

RESSALVA

Devido ao tamanho do arquivo "Anexo" e das dificuldades decorrentes para exibição do mesmo na web, não pudemos inserí-lo e, aos interessados, favor entrar em contato com a autora, através do e-mail:
lidiane_ig@yahoo.com.br

Equipe da C@thedra

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
ARARAQUARA – SP

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO METABOLÔMICO E PROTEÔMICO EM
PEPEROMIA BLANDA (Piperaceae)**

Mestranda: Lidiane Gaspareto Felippe

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre, no curso de pós-graduação em Química, área de concentração Química Orgânica.

2008

INFORMAÇÕES CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome	Lidiane Gaspareto Felipe
Filiação	Cladecir Gaspareto e Isabel Cristina Gaspareto
Nascimento	06/10/1981 - Araraquara/SP - Brasil
Estado Civil	Casada
Endereço residencial	Rua dos Bombeiros, 55 Jardim Tabapuã - Araraquara 14810-300, SP - Brasil Telefone: (16) 3339-4933
Endereço profissional	Instituto de Química de Araraquara – UNESP Departamento de Química Orgânica Rua Prof. Francisco Degni, S/N Quitandinha - Araraquara 14800-970, SP - Brasil Telefone: (16) 3301-6600 – ramal 6788
e-mail	lidiane_iq@yahoo.com.br

2. Formação Profissional

2.1. Graduação

Curso: Licenciatura em Química

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP

Período: março de 2001 a dezembro de 2005.

2.2. Iniciação Científica Tecnológica Industrial

Empresa: Natura

Período: 01/2003 à 12/2004

Projeto: "Validação de *Calycophyllum spruceanum* como cosmético funcional", no âmbito de Fundo Verde-Amarelo - convênio FINEP/NATURA/FACTE sob orientação dos professores Dra. Vanderlan de S. Bolzani e Dr. Alberto José Cavaleiro, com bolsa financiada pela CNPq (ITI).

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 metabolômico e proteômico em *Peperomia blanda* (Piperaceae)”

Orientadora: Maysa Furlan

Período: março de 2006 a junho de 2008

3. Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Peperominas de *Peperomia blanda* (Piperaceae).

In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008. Águas de Lindóia -SP.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. A new tetrahydrofuran lignan and other metabolites from *Peperomia blanda*.

In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro – SP.

CÉSAR, F. S.; MOTA, J. S.; SILVA, F. C.; FELIPPE, L. G.; BOLZANI, V. S.; PASSERINI, G. D.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Avaliação biológica dos extratos de *Piper fuligineum* Kunth (Piperaceae). **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007, Araraquara – SP.

ANDRADE, M. M. G.; FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Estudo fitoquímico de *Piper flavoviride*.

In: XVIII Congresso de Iniciação Científica, 2006, Bauru – SP.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Avaliação da atividade tripanocida de lignanas tetraidrofurânicas de *Peperomia blanda* (Piperaceae).

In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia -SP.

FELIPPE, L. G.; BERGAMO, D. C. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda* (Piperaceae).

In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto - SP

FELIPPE, L. G.; FURLAN, M.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S. Metaboloma de *Peperomia blanda* (Piperaceae).

In: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005, Araraquara - SP.

FELIPPE, L. G.; CAVALHEIRO, A. J.; TELASCREA, M.; BOLZANI, V. S. Isolamento e avaliação das atividades antitumoral e antifúngica de desacetil-criptocarialactona.

In: 26ª Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas – SP.

4.Trabalhos publicados

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

Dedico...

À DEUS,

Por ser tão bom amigo e estar ao meu lado a todo segundo

Aos meus pais Claudécir e Isabel,

Por prestarem-me atenção e gastarem tão grande parte do tempo comigo.

Por agirem sempre do modo que desejaram que eu agisse.

Por confiarem em mim mesmo quando eu acreditava que não seria capaz.

Pelos elogios e pelos incentivos.

Por terem me ensinado que para ser feliz eu tinha que ser eu mesma e não igual a outros e que era assim que vocês me admiravam.

Por serem vocês mesmos e por não desistirem da felicidade.

Com isso eu aprendi a buscar uma vida feliz, bem sucedida e satisfatória.

Pelo amor que sempre me dedicaram,

Pelo apoio que sempre me propiciaram,

Meu amor e reconhecimento eterno...

À querida Profa. Maysa, a qual serei eternamente grata pelos ensinamentos de química e de vida. Sua dedicação e entusiasmo sempre me incentivaram, tornando possível a realização deste trabalho, e foram fundamentais para minha formação profissional e desenvolvimento pessoal.

Ao meu marido Sílvio

*Por estar sempre do meu lado, cuidando de mim com paciência e carinho,
me apoiando e incentivando em todos os momentos.*

*Aos meus irmãos Juliana e Felipe pelo carinho, amor, companheirismo,
brigas e todas as outras coisas boas que só a gente sabe, e também ao meu
cunhado Chiquinho pelo bom humor de sempre .*

*À minha segunda mãe, Debora, que além de me adotar de coração e
participar de cada etapa deste trabalho, ainda me proporcionou o privilégio
de ter sua amizade e conviver com sua família.*

Agradecimentos

À minha família, meu alicerce.

Ao Instituto de Química, que me proporcionou inúmeras realizações, desde o CUCA, o ingresso na graduação e, finalmente, com a elaboração deste projeto.

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pelos conselhos durante o desenvolvimento do projeto.

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

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, pelos papos no café e acima de tudo pela amizade.

Ao Ms. Alberto Camilo Alécio, pela obtenção dos espectros de massa, por estar sempre pronto a ajudar em qualquer situação e pelas risadas.

Ao Prof. Dr. Alberto Cavalheiro pela minha iniciação na química de produtos naturais.

Ao Ms. Daniel Rinaldo, pelos espectros de dicroísmo circular, amizade e disputas no pebolim.

À equipe da Profa Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli pelas discussões e pela realização dos testes *in vitro* em cepas de *Trypanosoma cruzi*, no Laboratório de Imunologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, em Araraquara, e principalmente às pós-graduanadas Daniela Luz Ambrósio e Gabriela Duó Passerini, por terem realizados os experimentos.

A Ms. Amanda Danuello pela gentil ajuda nas reações e pelo convívio.

Ao grupo da Profa. Maysa: Adriana, Débora, Fernando, João Marcos, Silvia, Vâninha, Cris, pelas ajudas incondicionais, discussões e acima de tudo, amizade.

Aos grandes amigos do Departamento de Química Orgânica que ainda estão ou já passaram por lá. Uma família adquirida pelo convívio, que sempre me proporcionou muito incentivo, companheirismo, momentos de alegria e que possui muitos nomes, os quais não citarei, mas cada um lembrado com grande carinho e importância que adquiriram durante o decorrer destes sete anos. As festinhas de defesa e de final de ano, reuniões e congressos serão para sempre lembradas.

Aos meus amigos da graduação: Camila, Carla, Daniel, Wander, Eduardo, que apesar de termos encontrados destinos diferentes e estarmos agora distantes, a nossa amizade continua forte e será eterna no meu coração.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Sandra, Célia, Patrícia, e pela atenção e dedicação aos serviços prestados.

Às secretárias da direção e amigas Shirlei e Cíntia pela dedicação e disposição em ajudar.

Às funcionárias da biblioteca, pelo agradável convívio e ajudas tão importantes.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

*"Que nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de
que as grandes proezas da história, foram conquistas do que
parecia impossível."*

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Naturais.....	1
1.2. Piperaceae – <i>Peperomia</i>	4
1.3. <i>Peperomia blanda</i>	8
1.4. Atividade tripanocida.....	8
1.5. Elucidação de vias biossintéticas	11
1.5.1. Considerações Gerais.....	11
1.5.2. Experimentos <i>in vitro</i>	12
1.5.2.1. Extração de enzimas solúveis	12
1.5.2.2. Preservação da atividade enzimática	13
1.5.2.3. Precipitação de proteínas	15
1.5.2.4. Determinação da concentração de proteínas totais - Método de Bradford	16
1.5.2.5. Eletroforese	17
1.6. Estudo biossintético de <i>Peperomia blanda</i>	18
1.6.1. Biossíntese de lignanas – considerações gerais	18
1.7. Fenilalanina-amônia-liase (PAL).....	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Coleta do material botânico	25
3.2. Cromatografia	25
3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	25
3.2.2. Eletroforese	26
3.3. Solventes	26
3.4. Espectrofotometria UV/Visível	26
3.5. Espectrometria	26
3.5.1. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....	26
3.5.2. Espectros de massas	27
4. PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1. Estudo químico de <i>Peperomia blanda</i>	28
4.1.1. Perfil cromatográfico	28
4.1.2. Extração e purificação de substâncias.....	29
4.2. Atividades biológicas.....	37
4.2.1. Ensaio tripanocida <i>in vitro</i>	37
4.3. Estudo biossintético de <i>Peperomia blanda</i>	38
4.3.1. Determinação da atividade enzimática da PAL em folhas de plantas adultas de <i>Peperomia blanda</i>	38
4.3.1.1. Extração enzimática	38
4.3.1.2. Precipitação fracionada.....	39
4.3.1.3. Dessalinação	40
4.3.1.4. Determinação da concentração protéica	41
4.3.2. SDS-PAGE	41
4.3.3. Ensaio enzimático	45
4.3.3.1. Procedimento geral	45
4.3.3.2. Variação da concentração de fenilalanina.....	46

