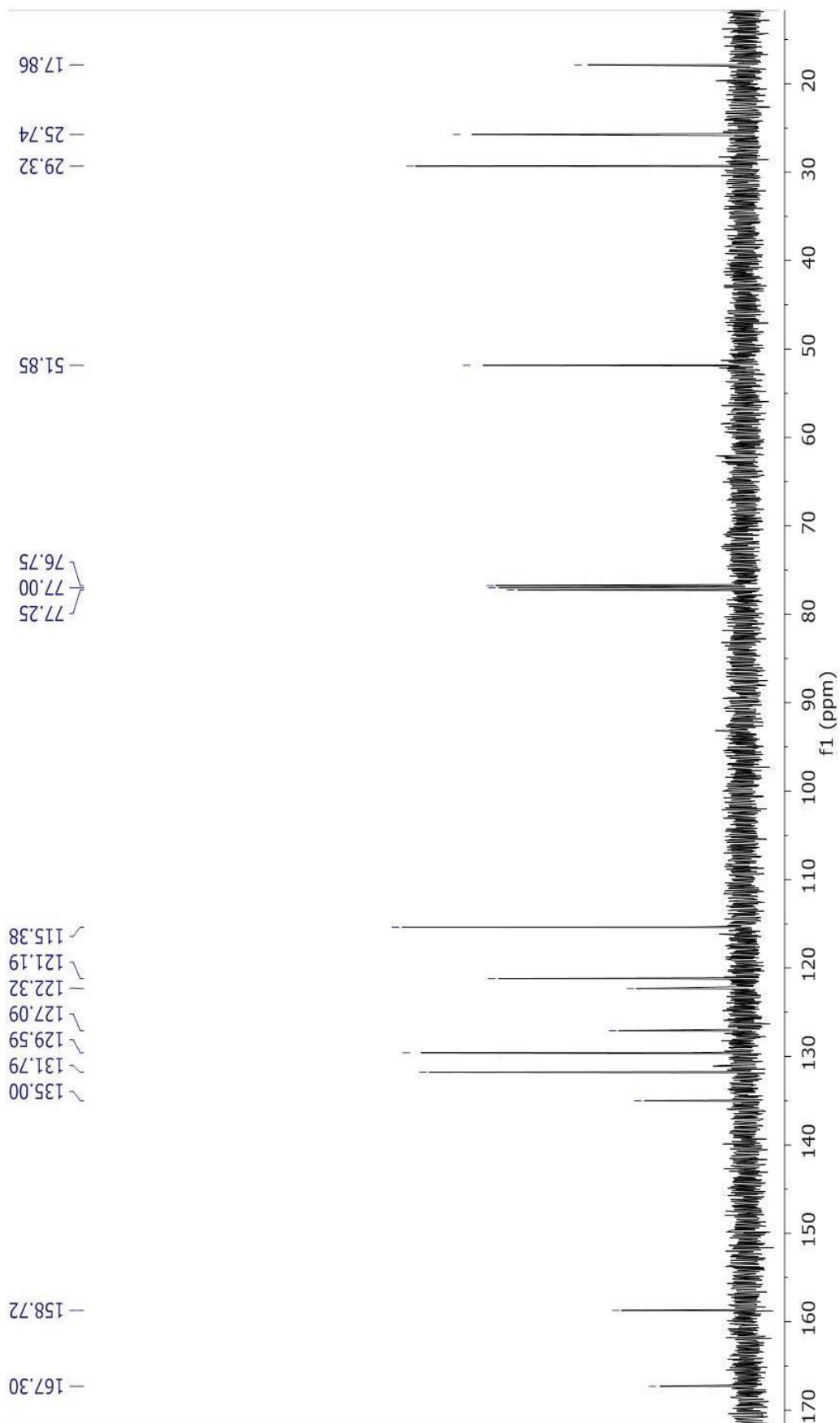
Espectro 17: Mapa de contorno gHMBC da substância 2 - Ampliação.



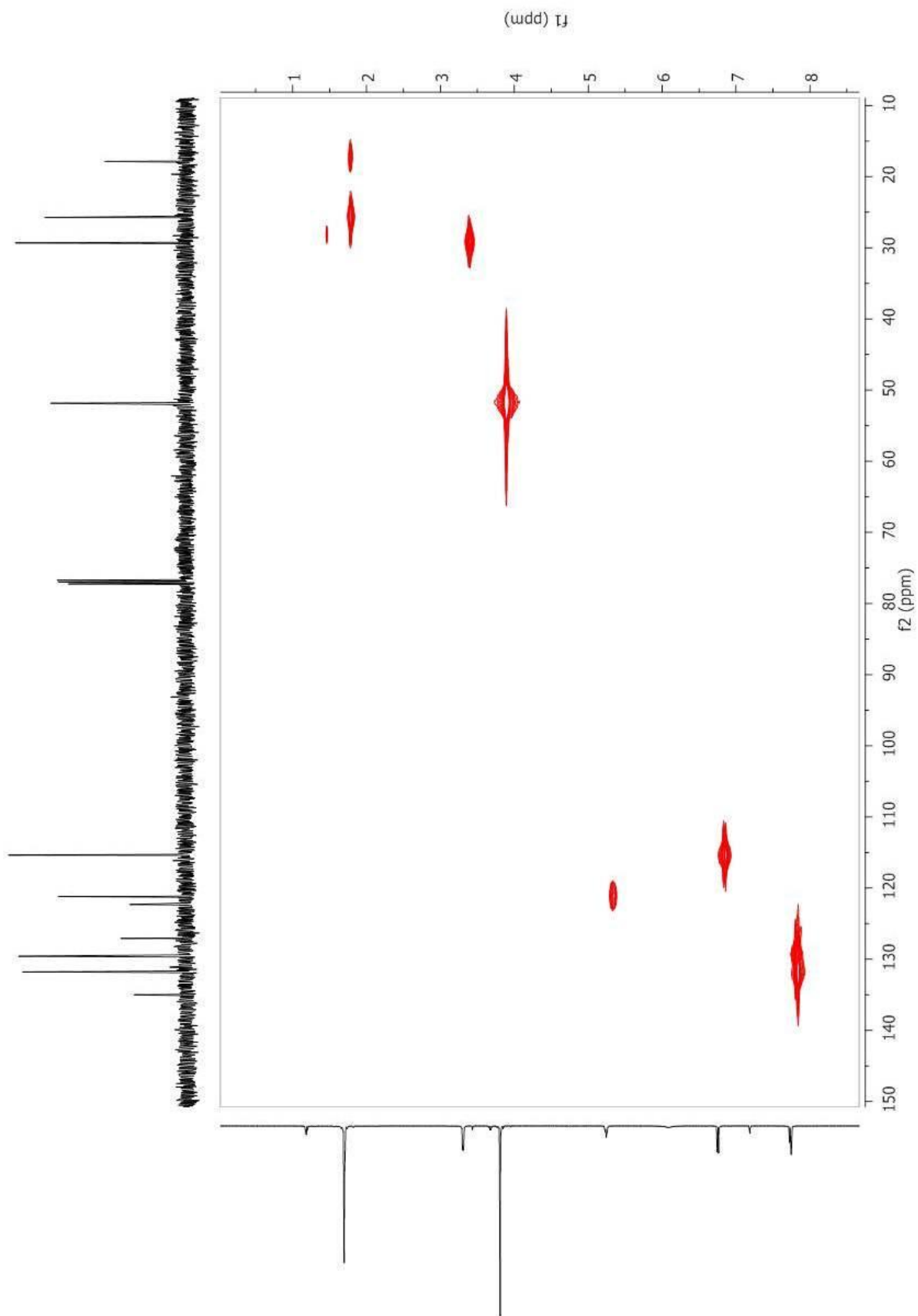
**Espectro 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Espectro 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

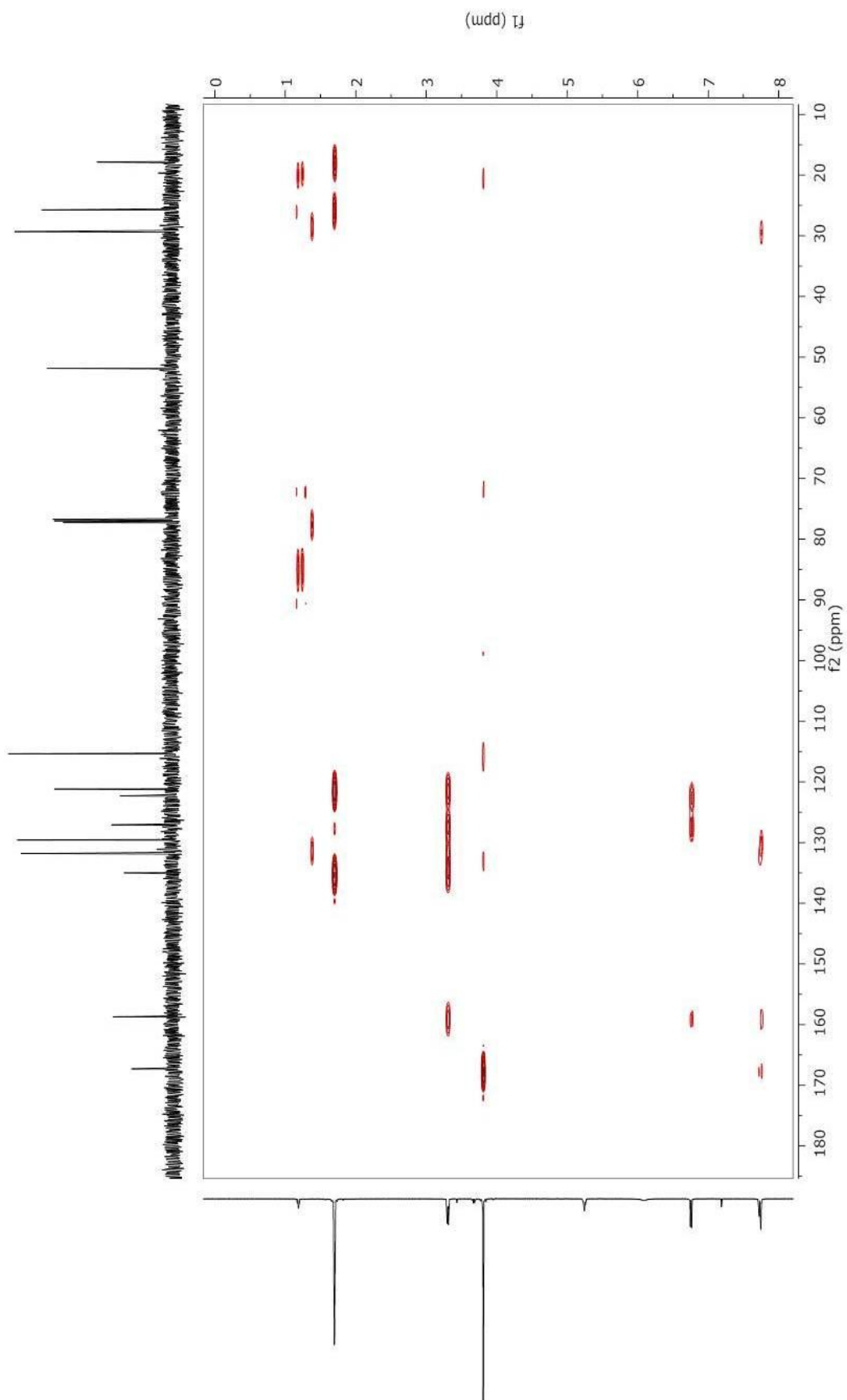
**Espectro 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Espectro 21:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