4.3.3.3. Variação do tempo de reação	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Estudo químico de <i>Peperomia blanda</i>	47
5.1.1. Perfil cromatográfico	47
5.1.2. Determinações Estruturais	49
5.1.2.1. Lignanas tetraidrofurânicas.....	49
5.1.2.1.1. Considerações gerais.....	49
5.1.2.1.2. Lignana tetraidrofurânica 1	50
5.1.2.1.3. Lignana tetraidrofurânica 2	53
5.1.2.1.4. Lignana tetraidrofurânica 3	55
5.1.2.1.5. Lignana tetraidrofurânica 4	57
5.1.2.1.6. Lignana tetraidrofurânica 5	59
5.1.2.2. Secolignanas	63
5.1.2.2.1. Considerações gerais.....	63
5.1.2.2.2. Secolignana 6	64
5.1.2.2.3. Seco-lignanas 7 e 8	66
5.1.2.2.4. Secolignana 9	70
5.1.2.2.5. Secolignana 10	72
5.1.2.3. Flavonóides	77
5.1.2.3.1. Considerações gerais.....	77
5.1.2.3.2. Flavona 11.....	78
5.1.2.3.3. Flavona 12.....	78
5.1.2.4. Policetídeos	82
5.1.2.4.1. Considerações gerais.....	82
5.1.2.4.2. Policetídeo 13.....	85
5.1.2.4.4. Policetídeo 14.....	87
5.3. Análise do perfil cromatográfico do extrato AcOEt das folhas de <i>Peperomia blanda</i> . .	91
5.2. Avaliação da atividade tripanocida.....	93
5.3. Estudo biossintético de <i>Peperomia blanda</i>	95
5.3.1. Obtenção da PAL de folhas de <i>Peperomia blanda</i>	95
5.3.2. Ensaio enzimáticos	97
5.3.3. Caracterização da PAL de <i>P. blanda</i>	101
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS.....	107
ESPECTROS	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do paclitaxel, da morfina e da penicilina G.	2
Figura 2: Semi-síntese do paclitaxel (Souza, 2004).....	3
Figura 3: Espécies de <i>Peperomia</i> utilizadas como plantas ornamentais.....	6
Figura 4: Fotos de <i>Peperomia blanda</i> com seus frutos. http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/dcs420/mi15/mi15044.jpg (15/06/2007).....	8
Figura 5: Mapa de incidência mundial da doença de Chagas (em vermelho)	9
Figura 6: Ciclo do protozoário flagelado <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Figura 7: Benznidazol (Rochagan®)	11
Figura 8: Ligação dos carbonos 8 e 8' de duas unidade C ₆ C ₃ para formação das lignanas.....	19
Figura 9: Via fenilpropanoídica geral de formação das lignanas e neolignanas.....	20
Figura 10: Formação de um radical fenóxido iniciado por peroxidases e lacases e suas estruturas de ressonância.....	21
Figura 11: Estrutura da fenilalanina-amônia-liase (PAL).....	22
Figura 12: Mecanismo de reação da transformação de <i>L</i> -fenilalanina em ácido <i>trans</i> -cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL).....	23
Figura 13: Foto de <i>Peperomia blanda</i> inteira (autoria da foto: Lidiane G. Felipe).....	28
Figura 14: Cromatogramas obtidos via CLAE das partes aéreas, raízes e frutos de <i>Peperomia blanda</i>	48
Figura 15: Estruturas químicas das lignanas tetraidrofurânicas de <i>P. blanda</i>	49
Figura 16: Estrutura química de 1	50
Figura 17: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 1	52
Figura 18: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 1	52
Figura 19: Estrutura química de 2	53
Figura 20: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 2	54
Figura 21: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 2	54
Figura 22: Estrutura química de 3	55
Figura 23: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 3	56
Figura 24: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 3	56
Figura 25: Estrutura química de 4	57
Figura 26: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4	58
Figura 27: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D para a substância 4	58
Figura 28: Estrutura química de 5	59
Figura 29: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5	60
Figura 30: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D para a substância 5	60
Figura 31: Exemplo da estrutura química de uma 1,7- <i>seco</i> -2,7'-ciclolignana.	63
Figura 32: Estruturas químicas das secolignanas isoladas de <i>Peperomia blanda</i>	63
Figura 33: Estrutura química de 6	64
Figura 34: Principais correlações observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HMBC de 6	66
Figura 35: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 6	66
Figura 36: Estrutura química de 7	67
Figura 37: Principais correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 7	68
Figura 38: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 7	68
Figura 39: Estrutura química de 8	68
Figura 40: Principais correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 8	69
Figura 41: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 8	70

Figura 42: Estrutura química de 9	70
Figura 43: Principais correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 9	71
Figura 44: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 9	72
Figura 45: Estrutura química de 10	72
Figura 46: Principais correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 10	74
Figura 47: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 10	74
Figura 48: Tipos de esqueletos carbônicos de flavonóides.....	77
Figura 49: Estrutura química de 11	78
Figura 50: Estrutura química de 12	78
Figura 51: Estruturas químicas dos policetídeos de <i>P. blanda</i>	82
Figura 52: Estrutura química de 13	85
Figura 53: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 14	86
Figura 54: Estrutura química de 15	86
Figura 55: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 15	87
Figura 56: Estrutura química de 14	87
Figura 57: Correlações observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14	88
Figura 58: A – Cromatograma do extrato AcOEt das partes aéreas de <i>Peperomia blanda</i> . 91	
B – Ampliação com identificação das substâncias isoladas (1-12)	91
Figura 59: Curva analítica da ovoalbumina bovina (fração V).....	96
Figura 60: A – Cromatograma obtido após a incubação da fração 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) com o precursor fenilalanina 20 mM em tampão borato 0,1M (pH 8,8). Condições de análise: T = 40°C, tempo de incubação de 24 horas. B – Cromatograma obtido após a incubação da fração 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) com o precursor fenilalanina 20 mM em tampão borato 0,1M (pH 8,8) na presença de HCl 6M, nas mesmas condições de análise de A. C - Cromatograma obtido da injeção do ácido cinâmico nas mesmas condições experimentais.	98
Figura 61: Curva analítica do ácido cinâmico	99
Figura 62: Gel de poliacrilamida obtido por eletroforese das frações preparadas por precipitação fracionada, revelado com nitrato de prata.	100
Figura 63: Variação da concentração de ácido cinâmico formado em relação ao tempo de reação quando foram utilizadas uma concentração de 0,5 mM de fenilalanina e a fração enzimática semipurificada (1 mg/mL).	102
Figura 64 : Gráfico de Michaelis-Menten construído para a reação enzimática da PAL de <i>P. blanda</i>	103
Figura 65: Gráfico de duplo-recíproco construído para a reação enzimática da PAL de <i>P. blanda</i>	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns metabólitos isolados de espécies de <i>Peperomia</i>	7
Tabela 2: Agentes redutores usualmente utilizados na extração de enzimas.....	14
Tabela 3: Inibidores de proteases.....	15
Tabela 4: Precipitação com sulfato de amônio – quantidade de sal a ser adicionado a 0°C.....	39
Tabela 5: Enzimas presentes na solução padrão utilizada na eletroforese e seus respectivos massas moleculares.....	42
Tabela 8: Deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio oxibenzílico H-7.....	50
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 1-5	61
Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 1-5	62
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 6 – 10	75
Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 6-10	76
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 11 e 12	80
Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 11 e 12	81
Tabela 13: Incrementos dos deslocamentos químicos dos carbonos oleofínicos observados em policetídeos.....	84
Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 13-15	89
Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substâncias 13-15	90
Tabela 16: Rendimentos das substâncias isoladas do extrato AcOEt 1.....	92
Tabela 17: Rendimentos das substâncias isoladas do extrato AcOEt 2.....	92
Tabela 18: Atividade tripanocida das lignanas tetraidrofurânicas 1-5 isoladas de <i>Peperomia blanda</i> frente a forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	93
Tabela 19: Atividade tripanocida dos policetídeos 13-15 isolados de <i>Peperomia blanda</i> frente a forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	94
Tabela 20: Cálculo das concentrações de proteína, estimada pelo método de Bradford, das frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio e após dessalinização.	97
Tabela 21: Concentração de ácido cinâmico formado nas reações com extrato bruto e frações da precipitação salina.....	97
Tabela 22: Cálculos do desvio padrão e da concentração de ácido cinâmico formado na reação utilizando fenilalanina 0,5 mM em tempos diferente.	101
Tabela 23: Velocidade inicial em cada ensaio enzimático de acordo com a concentração real de substrato adicionado.....	102