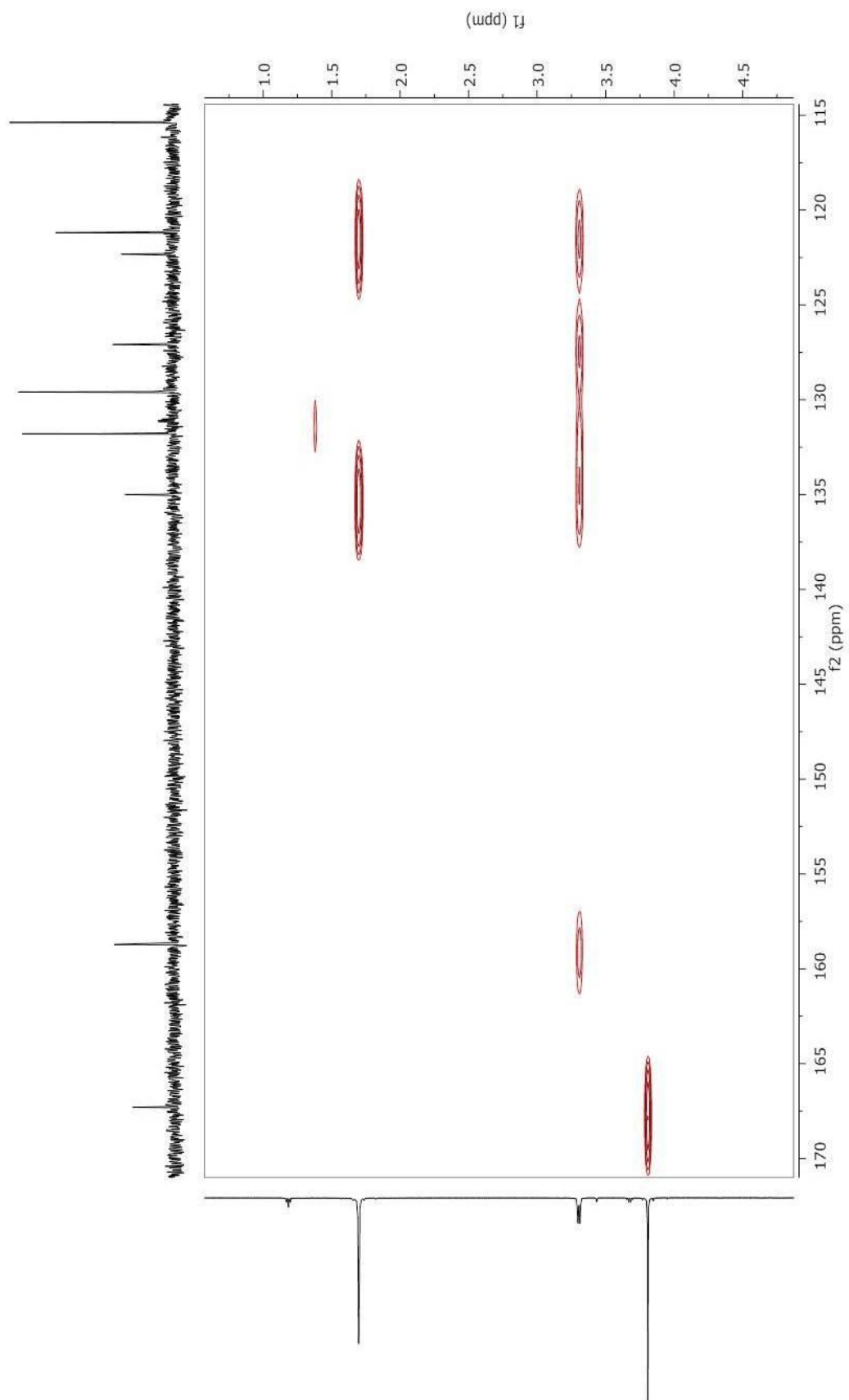
Espectro 22: Mapa de contorno gHSQC da substância 3.

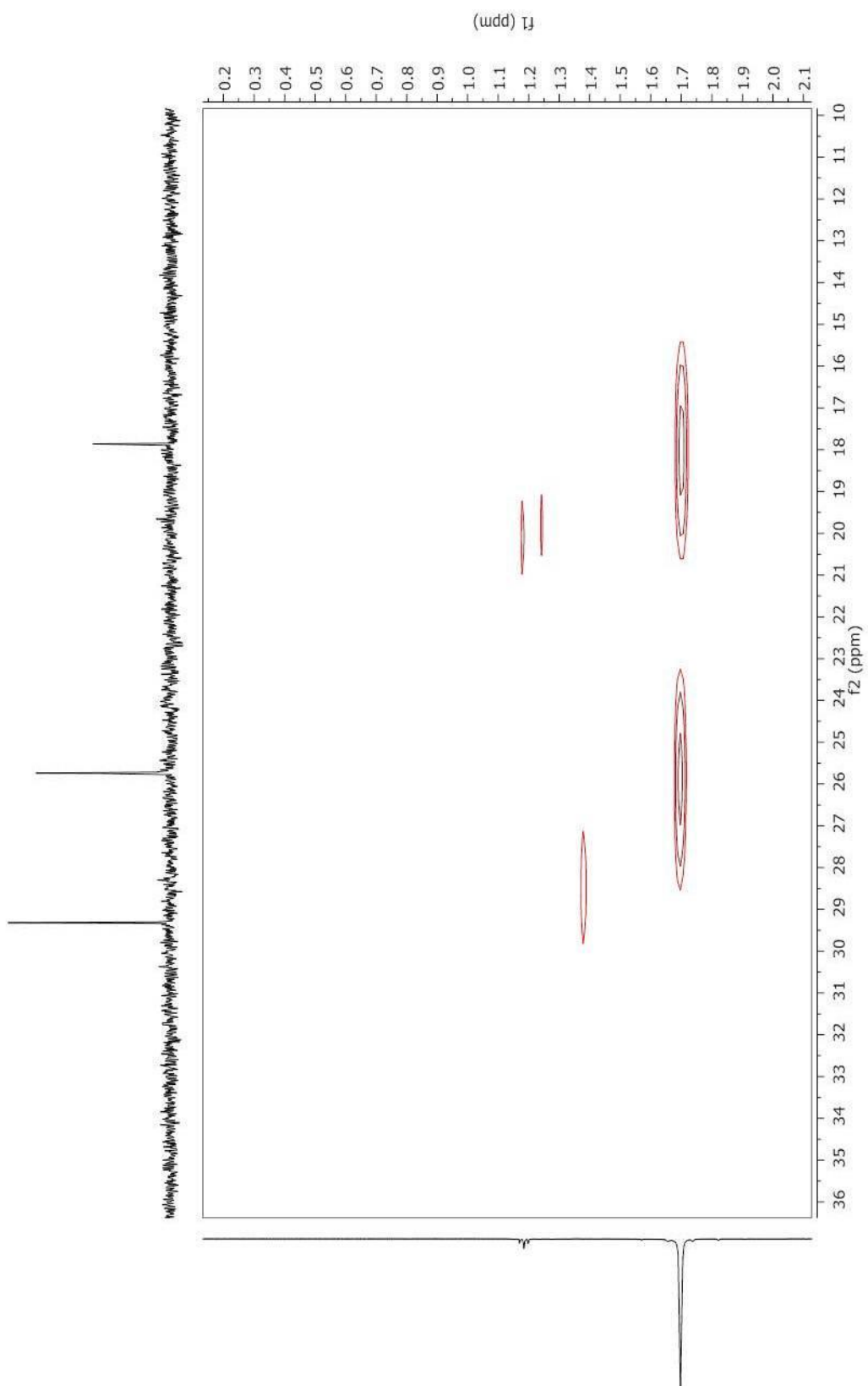


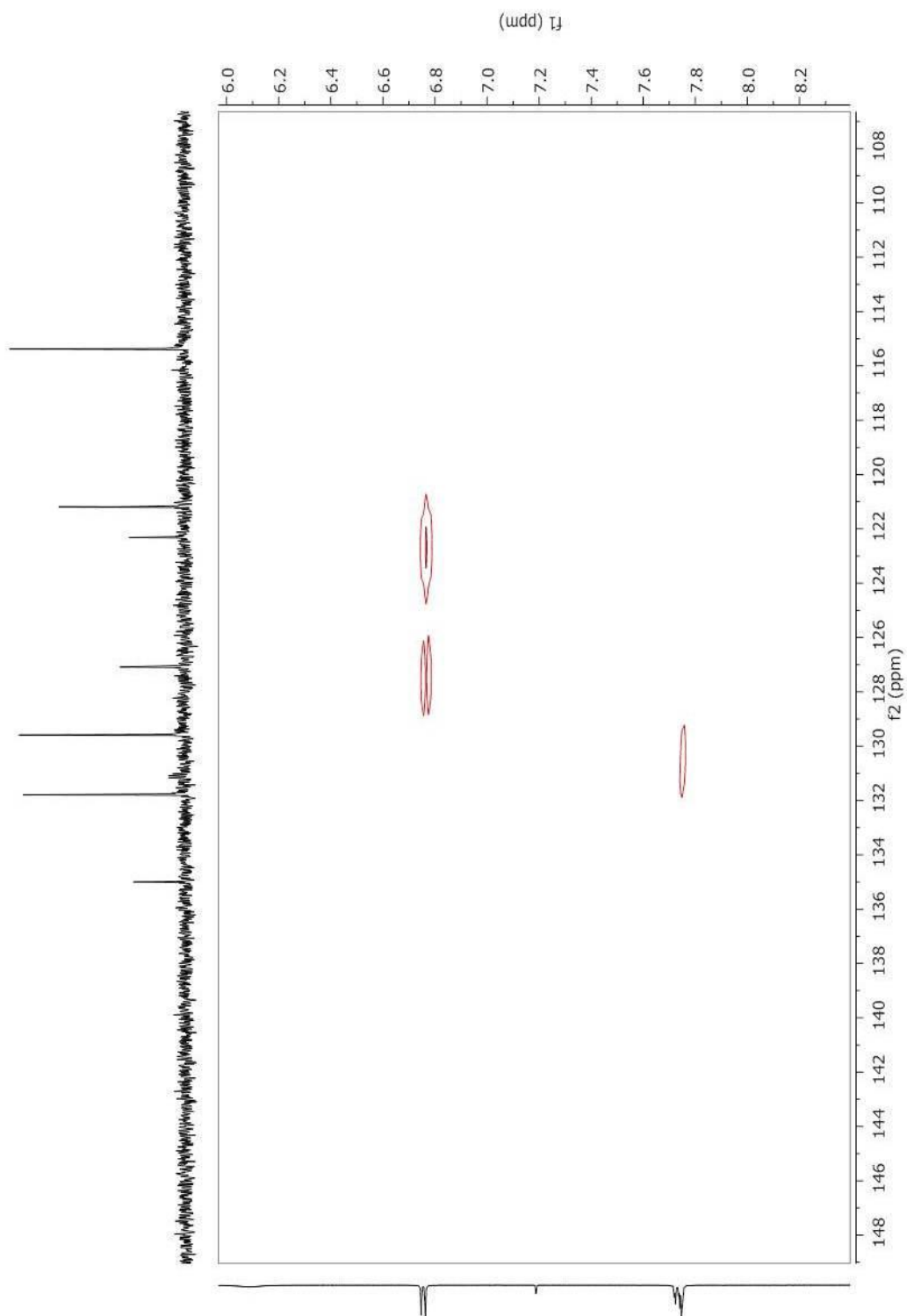
Espectro 23: Mapa de contorno gHMBC da substância 3.

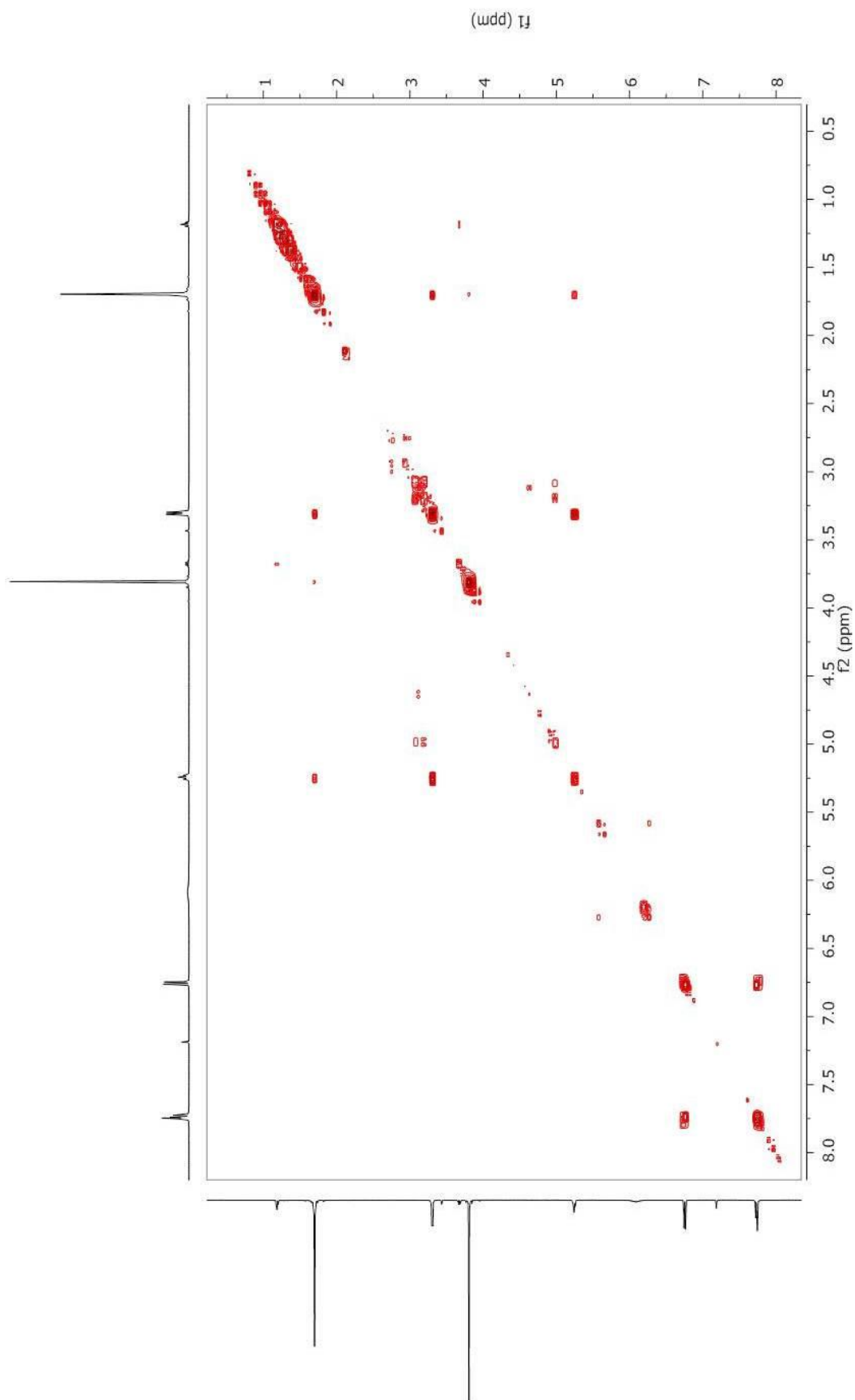


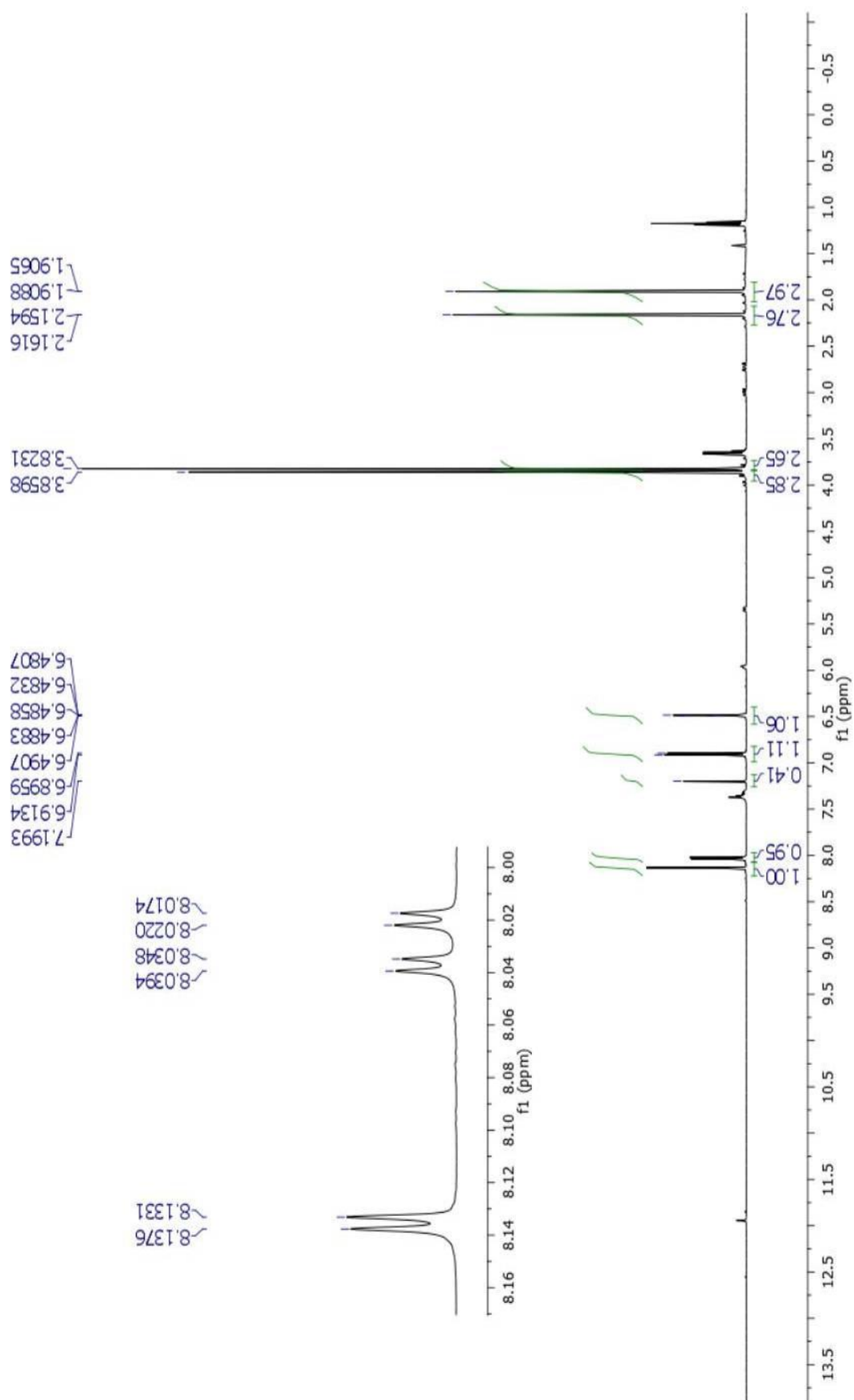


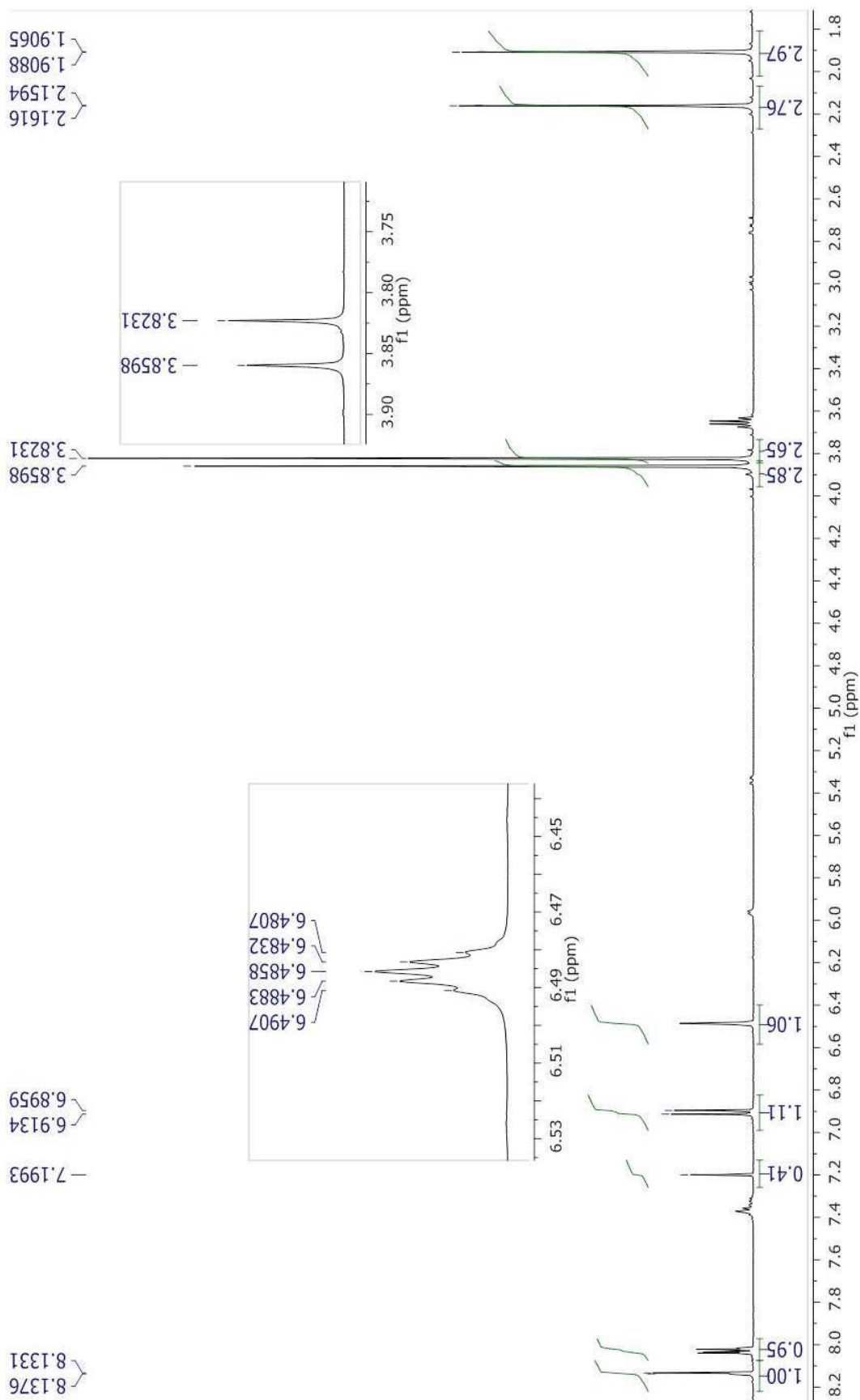
**Espectro 24:** Mapa de contorno gHMBC da substância **3** - Ampliação.