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Procedimento geral para análise do perfil químico dos extratos de partes aéreas, raízes e frutos de <i>Peperomia blanda</i>	29
Esquema 2: Partição líquido-líquido do extrato AcOEt 1 das partes aéreas de <i>P. blanda</i>	30
Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ do extrato AcOEt 1 das partes aéreas de <i>P. blanda</i>	32
Esquema 4: Partição líquido-líquido do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de <i>P. blanda</i>	33
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de <i>P. blanda</i>	35
Esquema 6: Fracionamento cromatográfico da fração hexânica do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de <i>P. blanda</i>	36
Esquema 7: Obtenção do extrato enzimático de folhas de <i>Peperomia blanda</i>	39
Esquema 8: Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	40
Esquema 9: Revelação do gel utilizando nitrato de prata.	44
Esquema 10: Ensaio enzimático - procedimento geral.	45

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1	117
Espectro 2: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 - expansão	118
Espectro 3: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 – expansão.....	118
Espectro 4: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 – expansão.....	118
Espectro 5: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 1	119
Espectro 6: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 1	120
Espectro 7: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 1 – expansão.	120
Espectro 8: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 1 – expansão.	121
Espectro 9: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 1 – expansão.	121
Espectro 10: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 1	122
Espectro 11: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 1 – expansão.	122
Espectro 12: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 1 – expansão.	123
Espectro 13: Experimento de NOESY 1D da substância 1	123
Espectro 14: Experimento de NOESY 1D da substância 1	124
Espectro 15: Experimento de NOESY 1D da substância 1	124
Espectro 16: Experimento de NOESY 1D da substância 1	125
Espectro 17: Experimento de NOESY 1D da substância 1	125
Espectro 18: Experimento de NOESY 1D da substância 1	126
Espectro 19: Espectro de massas de alta resolução da substância 1	127
Espectro 20: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	128
Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2 – expansão.....	129
Espectro 22: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2 – expansão.....	129
Espectro 23: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 2	130
Espectro 24: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2	131
Espectro 25: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2 – expansão.	131
Espectro 26: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2 – expansão.	132
Espectro 27: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2 – expansão.	132
Espectro 28: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2 – expansão.	133
Espectro 29: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 2 – expansão.	133
Espectro 30: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 2	134
Espectro 31: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 2 – expansão.	134
Espectro 32: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 2 – expansão.	135
Espectro 33: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 2 – expansão.	135
Espectro 34: Experimento de NOESY 1D da substância 2	136
Espectro 35: Experimento de NOESY 1D da substância 2	136
Espectro 36: Experimento de NOESY 1D da substância 2	137
Espectro 37: Experimento de NOESY 1D da substância 2	137
Espectro 38: Experimento de NOESY 1D da substância 2	138
Espectro 39: Experimento de NOESY 1D da substância 2	138
Espectro 40: Espectro de massas de alta resolução da substância 2	139
Espectro 41: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3	140
Espectro 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3 – expansão.....	141
Espectro 43: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3 – expansão.....	141
Espectro 44: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 3	142
Espectro 45: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3	143
Espectro 46: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3 – expansão.	143

Espectro 47: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3 – expansão.	144
Espectro 48: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3 – expansão.	144
Espectro 49: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3 – expansão.	145
Espectro 50: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 3 – expansão.	145
Espectro 51: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 3.	146
Espectro 52: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 3 – expansão.	146
Espectro 53: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 3 – expansão.	147
Espectro 54: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 3 – expansão.	147
Espectro 55: Experimento de NOESY 1D da substância 3	148
Espectro 56: Experimento de NOESY 1D da substância 3	148
Espectro 57: Experimento de NOESY 1D da substância 3	149
Espectro 58: Experimento de NOESY 1D da substância 3	149
Espectro 59: Experimento de NOESY 1D da substância 3	150
Espectro 60: Experimento de NOESY 1D da substância 3	150
Espectro 61: Espectro de massas de alta resolução da substância 3	151
Espectro 62: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 4.	152
Espectro 63: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 4 – expansão.	153
Espectro 64: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 4 – expansão.	153
Espectro 65: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 4.	154
Espectro 66: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4.	155
Espectro 67: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4 – expansão.	155
Espectro 68: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4 – expansão.	156
Espectro 69: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4 – expansão.	156
Espectro 70: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4 – expansão.	157
Espectro 71: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 4 – expansão.	157
Espectro 72: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 4.	158
Espectro 73: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 4 - expansão.	158
Espectro 74: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 4 - expansão.	159
Espectro 75: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 4 - expansão.	159
Espectro 76: Experimento de NOESY 1D da substância 4	160
Espectro 77: Experimento de NOESY 1D da substância 4	160
Espectro 78: Experimento de NOESY 1D da substância 4	161
Espectro 79: Experimento de NOESY 1D da substância 4.	161
Espectro 80: Experimento de NOESY 1D da substância 4	162
Espectro 81: Experimento de NOESY 1D da substância 4	162
Espectro 82: Espectro de massas de alta resolução da substância 4	163
Espectro 83: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 5.	164
Espectro 84: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 5 – expansão.	165
Espectro 85: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 5 – expansão.	165
Espectro 86: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 5 – expansão.	165
Espectro 87: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 5.	166
Espectro 88: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5.	167
Espectro 89: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5 – expansão.	167
Espectro 90: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5 – expansão.	168
Espectro 91: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5 – expansão.	168
Espectro 92: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5 – expansão.	169
Espectro 93: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 5 – expansão.	169
Espectro 94: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 5.	170
Espectro 95: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 5 - expansão.	170

Espectro 96: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 - expansão.....	171
Espectro 97: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 – expansão	171
Espectro 98: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 – expansão.	172
Espectro 99: Experimento de NOESY 1D da substância 5	172
Espectro 100: Experimento de NOESY 1D da substância 5	173
Espectro 101: Experimento de NOESY 1D da substância 5	173
Espectro 102: Experimento de NOESY 1D da substância 5	174
Espectro 103: Experimento de NOESY 1D da substância 5	174
Espectro 104: Espectro de massas de alta resolução da substância 5.	175
Espectro 105: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 6.....	176
Espectro 106: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 6 – expansão.....	177
Espectro 107: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 6 – expansão.....	177
Espectro 108: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 6 – expansão.....	177
Espectro 109: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 6.	178
Espectro 110: Mapa de contorno gHMBC da substância 6.	179
Espectro 111: Mapa de contorno gHMBC da substância 6 – expansão.	179
Espectro 112: Mapa de contorno gHMBC da substância 6 – expansão.	180
Espectro 113: Mapa de contorno gHMBC da substância 6 – expansão.	180
Espectro 114: Mapa de contorno gHMBC da substância 6 – expansão.	181
Espectro 115: Mapa de contorno gHMBC da substância 6 – expansão.	181
Espectro 116: Mapa de contorno gHMQC da substância 6.	182
Espectro 117: Mapa de contorno gHMQC da substância 6 – expansão.	182
Espectro 118: Mapa de contorno gHMQC da substância 6 – expansão.	183
Espectro 119: Experimento de NOESY 1D da substância 6	183
Espectro 120: Experimento de NOESY 1D da substância 6	184
Espectro 121: Experimento de NOESY 1D da substância 6	184
Espectro 122: Experimento de NOESY 1D da substância 6	185
Espectro 123: Experimento de NOESY 1D da substância 6	185
Espectro 124: Espectro de dicroísmo circular da substância 6.	186
Espectro 125: Espectro de massas de alta resolução da substância 6	186
Espectro 126: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8.	187
Espectro 127: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	188
Espectro 128: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	188
Espectro 129: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	188
Espectro 130: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	188
Espectro 131: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 7 e 8.	189
Espectro 132: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8.	190
Espectro 133: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	190
Espectro 134: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	191
Espectro 135: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	191
Espectro 136: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	192
Espectro 137: Mapa de contorno gHMBC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.....	192
Espectro 138: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8.	193
Espectro 139: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.	193

Espectro 140: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.	194
Espectro 141: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.	194
Espectro 142: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.	195
Espectro 143: Mapa de contorno gHMQC da mistura das substâncias 7 e 8 – expansão.	195
Espectro 144: Experimento de NOESY 1D da substância 7	196
Espectro 145: Experimento de NOESY 1D da substância 7	196
Espectro 146: Experimento de NOESY 1D da substância 8	197
Espectro 147: Espectro de massas de alta resolução da mistura das substâncias 7 e 8	197
Espectro 148: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9	198
Espectro 149: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9 – expansão.	199
Espectro 150: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9 – expansão.	199
Espectro 151: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 9 – expansão.	199
Espectro 152: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 9	200
Espectro 153: Mapa de contorno gHMBC da substância 9	201
Espectro 154: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	201
Espectro 155: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	202
Espectro 156: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	202
Espectro 157: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	203
Espectro 158: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	203
Espectro 159: Mapa de contorno gHMBC da substância 9 - expansão.	204
Espectro 160: Mapa de contorno gHMQC da substância 9	204
Espectro 161: Mapa de contorno gHMQC da substância 9 - expansão.	205
Espectro 162: Mapa de contorno gHMQC da substância 9 - expansão.	205
Espectro 163: Experimento de NOESY 1D da substância 9	206
Espectro 164: Experimento de NOESY 1D da substância 9	206
Espectro 165: Experimento de NOESY 1D da substância 9	207
Espectro 166: Experimento de NOESY 1D da substância 9	207
Espectro 167: Espectro de dicroísmo circular da substância 9	208
Espectro 168: Espectro de massas de alta resolução da substância 9	208
Espectro 169: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 10	209
Espectro 170: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 10 – expansão.	210
Espectro 171: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 10 – expansão.	210
Espectro 172: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 10 – expansão.	210
Espectro 173: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 10	211
Espectro 174: Mapa de contorno gHMBC da substância 10	212
Espectro 175: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	212
Espectro 176: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	213
Espectro 177: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	213
Espectro 178: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	214
Espectro 179: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	214
Espectro 180: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	215
Espectro 181: Mapa de contorno gHMBC da substância 10 – expansão.	215
Espectro 182: Mapa de contorno gHMQC da substância 10	216
Espectro 183: Mapa de contorno gHMQC da substância 10 – expansão.	216
Espectro 184: Mapa de contorno gHMQC da substância 10 – expansão.	217
Espectro 185: Mapa de contorno gHMQC da substância 10 – expansão.	217
Espectro 186: Experimento de NOESY 1D da substância 10	218
Espectro 187: Experimento de NOESY 1D da substância 10	218
Espectro 188: Experimento de NOESY 1D da substância 10	219
Espectro 189: Experimento de NOESY 1D da substância 10	219