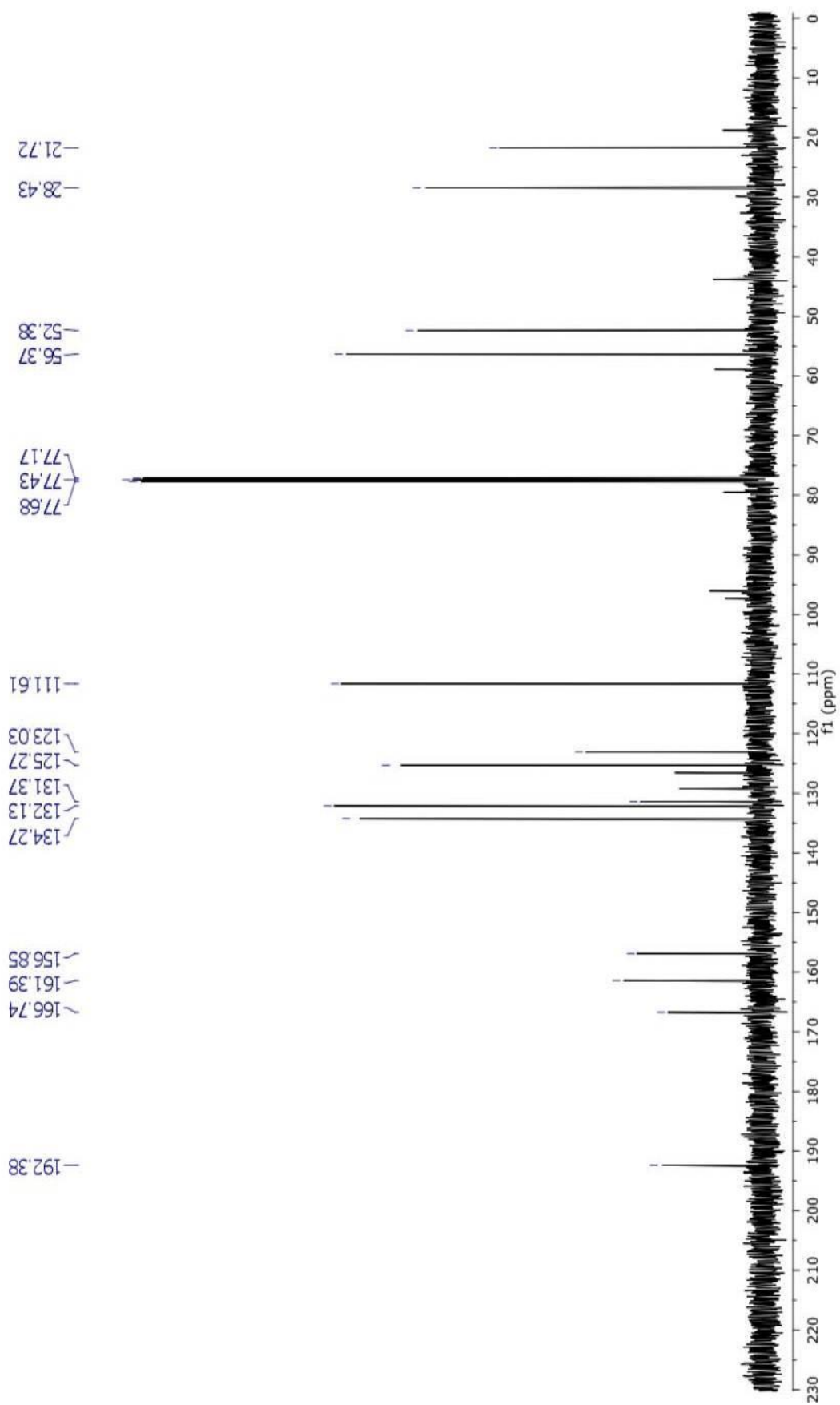
**Espectro 25:** Mapa de contorno gHMBC da substância **3** - Ampliação.

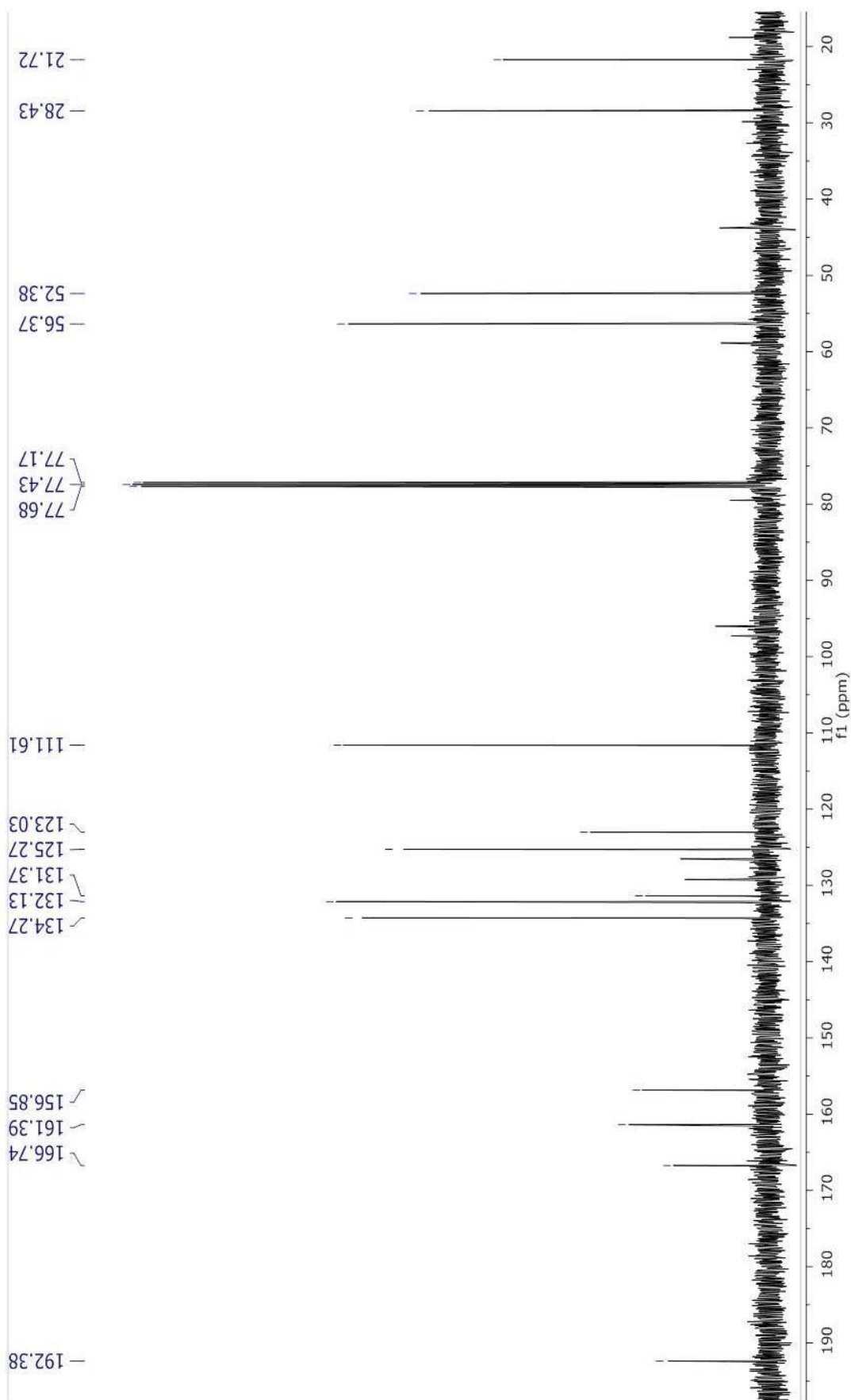
**Espectro 26:** Mapa de contorno gHMBC da substância **3** - Ampliação.

**Espectro 27:** Mapa de contorno COSY da substância **3**.

**Espectro 28:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

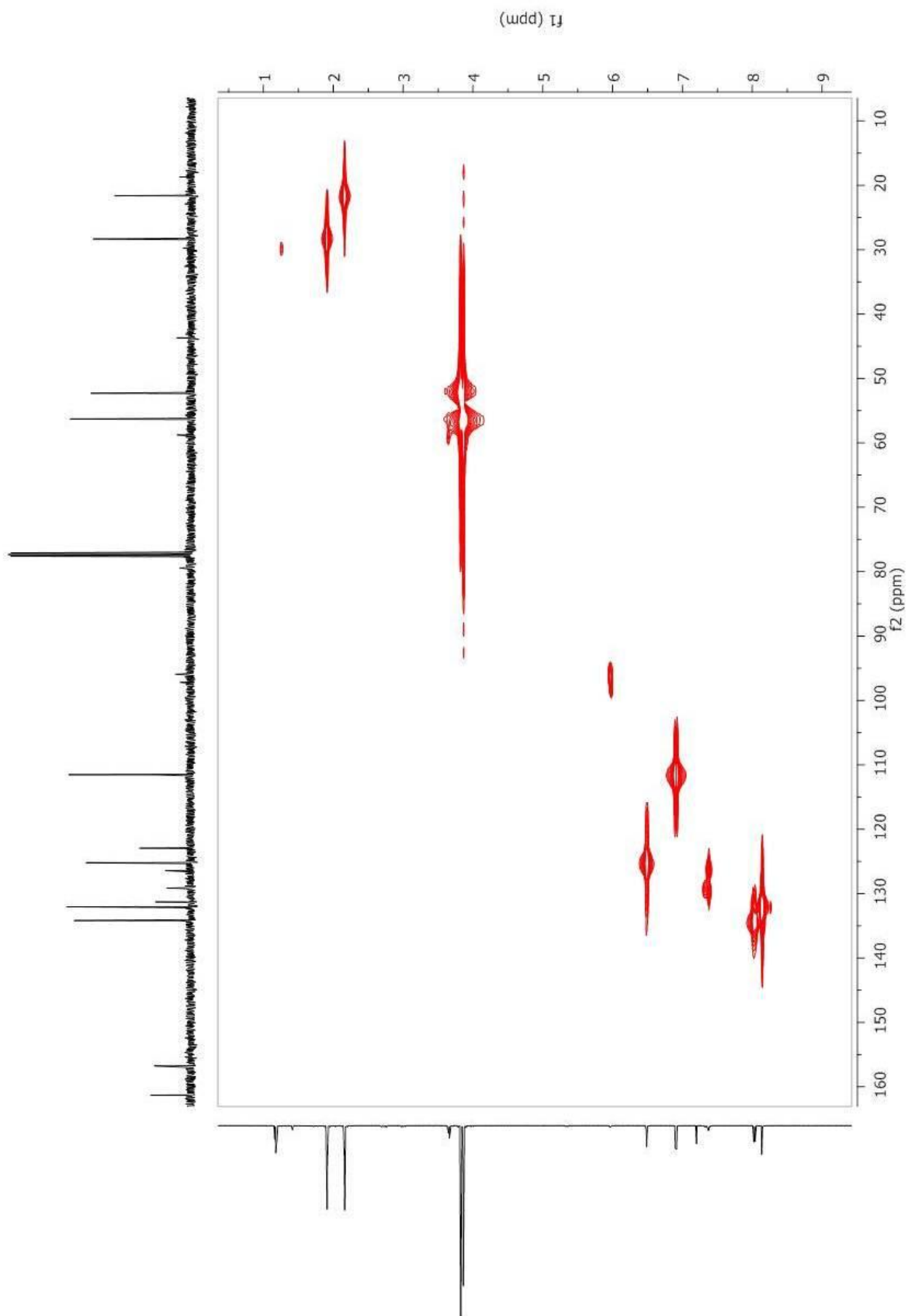
**Espectro 29:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

**Espectro 30:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

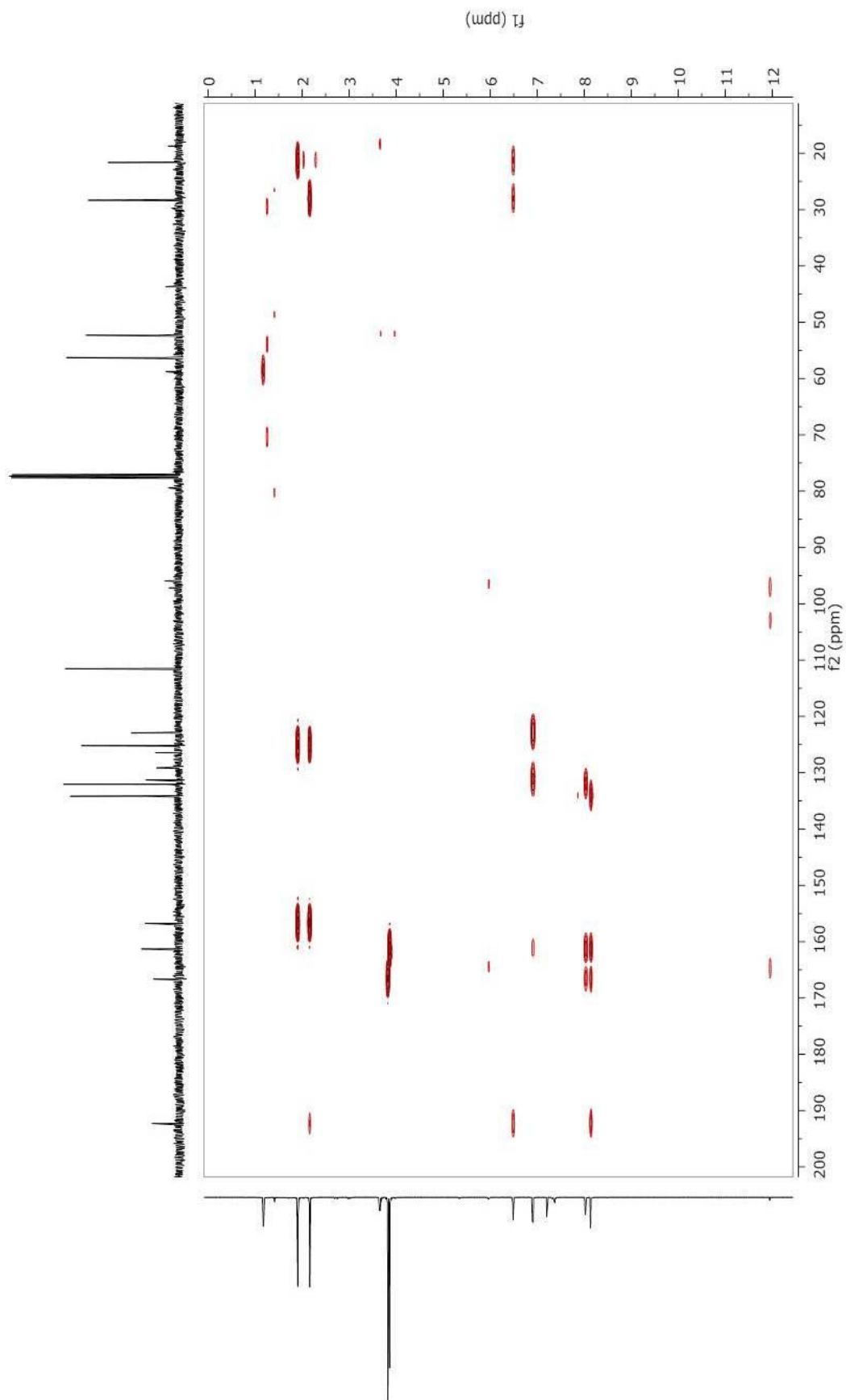
**Espectro 31:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Ampliação.