Espectro 190: Experimento de NOESY 1D da substância 10 .	220
Espectro 191: Espectro de dicroísmo circular da substância 10 .	220
Espectro 192: Espectro de massas de alta resolução da substância 10 .	221
Espectro 193: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 11 .	222
Espectro 194: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 11 .	223
Espectro 195: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 12 .	224
Espectro 196: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 12 .	225
Espectro 197: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 13 .	226
Espectro 198: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 13 – expansão.	227
Espectro 199: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 13 – expansão.	227
Espectro 200: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 13 – expansão.	227
Espectro 201: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 13 .	228
Espectro 202: Espectro de DEPT 135 da substância 13 .	229
Espectro 203: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 13 .	229
Espectro 204: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 13 - expansão.	230
Espectro 205: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 13 - expansão.	230
Espectro 206: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 13 - expansão.	231
Espectro 207: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 13 - expansão.	231
Espectro 208: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 13 .	232
Espectro 209: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 13 - expansão.	232
Espectro 210: Espectro de massas da substância 13 .	233
Espectro 211: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	234
Espectro 212: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 14 – expansão.	235
Espectro 213: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 14 – expansão.	235
Espectro 214: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 14 – expansão.	235
Espectro 215: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	236
Espectro 216: Espectro de DEPT 135 da substância 14 .	237
Espectro 217: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 .	237
Espectro 218: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	238
Espectro 219: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	238
Espectro 220: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	239
Espectro 221: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	239
Espectro 222: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	240
Espectro 223: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 14 – expansão.	240
Espectro 224: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 14 .	241
Espectro 225: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 14 – expansão.	241
Espectro 226: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 14 – expansão.	242
Espectro 227: Espectro de massas da substância 14 .	242
Espectro 228: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	243
Espectro 229: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 15 – expansão.	244
Espectro 230: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 15 – expansão.	244
Espectro 231: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 15 – expansão.	244
Espectro 232: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	245
Espectro 233: Espectro de DEPT 135 da substância 15 .	246
Espectro 234: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 .	246
Espectro 235: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.	247
Espectro 236: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.	247
Espectro 237: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.	248
Espectro 238: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.	248

Espectro 239: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.....	249
Espectro 240: Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância 15 - expansão.....	249
Espectro 241: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 15	250
Espectro 242: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 15 - expansão.....	250
Espectro 243: Mapa de contorno <i>g</i> HMQC da substância 15 - expansão.....	251
Espectro 244: Espectro de massas da substância 15	251

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a.C.	-	antes de cristo
AcOEt	-	acetato de etila
ax.	-	axial
CC	-	cromatografia em coluna
CCD	-	cromatografia em camada delgada
CCDC	-	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	-	cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	-	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	-	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas
COSY ^1H - ^1H	-	correlação bidimensional hidrogênio-hidrogênio
COSY ^1H - ^{13}C	-	correlação bidimensional hidrogênio-carbono
δ	-	deslocamento químico
d	-	dubleto
d.C.	-	depois de cristo
dd	-	duplo dubleto
DEPT	-	“distortionless enhancement by polarization transfer”
d.i.	-	diâmetro interno
DIC	-	detector de ionização em chama
DFP	-	fosfato de diisopropilfluor
DMSO	-	dimetilsulfóxido
DTE	-	1,4-ditioeritol
DTT	-	1,4-ditiotreitol
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
EGTA	-	ácido [etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)] N, N, N', N'-tetracético
EM	-	espectrometria de massas
eq.	-	equatorial
gHMBC	-	Gradiente Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHMQC	-	Gradiente Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hex	-	hexano
Hz	-	hertz
IPP	-	difosfato de isopentenila
IV	-	infravermelho
J	-	constante de acoplamento
λ	-	comprimento de onda
LIT	-	liver infusion tryptose
NOESY	-	Nuclear overhauser effect spectroscopy
m	-	multipeto
m/z	-	relação massa-carga
p.	-	página
P.A.	-	para análise
PAL	-	fenilalanina amônia liase
PMSF	-	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVPP	-	polivinilpolipirrolidona
RMN	-	ressonância magnética nuclear

RMN de ^{13}C	-	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	-	ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
rpm	-	rotações por minuto
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
s	-	singleto
t	-	tripleto
TMS	-	tetrametilsilano
TRIS	-	triidroxiaminometano
[U- ^{14}C]	-	uniformemente marcado com carbono quatorze
UV	-	ultravioleta

RESUMO

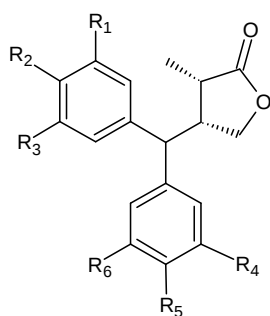
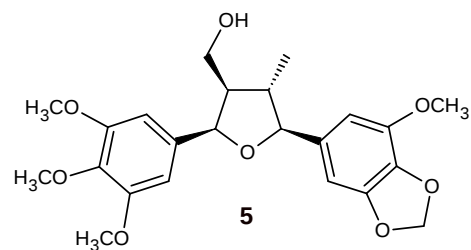
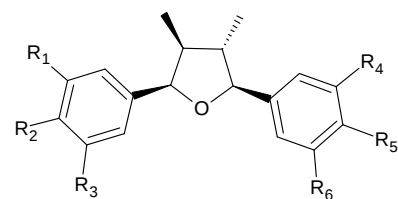
O estudo químico das partes aéreas de *Peperomia blanda* resultou no isolamento de quinze substâncias, incluindo cinco lignanas tetraidrofurânicas (*rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4,5,4',5'-dimilenodioxi-3,3'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4',5'-milenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4-hidroxi-4',5'-milenodioxi-3,5,3'-trimetoxi-7,7'-epoxilignana, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4'-hidroxi-3,4,5,3',5'-pentametoxi-7,7'-epoxilignana, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-9-hidroxi-4',5'-milenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana), cinco secolignanas ((2*S*,3*R*)-2-metil-3-[bis(4',5'-milenodioxi-3'-metoxifenil)metil]butirolactona, *rel*-(2*S*,3*R*)-2-metil-3-[bis(3',4',5'-trimetoxifenil)metil]butirolactona, *rel*-(2*R*,3*R*)-2-metil-3-[bis(3',4',5'-trimetoxifenil)metil]butirolactona, (2*S*,3*R*,5*R*)-2-metil-3-[5-(3',4',5'-trimetoxifenil)-5-(4'',5''-milenodioxi-3''-metoxifenil)metil]butirolactona, (2*R*,3*R*,5*R*)-2-metil-3-[5-(3',4',5'-trimetoxifenil)-5-(4'',5''-milenodioxi-3''-metoxifenil)metil]butirolactona), duas flavonas (5-hidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona, 5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona) e três policetídeos (proctoriona C, surinona A, surinona C). As estruturas químicas das substâncias foram determinadas utilizando técnicas espectrométricas, incluindo RMN 1D e 2D. As estereoquímicas relativas das lignanas tetraidrofurânicas e das secolignanas foram determinadas através de experimentos de NOESY 1D e as estereoquímicas absolutas das secolignanas foram determinadas através de dicroísmo circular. Todas as substâncias estão sendo descritas pela primeira vez nessa espécie vegetal, sendo que as lignanas tetraidrofurânicas apresentaram estruturas químicas com estereoquímicas inéditas e as secolignanas haviam sido obtidas apenas de forma sintética. Todas as lignanas tetraidrofurânicas apresentaram potente atividade tripanocida com CI_{50} entre 23,9 e 58,7 μ M. Ao contrário das lignanas tetraidrofurânicas, as secolignanas não apresentaram significativa atividade. Os policetídeos se mostraram mais potentes que as lignanas tetraidrofurânicas frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando valores de CI_{50} entre 16,2 e 18,3 μ M. Os estudos biossintéticos foram iniciados com a incubação de fenilalanina em extratos enzimáticos de folhas de *Peperomia blanda*. A análise dos resultados mostrou a conversão da fenilalanina em ácido cinâmico. Com o intuito de estabelecer um protocolo para a purificação da enzima,

foi feita precipitação fracionada com sulfato de amônio. A análise da atividade da enzima mostrou estar concentrada na fração 25-55% de saturação. A conversão da fenilalanina em ácido cinâmico foi observada por CLAE utilizando-se padrão. O extrato enzimático bruto e as frações obtidas na precipitação salina foram analisada por SDS-PAGE, sendo que a fração ativa apresentou uma banda proeminente entre 45 e 62 KDa.