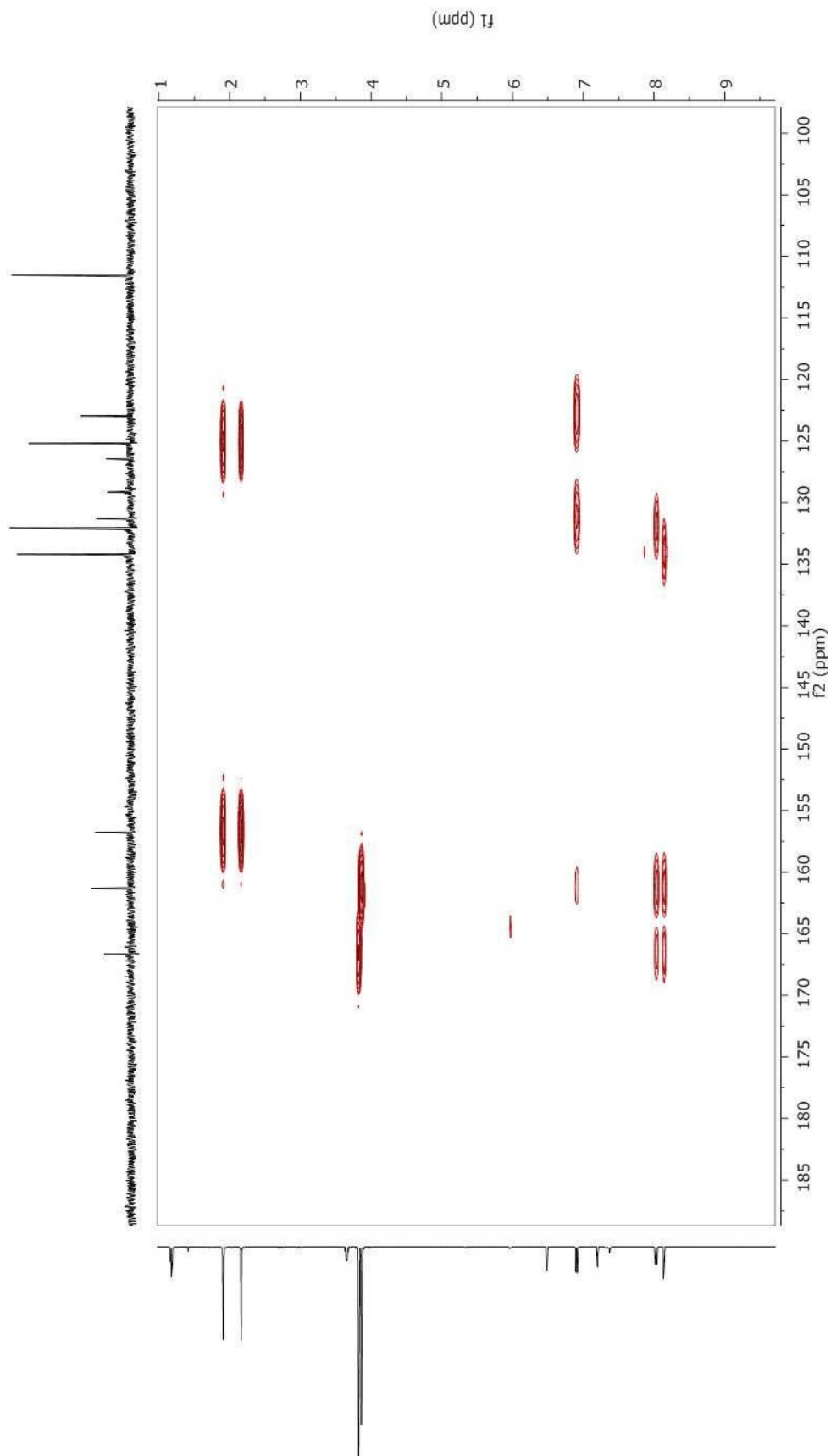


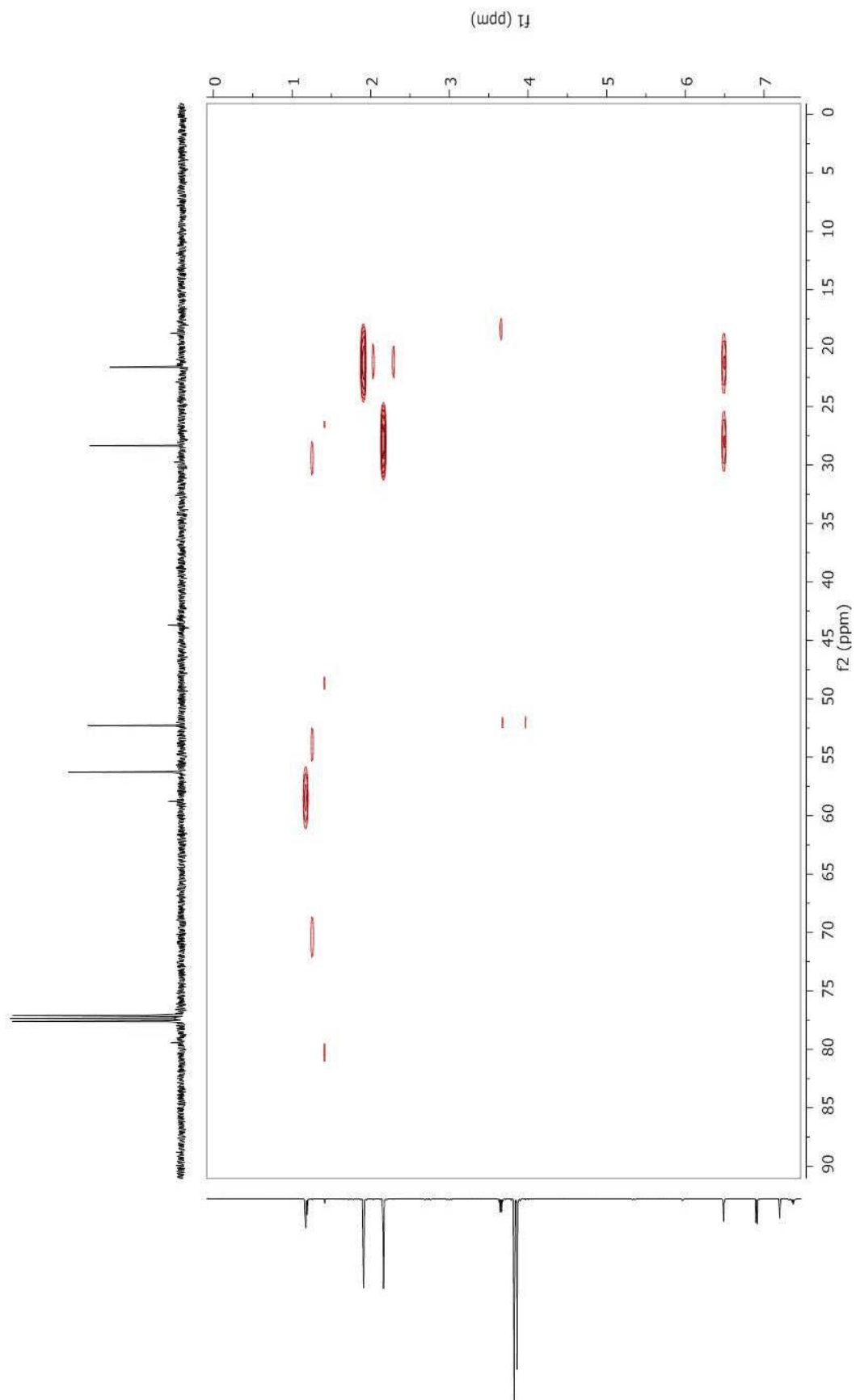
Espectro 32: Mapa de contorno gHSQC da substância 4.

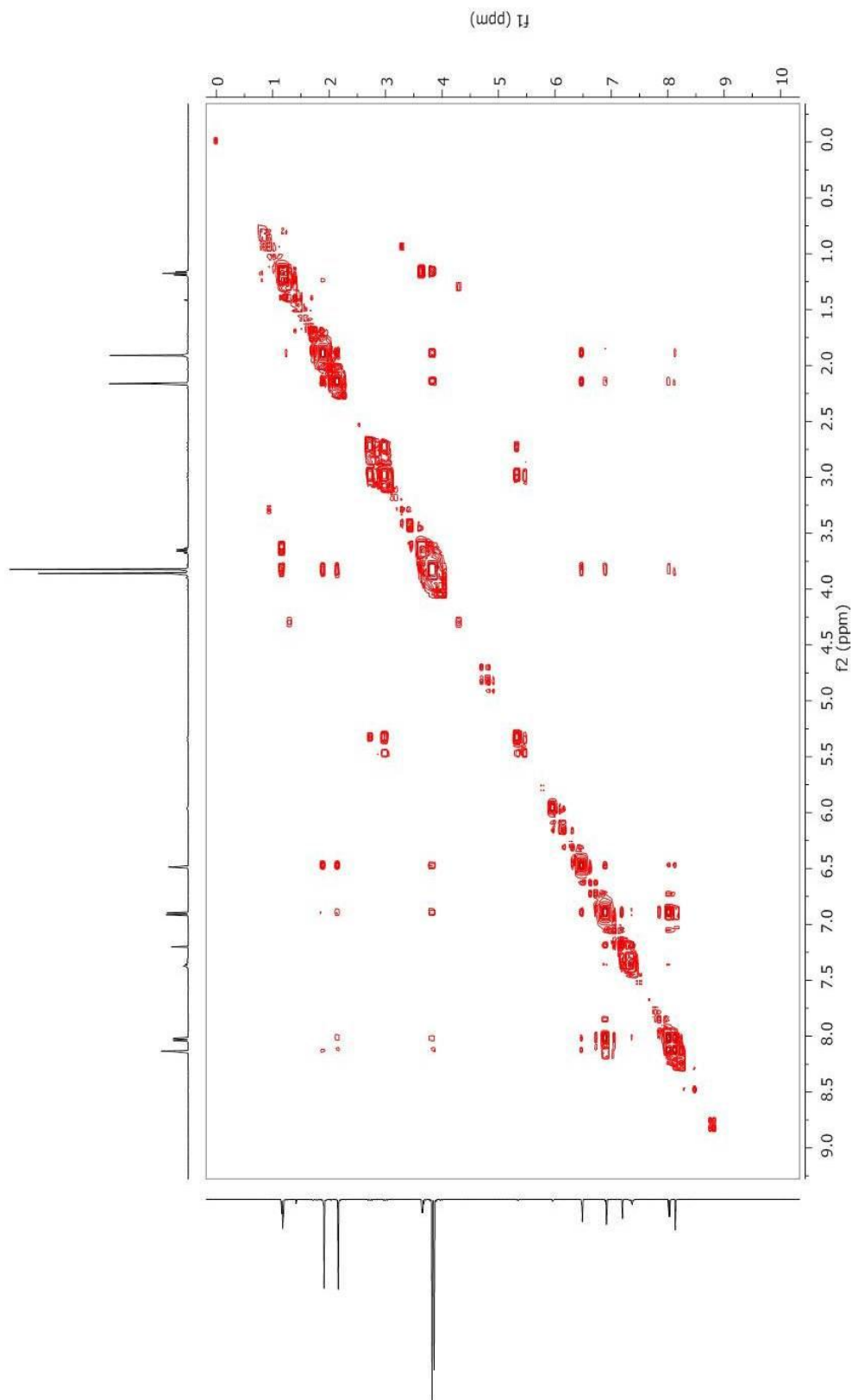


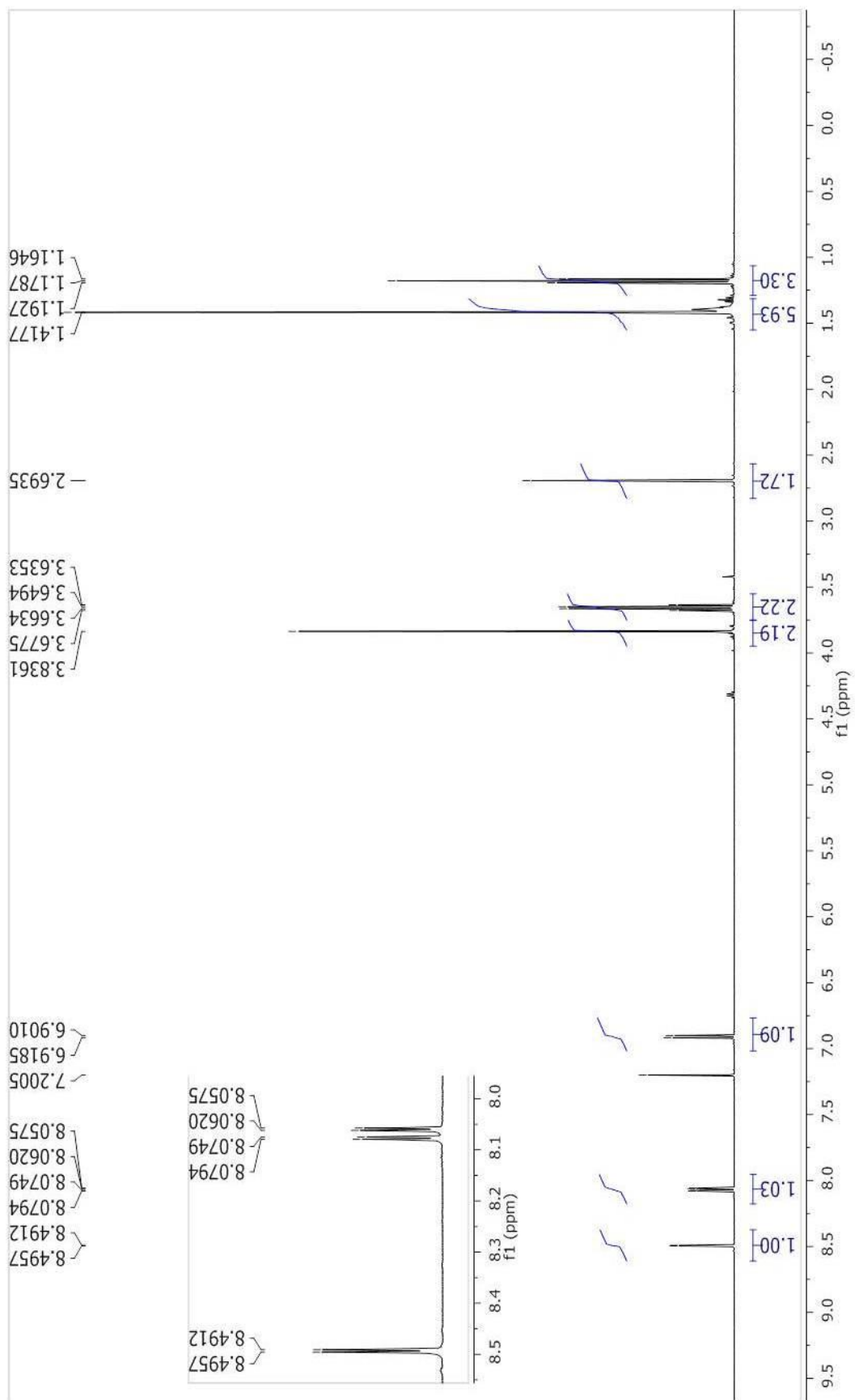
Espectro 33: Mapa de contorno gHMBC da substância 4.

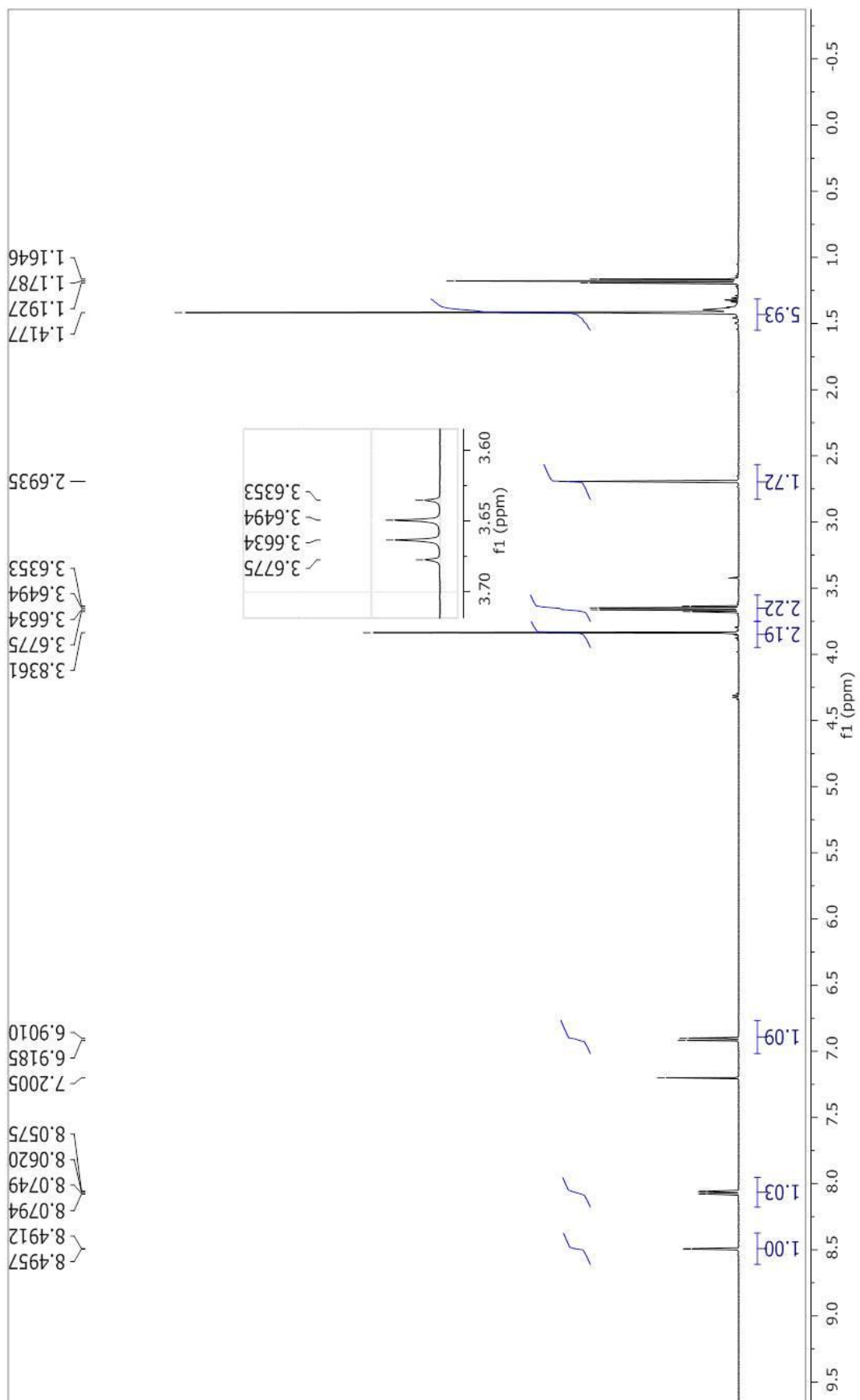


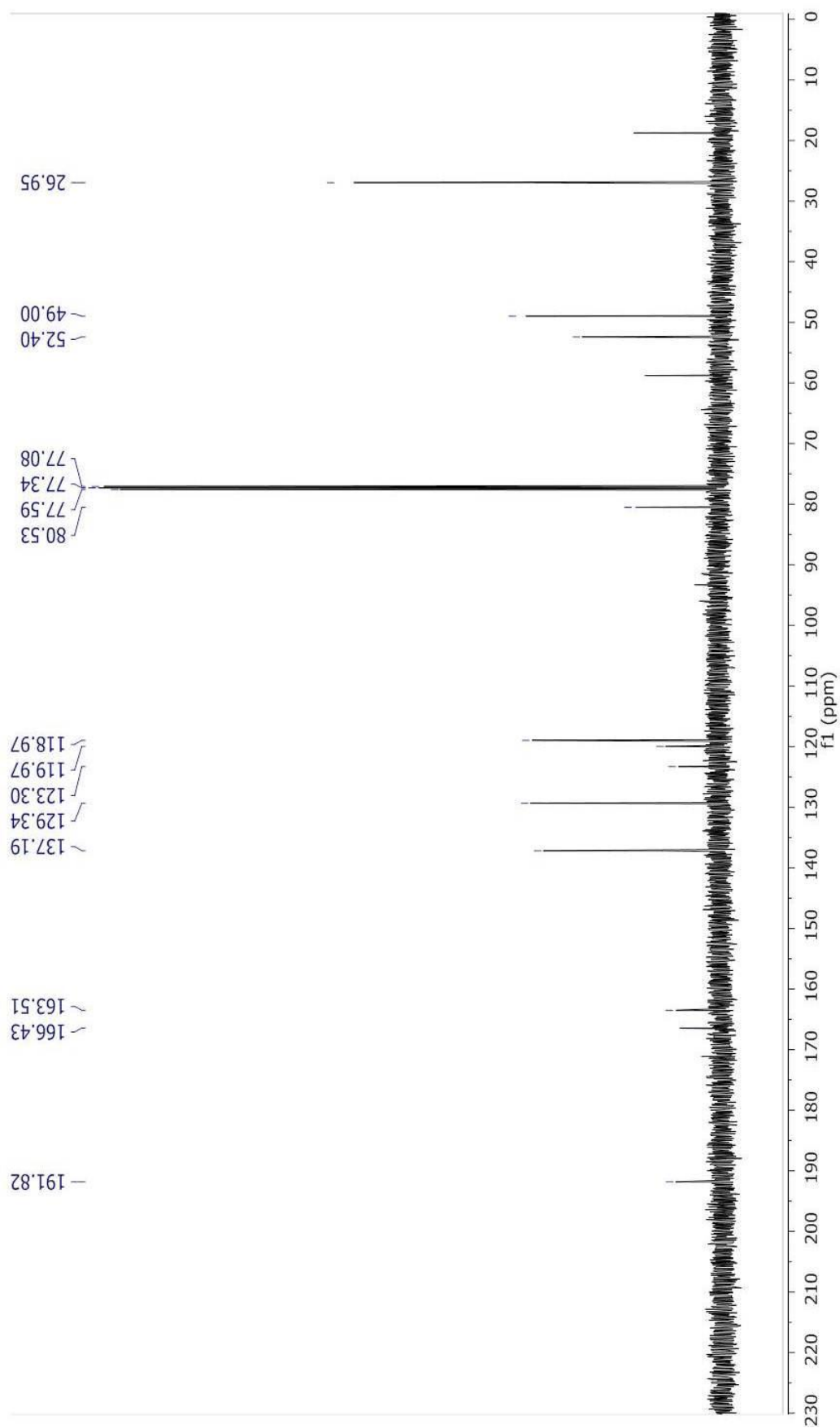
**Espectro 34:** Mapa de contorno gHMBC da substância **4** - Ampliação.