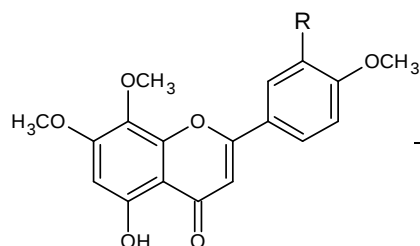
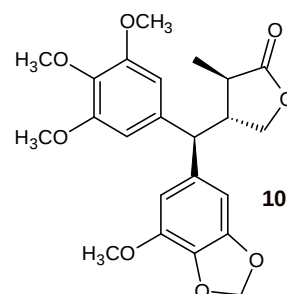
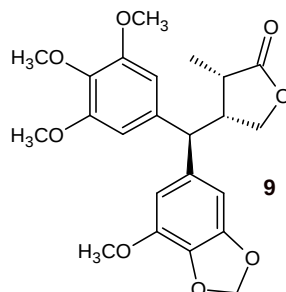
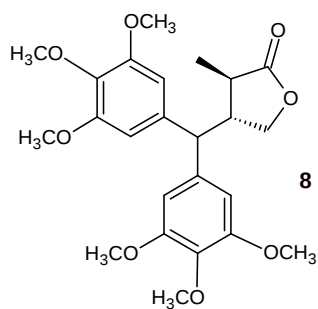
ABSTRACT

The phytochemical investigation of aerial parts of *Peperomia blanda* yielded fifteen compounds, identified as five tetrahydrofuran lignans (*rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4,5,4',5'-dimethylenedioxy-3,3'-dimethoxy-7,7'-epoxylignan, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4',5'-methylenedioxy-3,4,5,3'-tetramethoxy-7,7'-epoxylignan, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4-hydroxy-4',5'-methylenedioxy-3,5,3'-trimethoxy-7,7'-epoxylignan, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4'-hydroxy-3,4,5,3',5'-pentamethoxy-7,7'-epoxylignan, *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-9-hydroxy-4',5'-methylenedioxy-3,4,5,3'-tetramethoxy-7,7'-epoxylignan), five secolignans ((2*S*,3*R*)-2-methyl-3-[bis(4',5'-methylenedioxy-3'-methoxyphenyl)methyl]butyrolactone, *rel*-(2*S*,3*R*)-2-methyl-3-[bis(3',4',5'-trimethoxyphenyl)methyl]butyrolactone, *rel*-(2*R*,3*R*)-2-methyl-3-[bis(3',4',5'-trimethoxyphenyl)methyl]butyrolactone, (2*S*,3*R*,5*R*)-2-methyl-3-[5-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-(4'',5''-methylenedioxy-3''-methoxyphenyl)methyl]butyrolactone and (2*R*,3*R*,5*R*)-2-methyl-3-[5-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-(4'',5''-methylenedioxy-3''-methoxyphenyl)methyl]butyrolactone), two flavones (5-hydroxy-4',7,8-trimethoxyflavone, 5-hydroxy-3',4',7,8-tetramethoxyflavone) and three polyketides (proctorione C, surinone A, surinone C). The chemical structures were elucidated by interpretation of their spectroscopic data, including 1D and 2D NMR. The relative configurations of tetrahydrofuran lignans and secolignans were determined using NOESY analyses and the absolute configurations were defined by CD spectra. All compounds were described at the first time in this species and all tetrahydrofuran lignans showed novel stereoisomers and the secolignans were previously published as synthetic products. The tetrahydrofuran lignans showed powerful trypanocidal activity, with IC₅₀ between 23.9 and 58.7 µM. Despite of tetrahydrofuran lignans, the secolignans did not showed significant activity. The polyketides were more potent than the tetrahydrofuran lignans against *Trypanosoma cruzi* front of *Trypanosoma cruzi* strain Y, showing IC₅₀ between 16.2 and 18.3 µM. When phenylalanine were incubated with cell free extracts obtained from leaves of *P. blanda*, it was observed the formation of cinnamic acid. Preliminary purification of the enzyme was started by saline precipitation with (NH₃)₄SO₄. The analysis of the activity showed to be concentrated in the 25-55% fraction. The biotransformation of phenylalanine in cinnamic acid was analyzed by HPLC using standard compound. The cell free extracts and fractions obtained by salt precipitation were analysed by SDS-PAGE, and the 25-55% fraction showed a prominent spot between 45 and 63 KDa.

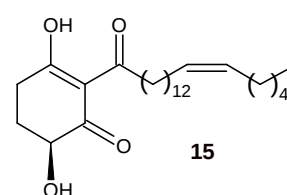
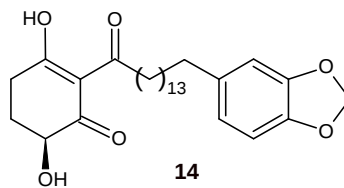
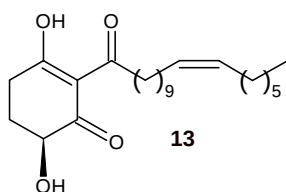
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	OCH ₃	OCH ₂ O		OCH ₃	OCH ₂ O	
2	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₂ O	
3	OCH ₃	OCH ₂ O		OCH ₃	OH	OCH ₃
4	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
6	OCH ₂ O		OCH ₃	OCH ₂ O		OCH ₃
7	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃



	R
11	H
12	OCH ₃



1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

Produtos naturais são investigados e utilizados para aliviar enfermidades desde o início da história humana. O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos. Após a identificação de espécies e de gêneros que se adequavam ao uso medicinal, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes, triturar sementes e técnicas de conservação que configuraram um corpo teórico-prático do conhecimento que constituía a medicina do homem primitivo. Esse processo foi lento e longo, no qual a intuição, aliada ao ensaio, vagarosamente converteu a experiência do saber em memória coletiva (Gottlieb e Kaplan, 1993). No início do século XIX, antes da “Era Sintética”, 80% de todos os medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas. Somente a partir do século XX, os farmacêuticos e químicos, contando com equipamentos, técnicas e uma fundamentação teórica mais avançada, conseguiram isolar e realizar experimentos com substâncias semipuras ou puras encontradas em plantas (Simões *et al.*, 1999).

Nos tempos mais recentes, produtos naturais continuam sendo matrizes significantes para fármacos e protótipos. Seu papel principal é evidente em aproximadamente 60% de compostos anticâncer e 75% de fármacos para doenças infecciosas que ainda são produtos naturais ou derivados destes (Newman *et al.*, 2003, Cragg *et al.*, 2005). Apesar deste sucesso, durante o passar de décadas, pesquisas em produtos naturais têm vivenciado um constante declínio global. A introdução de sínteses totais mais direcionadas e da química combinatória, com suas promessas de aparentes suportes mais baratos e de imensas bibliotecas de compostos, contribuíram para este declínio de interesse na investigação de produtos naturais pelas empresas farmacêuticas (McChesney *et al.*, 2007).

Porém, nem todos os produtos naturais podem ser totalmente sintetizados a custos competitivos devido às estruturas complexas. Estes incluem fármacos como a penicilina, morfina, e paclitaxel (Taxol®) (figura 1, p. 2)

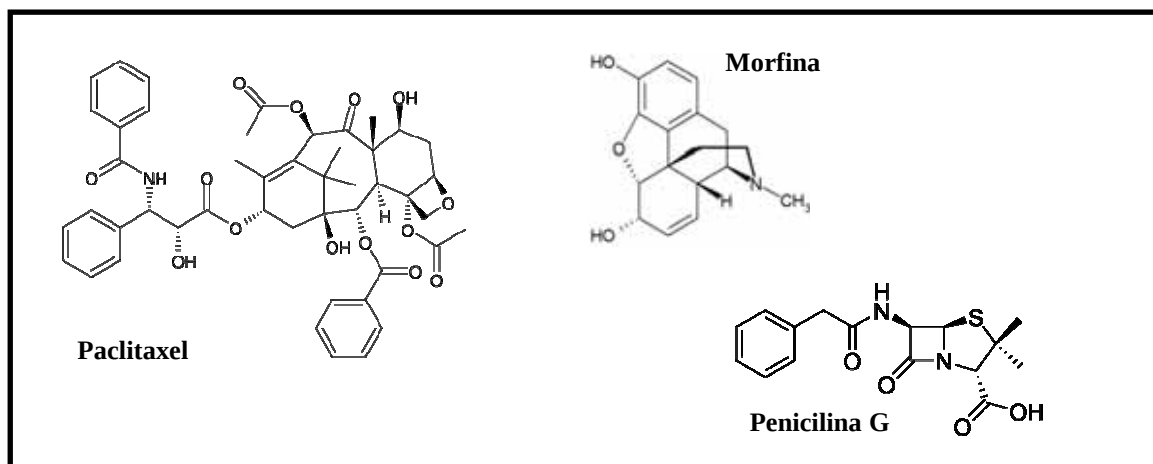


Figura 1: Estrutura química do paclitaxel, da morfina e da penicilina G.

Procedimentos semi-sintéticos, às vezes, podem ser a solução destes problemas. Isto geralmente envolve a obtenção de um intermediário biossintético da fonte natural, em vez do produto final em si. O intermediário pode então ser convertido para o produto final através de algumas etapas sintéticas. As penicilinas semi-sintéticas são um exemplo desta abordagem. Outro exemplo recente é o do paclitaxel, extraído das cascas de *Taxus brevifolia*. Essa espécie vegetal demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade, encontra-se em extinção e que possui um baixo rendimento em massa do composto de interesse. Uma solução para este problema foi encontrada nas folhas da árvore *Taxus baccata*, da qual se pode extrair a substância 10-desacetilbacatina-III que por apresentar o esqueleto básico e as funcionalidades do paclitaxel pode ser convertida a esse último via semi-síntese e em poucas etapas (figura 2, p. 3; Souza, 2004).

Além dos problemas encontrados para a síntese de tais substâncias complexas, muitas vezes estes compostos isolados funcionam de forma diferente do que no extrato original de fontes naturais. Esta propriedade, conhecida como sinergia, pode combinar, por exemplo, compostos antimicrobianos com compostos que estimulam diferentes percursos do sistema imunológico (El-Shemy *et al.*, 2007).

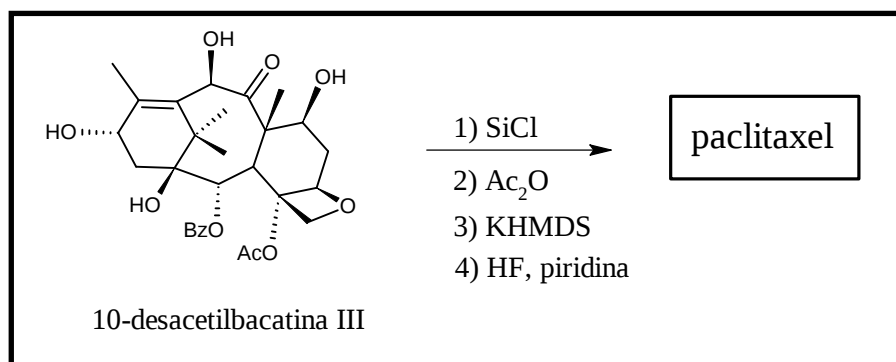


Figura 2: Semi-síntese do paclitaxel (Souza, 2004).

Nos dias de hoje, embora o foco da indústria farmacêutica seja a síntese combinatória, a química de produtos naturais continua sendo a base para investigação de novos fármacos (Phillipson, 2001; Ortholand e Ganesan, 2004). A pesquisa acadêmica tem um papel importante na descoberta de novos fármacos, visto que esse tipo de trabalho abrange conhecimentos multidisciplinares que são frequentemente alcançados dentro das Universidades (Phillipson, 2001).

Comercialmente, algumas das mais importantes utilizações das descobertas e desenvolvimentos em produtos naturais estão na área farmacêutica, agroquímica, cosmética e nutricional. Os requisitos para desenvolvimento e comercialização na área farmacêutica são geralmente bem conhecidos. O tempo para o desenvolvimento de compostos farmacêuticos pode variar de alguns anos a até mais de duas décadas. A estrutura química do paclitaxel 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® foi aprovado como um agente quimioterapêutico para o câncer no final de 1992, 20 anos depois. Na média, novos compostos farmacêuticos levam uma década para desenvolvimento e comercialização (McChesney *et al.*, 2007).

Considerando este elevado tempo para o desenvolvimento de fármacos a partir de fontes que tem sido historicamente os maiores meios de agentes farmacológicos, 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 (McChesney *et al.*, 2007).

Esses fatos indicam que a medicina natural é ainda bastante promissora, e que a humanidade pode aprender a utilizar o que a natureza oferece de forma mais adequada. A

biotecnologia é uma das ferramentas deste aprendizado, por meio da qual, princípios ativos são descobertos e estratégias de exploração e preservação de espécies vegetais são desenvolvidas. Estas estratégias envolvem a bioprospecção, baseado na diversidade biológica e geográfica e no estudo das vias biossintéticas responsáveis pela formação das substâncias bioativas, permitindo assim a manipulação das rotas metabólicas para o aumento da produção das substâncias de interesse (Stafford e Warren, 1991).

A investigação de novos metabólitos de interesse farmacológico ou econômico por parte dos pesquisadores é de suma importância. Entretanto, para que não ocorra a escassez dessa valiosa fonte natural, é necessário que a exploração dessas espécies vegetais ocorra de forma racional, contribuindo para preservação e uso sustentável das espécies. Segundo a Comissão Mundial de Desenvolvimento e Meio Ambiente da ONU, desenvolvimento sustentável é aquele que busca satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras para alcançar suas próprias necessidades. Isto significa utilizar os recursos naturais de forma a não esgotá-los e propiciar sua manutenção (<http://www.wwf.org.br>, 28/04/2008).

Há uma estimativa que haja aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores no planeta, mas que apenas 10.000 possuam uso medicinal documentado (McChesney *et al.*, 2007). Na velocidade em que ocorre o fenômeno de extinção das espécies vegetais, um enorme número de plantas com propriedades medicinais corre o risco de desaparecer antes de ter seu valor reconhecido, o que torna ainda mais urgente intensificar os investimentos nesta área.

1.2. Piperaceae – *Peperomia*

A família Piperaceae pertence à ordem *Piperales*, que é considerada uma das mais primitivas das dicotiledôneas. Recentemente, Jaramillo e colaboradores (2004) propuseram uma classificação alternativa para esta família baseada em análises genéticas. De acordo com esta nova organização, Piperaceae compreende quatro gêneros, os grandes gêneros *Peperomia*, com cerca de 1700 espécies (Wanke *et al.*, 2006) e *Piper* com aproximadamente 2000 espécies (Quijano-Abril *et al.*, 2006), e os pequenos gêneros *Manekia*, considerado um novo nome para *Sarcorrhachis* (Arias *et al.*, 2006) e *Zippelia*.

Espécies de Piperaceae têm sido utilizadas na alimentação (como condimento – *Piper nigrum*) (Ravindran, 2000), reportadas como inseticidas (Navickiene *et al.*, 2003; Debonsi *et al.*, 2007) e também na medicina tradicional (Arrigon-Blank *et al.*, 2004). Em relação ao metabolismo secundário, a família Piperaceae apresenta-se como uma das mais versáteis famílias botânicas. Os metabólitos acumulados por espécies desta família caracterizam-se por serem oriundos de diferentes classes de metabólitos, tais como as amidas (Giesbrecht *et al.*, 1981; Alécio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002), substâncias de baixo peso molecular de óleos essenciais (Maia *et al.*, 1987; Gurib-Fakin, 1994; Tirillini *et al.*, 1996), pironas e flavonóides (Danelutte *et al.*, 2003), fenilpropanóides e cromenos (Diaz *et al.*, 1986; Burke e Nair, 1986; Baldoqui *et al.*, 1999; Lago *et al.*, 2004; Morandim *et al.*, 2005), lignóides (Chang *et al.*, 1985; Tyagi *et al.*, 1993; Badheka *et al.*, 1986; Benevides *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2008) e outros metabólitos de biossíntese mista.

Espécies do gênero *Peperomia* apresentam folhas providas de tecido especializado em reserva de água, e essa alta capacidade de armazenar água compensa os períodos de seca que são muito comuns para espécies de hábito epifítico e rupícola (Takemori *et al.*, 2003).

Por apresentarem uma folhagem vistosa, muitas espécies de *Peperomia* são utilizadas como plantas ornamentais (Mustard, 1986; Judd *et al.*, 1999) (figura 3, p. 6). As espécies de *Peperomia* desenvolvem-se melhor em temperaturas entre 25 e 30 °C. Mesmo quando não se encontram em crescimento ativo, requerem uma temperatura mínima de 13°C para conseguirem o máximo desenvolvimento.



Figura 3: Espécies de *Peperomia* utilizadas como plantas ornamentais.