**Espectro 35:** Mapa de contorno gHMBC da substância **4** - Ampliação.

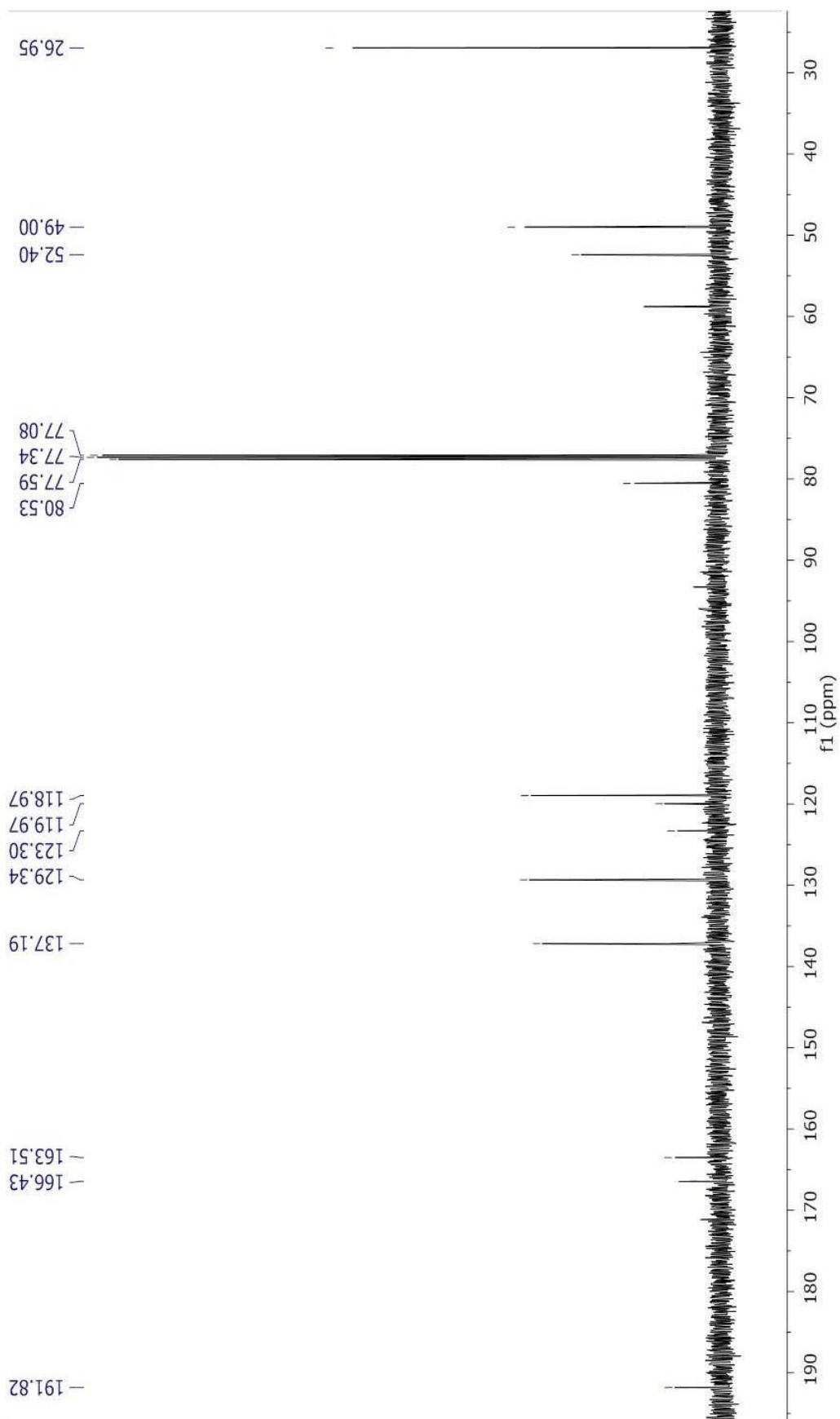
**Espectro 36:** Mapa de contorno COSY da substância 4.

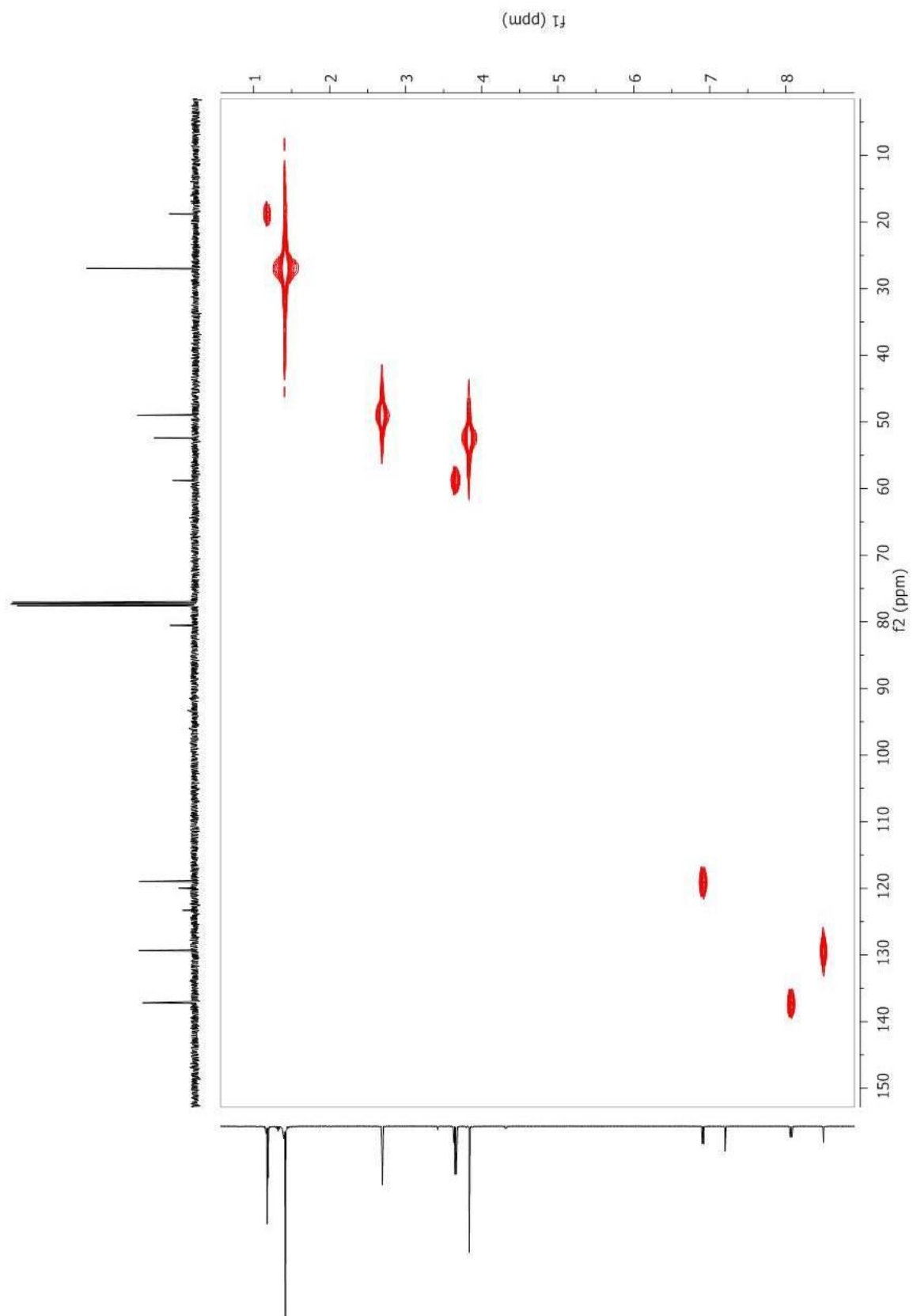
**Espectro 37:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Espectro 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

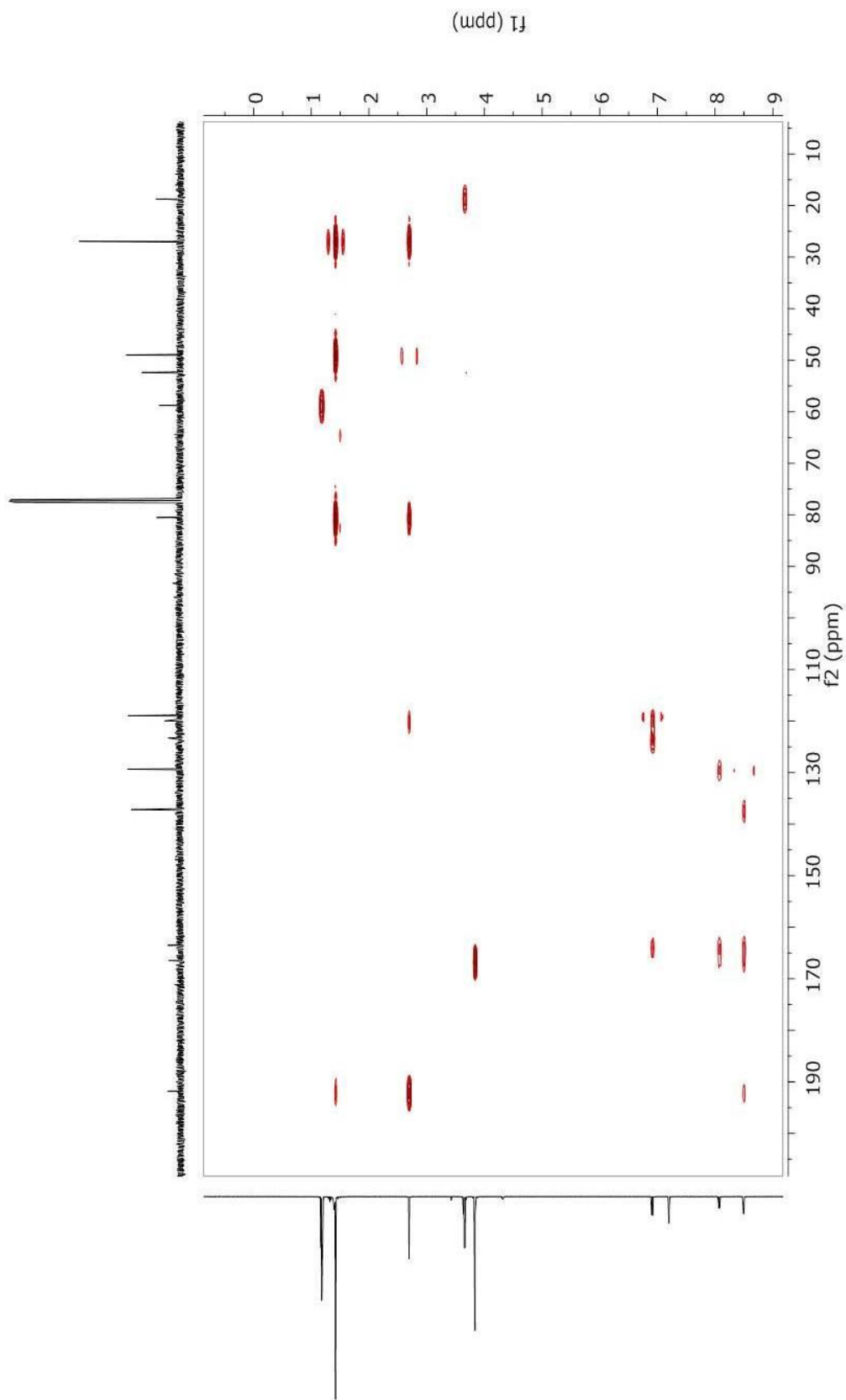
**Espectro 39:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