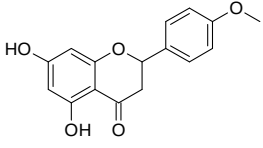
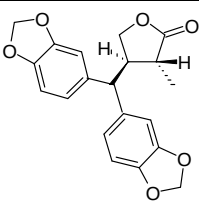
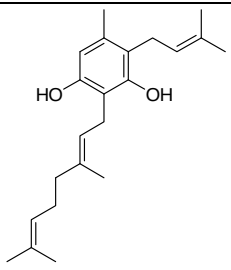
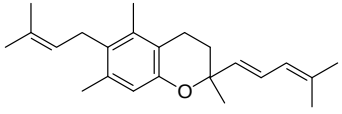
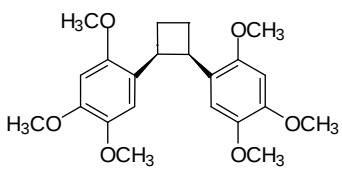
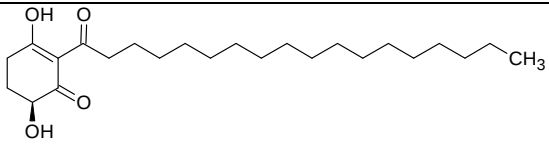
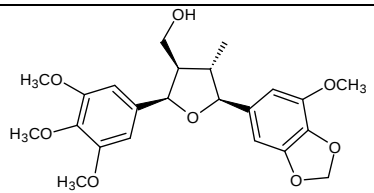
A = *Peperomia mantadiana*; B = *Peperomia asperula*; C = *Peperomia pruinosa*;

D = *Peperomia caperata*; E = *Peperomia glabella*; F = *Peperomia obtusifolia*

<http://biology.ugent.be/peperomia> (maio de 2008).

Existem na literatura relatos do uso de espécies de *Peperomia* na medicina tradicional, tais como, antiinflamatório, antiasmático, analgésico, antibacteriano, no tratamento de úlcera gástrica e da esterilidade (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004). Apesar de ser o segundo maior gênero de Piperaceae em número de espécies, é o menos estudado sob o ponto de vista químico, sendo que apenas 23 espécies foram investigadas até 2007. Os principais compostos encontrados no gênero *Peperomia* são flavonóides (Aquil *et al.*, 1993), secolignanas (Monache e Compagnone, 1996), substâncias fenólicas preniladas (Tanaka *et al.*, 1998; Salazar *et al.*, 2005), cromenos (Seeram *et al.*, 1998), policetídeos (Seeram *et al.*, 2000), substâncias com anel ciclobutânico (Bayma *et al.*, 2000) e lignanas tetraidrofurânicas (Wu *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2008). (tabela 1, p.7).

Tabela 1: Alguns metabólitos isolados de espécies de *Peperomia*.

Classe	Estrutura	Espécie	Referência
Flavonóide	 acacetina	<i>Peperomia pellucida</i>	Aquil <i>et al.</i> , 1993
Secolignana	 peperomina A	<i>P. glabella</i>	Monache & Compagnone, 1996
Benzeno prenilado	 piperogalina	<i>P. obtusifolia</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 1998
Cromeno	 clusifoliol	<i>P. clusiifolia</i>	Seeran <i>et al.</i> , 1998
di-nor-lignana	 pelucidina	<i>P. pellucida</i>	Bayma <i>et al.</i> , 2000
Policetídeo	 proctoriona B	<i>P. proctorii</i>	Seeram <i>et al.</i> , 2000
Lignana tetraidrofurânica	 <i>rel</i>-(7R,8S,7'S,8'S)-9-hidroxi-4',5'-metilenedioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana.	<i>P. blanda</i>	Felippe <i>et al.</i> , 2008

1.3. *Peperomia blanda*



Figura 4: Fotos de *Peperomia blanda* com seus frutos.

<http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/dcs420/mi15/mi15044.jpg> (15/06/2007)

A espécie *Peperomia blanda* (figura 4, p. 8) é uma erva rupestre, tomentosa, pequena, encontrada nas Antilhas e na América do Sul. No Brasil é encontrada nos estados de Roraima, Goiás (Brasília – DF), Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (Guimarães e Giordano, 2004). Existe relato na literatura do estudo químico dos componentes voláteis (Santos *et al.*, 2001) e um estudo recente mostra a presença de cromenos nesta espécie (Veloza *et al.*, 2006).

1.4. Atividade tripanocida

A busca por substâncias bioativas de plantas da biodiversidade brasileira também deve focar doenças tropicais que não são de interesse de grandes grupos farmacêuticos. Entre estas doenças pode-se citar a doença de Chagas, que afeta milhares de brasileiros todos os anos (dados retirados do site do World Health Organization, www.who.int).

A doença de Chagas é endêmica na América Latina, afetando 17 milhões de pessoas. Cerca de 100 milhões de pessoas estão sob risco de infecção, acarretando em torno de 45 mil mortes por ano (dados retirados do site do World Health Organization, www.who.int). A figura 5 (p. 9) mostra o mapa de incidência mundial da doença de Chagas.

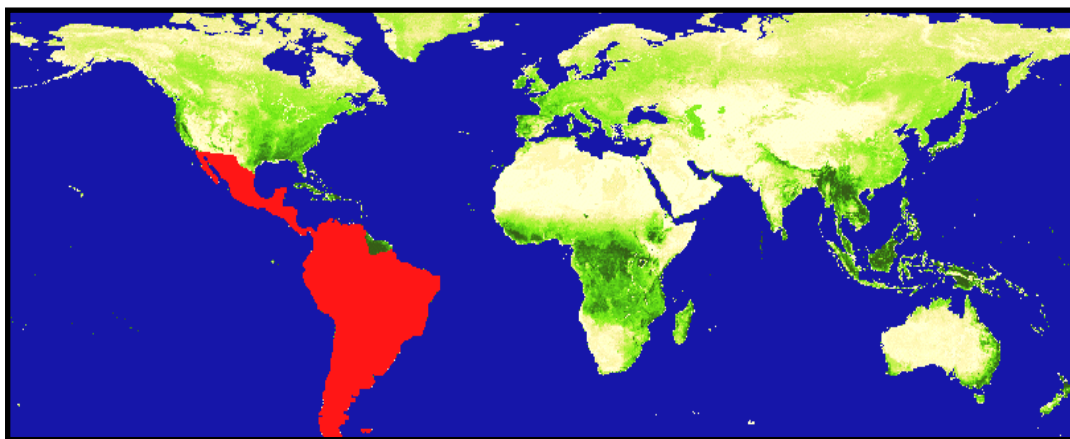


Figura 5: Mapa de incidência mundial da doença de Chagas (em vermelho)

geo.arc.nasa.gov (maio/2008)

Apesar da doença de Chagas crônica ser um problema epidemiológico apenas em alguns países da América Latina, a migração crescente de populações aumentou o risco de transmissão por transfusão de sangue até mesmo em outros países.

O agente etiológico é o parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida) (Hoare e Wallace, 1966), cujo ciclo de vida (figura 6, p. 10) envolve obrigatoriamente a passagem através de um hospedeiro vertebrado (mamíferos, incluindo o homem) e invertebrado (insetos triatomíneos hematófagos). A forma tripomastigota ingerida pelo inseto diferencia-se na forma proliferativa epimastigota, que alcançando a porção final do intestino transforma-se na forma tripomastigota metacíclica. Essa última forma, seguida da invasão nas células do hospedeiro vertebrado, diferencia-se em amastigota, a qual após uma série de ciclos reprodutivos transforma-se novamente em tripomastigotas, a forma responsável pela disseminação da infecção.

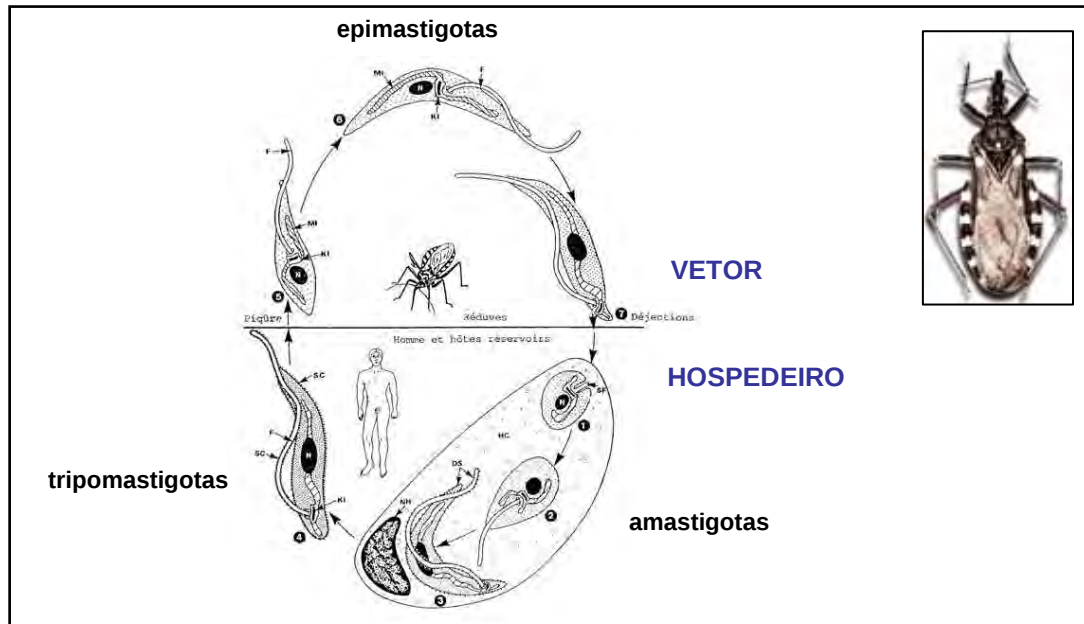


Figura 6: Ciclo do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*

A doença foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário Carlos Chagas. Até os dias atuais foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem obter-se, entretanto, um medicamento que fosse totalmente eficaz. Em 1961, iniciou-se um período de tentativas de tratamento que resultou, principalmente, nos dois medicamentos atualmente utilizados e que atuam sobre todas as formas do parasita: o Nifurtimox[®] e o Benznidazol[®] (fig. 7, p. 11), estando apenas o último disponível no Brasil. Apesar de estes medicamentos serem utilizados no combate à parasitose, sua capacidade curativa encontra-se ainda sob avaliação do xenodiagnóstico (critério parasitológico), e das provas sorodiagnostics (critério sorológico), uma vez que se apresentam poucos ativos na fase aguda, inativos na fase crônica, além de ocasionarem severos efeitos adversos, tais como: anorexia, alterações psíquicas, excitabilidade, náuseas, vômitos, cólica intestinal e diarreia (Nifurtimox[®]), hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, trombocitopenia púrpura, agranulociose, polineuropatia, parestesia e polineurites de nervos periféricos (Benznidazol[®]) (Coura e de Castro, 2002).