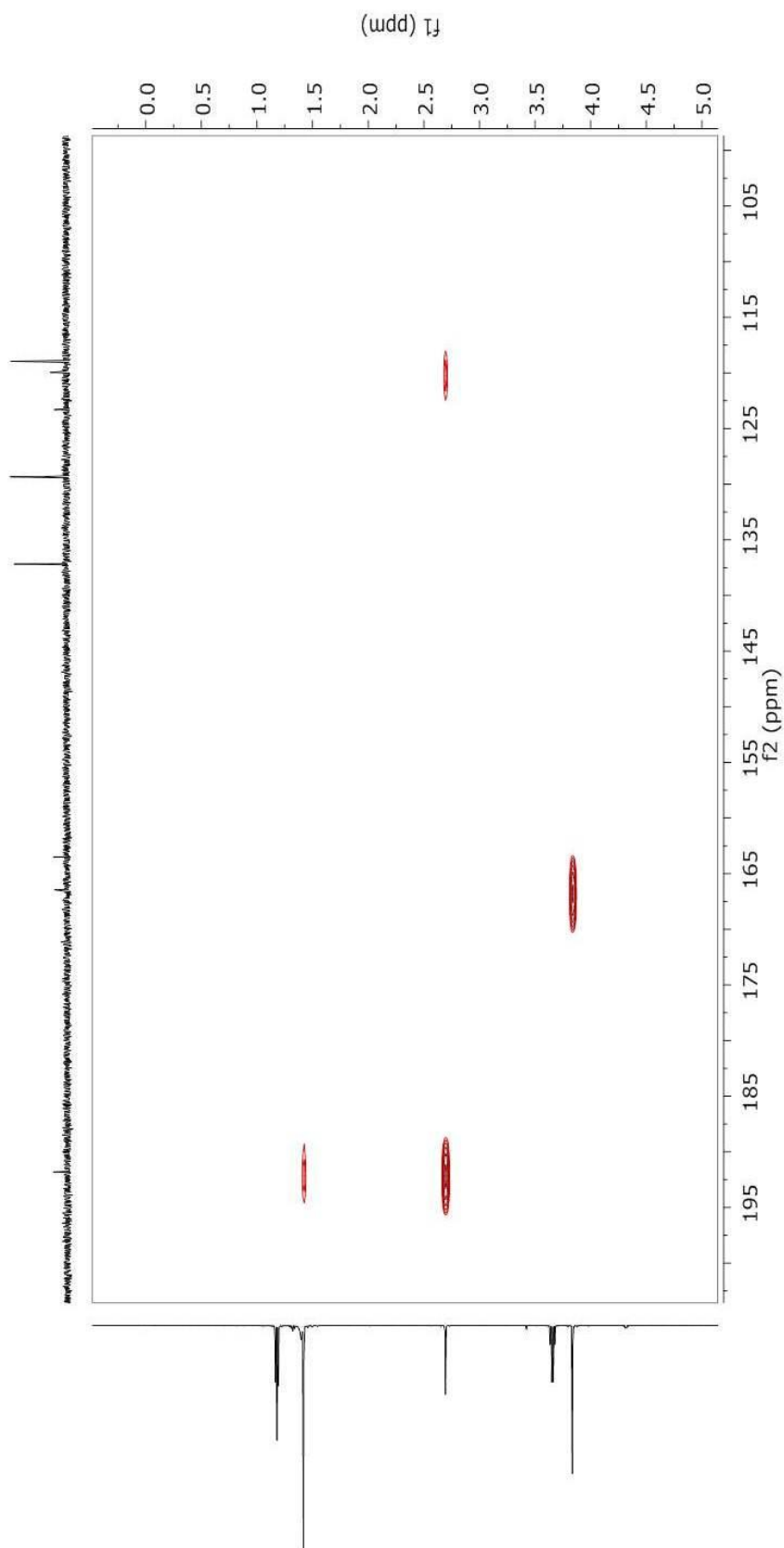


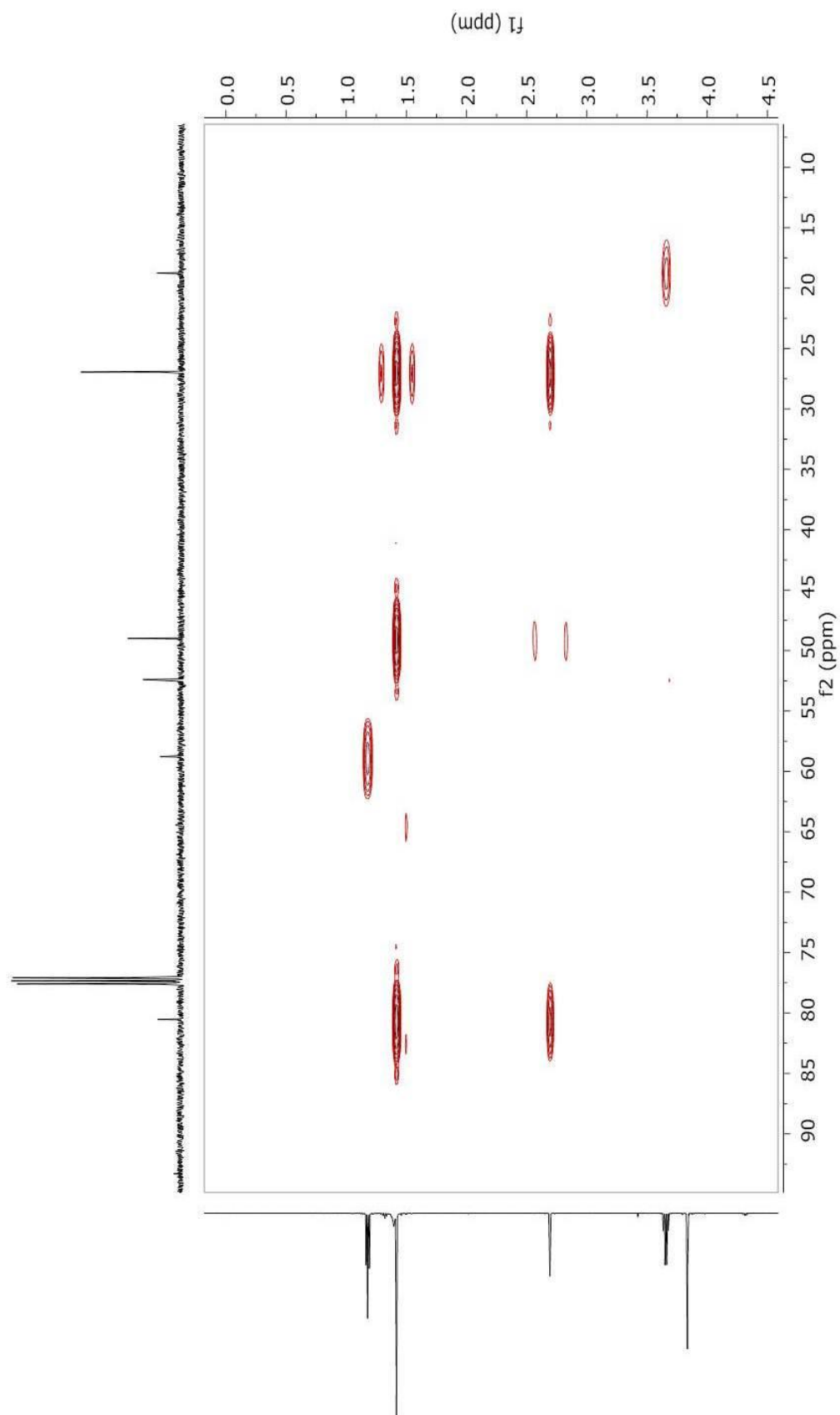
**Espectro 40:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - Ampliação.

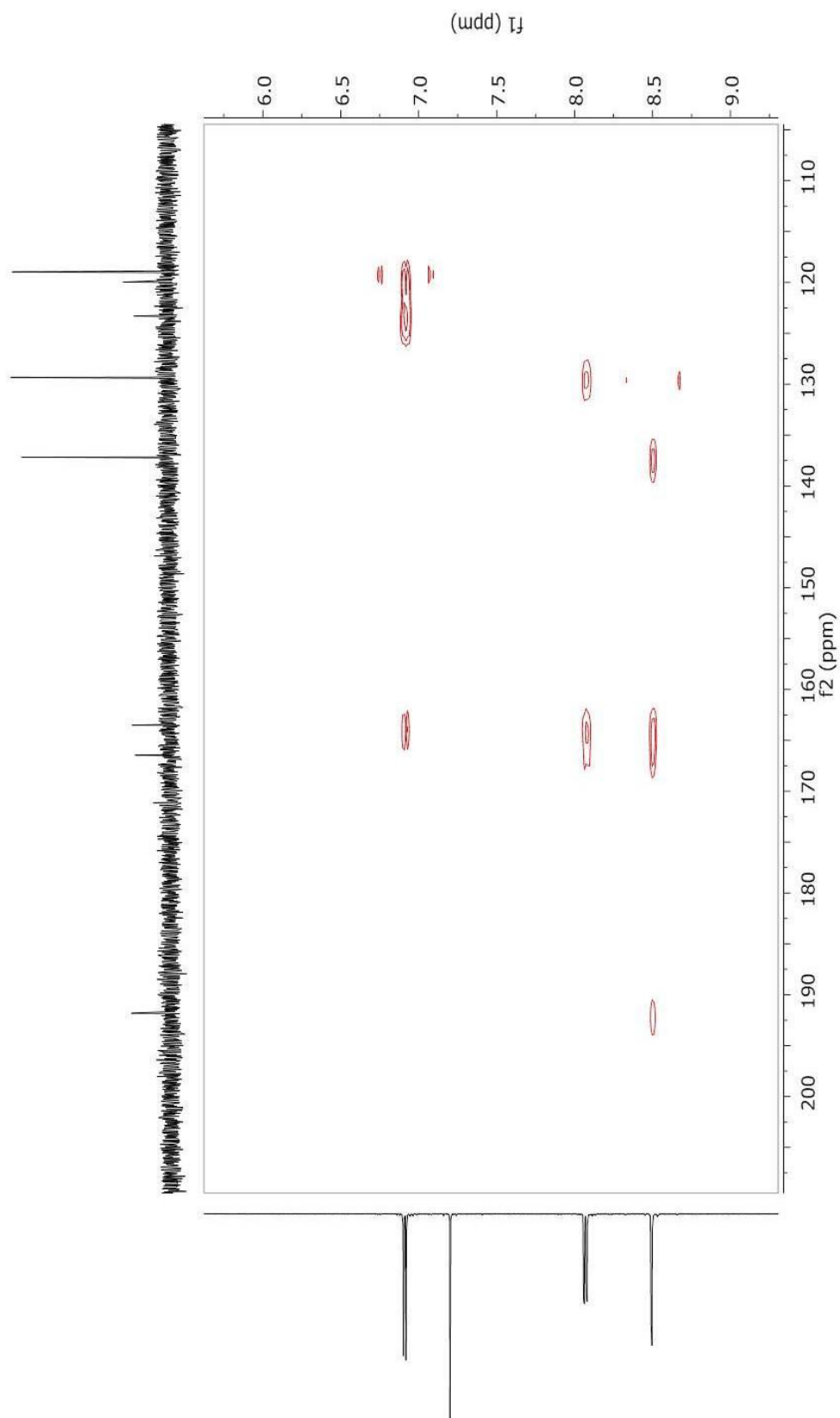
Espectro 41: Mapa de contorno *g*HSQC da substância 5.

Espectro 42: Mapa de contorno gHMBC da substância 5.



**Espectro 43:** Mapa de contorno gHMBC da substância **5** - Ampliação.

**Espectro 44:** Mapa de contorno gHMBC da substância **5** - Ampliação.

**Espectro 45:** Mapa de contorno gHMBC da substância **5** - Ampliação.

**Espectro 46:** Mapa de contorno COSY da substância 5.