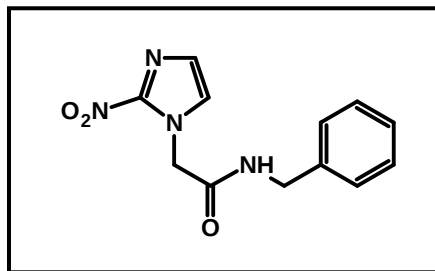


Figura 7: Benznidazol (Rochagan®)

Diante dos problemas apresentados, faz-se necessário a pesquisa de novos agentes para tratamento da enfermidade. Para tanto, produtos naturais, principalmente os oriundos de plantas têm se mostrado promissores contra *T. cruzi*, como por exemplo, as lignanas tetraidrofurânicas isoladas de espécies da família *Piperaceae* (Lopes *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2008).

1.5. Elucidação de vias biossintéticas

1.5.1. Considerações Gerais

Quando a estrutura de um metabólito secundário é elucidada, usualmente é possível propor a biogênese para a formação do mesmo a partir de substâncias derivadas do metabolismo primário, tais como, acetato, mevalonato, chiquimato e/ou ácidos aminados. A elucidação das vias metabólicas de uma espécie vegetal tem despertado grande interesse na comunidade científica, pois permite o entendimento dos mecanismos de formação destes metabólitos, em especial, se eles apresentam atividades biológicas. As reações enzimáticas são altamente específicas, favorecendo assim determinadas vias biossintéticas. Uma das técnicas que pode ser utilizada para a confirmação da rota proposta é através da incubação de precursores marcados ou não em extratos enzimáticos (*in vitro*). Nesta técnica, as enzimas que atuam na formação do metabólito de interesse são extraídas do organismo em estudo e incubadas com os possíveis precursores. No interior das células, as enzimas possuem todas as condições necessárias para expressarem sua atividade, por isso, durante e depois da liberação destas do interior das células, cuidados especiais devem ser tomados para preservar a atividade da enzima de interesse. Além disso, durante a incubação da enzima com os possíveis substratos, deve-se utilizar as condições ideais para que esta expresse sua atividade, ou seja,

deve-se conhecer o pH ótimo, temperatura ótima, cofatores necessários, entre outros (Eisenthal e Seifter, 1990).

É importante ressaltar que a compreensão da planta como um complexo sistema químico e biológico intrinsecamente correlacionado é o primeiro passo para a compreensão geral do mecanismo que leva a formação dos metabólitos secundários de importância cada vez maior para o homem e que já ultrapassa as barreiras do mundo científico e extravasa para o nosso cotidiano.

1.5.2. Experimentos *in vitro*

1.5.2.1. Extração de enzimas solúveis

As enzimas são encontradas na natureza em misturas complexas, usualmente em células, as quais contêm cem ou mais enzimas diferentes além de outros componentes celulares (Dixon e Webb, 1964), e para estudá-las é preciso extraí-las deste meio.

Uma variedade de procedimentos são utilizados para obter o extrato enzimático de enzimas solúveis de plantas superiores, que podem ser classificados dentro de três grupos principais (Bernard, 1955):

Método 1: os extratos de tecidos suculentos, tais como, cenoura e batata, podem ser preparados triturando o tecido em um liquidificador com solução tampão. Este é então filtrado obtendo-se conseqüentemente o extrato enzimático;

Método 2: a preparação de extratos de folhas e meristemas é obtida através da trituração destes em gral e pistilo com solução tampão. Posteriormente a mistura é centrifugada em centrífuga refrigerada a 4°C em tempo pré-estabelecido;

Método 3: a preparação de extratos de folhas pode também ser obtida através da trituração das folhas com acetona congelada. A pasta resultante é filtrada, e o resíduo é seco a temperatura ambiente. Posteriormente, este resíduo é extraído segundo o método 2.

1.5.2.2.. Preservação da atividade enzimática

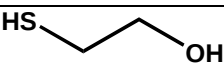
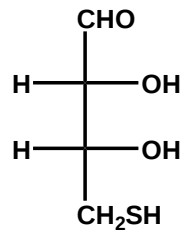
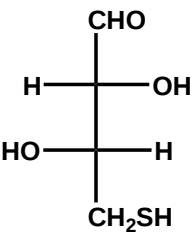
Alguns processos bioquímicos podem ser severamente afetados por uma variação mínima na concentração de íons. Durante uma reação enzimática prótons podem ser consumidos ou liberados, sendo que o pH deve ser mantido estável quando se trabalha com enzimas. Devido a esse fato, é importante o uso de tampões adequados durante o processo de extração enzimática (Johnson, 1971).

O tampão utilizado na homogeneização de tecidos de plantas deve conter altas concentrações de agentes redutores, inativadores de polifenóis e inibidores de proteases. Isso deve ser feito para garantir a estabilidade da enzima durante o processo de extração (Gegenheimer, 1990).

As células vegetais apresentam uma grande quantidade de compostos fenólicos, que podem inibir direta ou indiretamente a atividade da enzima que está sendo estudada, uma vez que estes podem formar ligações de hidrogênio com o oxigênio da ligação peptídica. As cadeias laterais dos ácidos aminados, que são susceptíveis a este ataque, são as hidroxilas, os tióis e as aminas primárias. Os compostos fenólicos podem ser removidos do extrato bruto através da complexação destes com polivinilpolipirrolidona (PVPP), pela adição de agentes redutores fortes para a inativação das fenóis oxidases ou por filtração em gel (Gegenheimer, 1990).

As proteínas intracelulares frequentemente apresentam grupos tióis expostos e estes podem sofrer oxidação durante o processo de extração enzimática, uma vez que o potencial redox do citosol é mais baixo do que no extrato, devido à presença do oxigênio do ar. Esses grupos podem ser protegidos por agentes redutores, tais como o 1,4-ditiotreitol (DTT), 1,4-ditioeritrol (DTE) e o mercaptoetanol (tabela 2, p. 14) (Janson e Rydén, 1989).

Tabela 2: Agentes redutores usualmente utilizados na extração de enzimas.

Agentes redutores	Estrutura
mercaptoetanol	
DTE (1,4-ditioeritrol)	
DTT (1,4-ditiotreitol)	

A presença de metais pesados pode ser prejudicial à estabilidade da enzima principalmente por dois motivos: podem promover a oxidação dos grupos tióis pelo oxigênio molecular, e/ou podem formar complexos com grupos específicos na superfície da enzima. Os metais pesados podem ser removidos por agentes quelantes. O agente mais utilizado é o EDTA, mas também pode ser utilizado o EGTA, o qual é mais específico para o cálcio (Janson e Rydén, 1989). Entretanto, o principal problema para a estabilidade da proteína durante o processo de extração está centrada na presença das proteases. O procedimento mais simples a ser adotado contra a degradação proteolítica é trabalhar em baixas temperaturas. Alternativamente ou como precaução adicional, podem ser adicionados ao tampão extrator alguns inibidores de proteases (tabela 3, p. 15). Em geral os inibidores de proteases são caros, o que pode limitar seus uso em aplicações em larga escala. Além disso alguns são extremamente tóxicos, como é o caso do fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Janson e Rydén, 1989).

Tabela 3: Inibidores de proteases.

Inibidor	Enzimas inibidas	Concentração
fosfato de diisopropilfluor (DFP)	proteases serínicas	-
fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF)	proteases serínicas	0,5-1 mM
EDTA	proteases ativadas por metais	5 mM
substâncias que reagem com cisteína	proteases sulfidrílicas	-
pepstatina A	proteases ácidas	0,1 µm

1.5.2.3. Precipitação de proteínas

Embora a precipitação de proteínas de fluidos biológicos tenha sido utilizada por séculos, como por exemplo a precipitação da caseína do leite por ácido diluído, o fracionamento e a classificação de proteínas com base na solubilidade tornaram-se mais conhecidos na metade do século passado (Englard e Seifter, 1990).

As proteínas podem ser precipitadas através de alterações provocadas no solvente, que consistem em: variação de pH, da força iônica ou de temperatura. Além disso, as propriedades dos solventes podem ser modificadas pela adição de altas concentrações de determinados sais ou solventes orgânicos miscíveis em água (Englard e Seifter, 1990).

Uma das técnicas mais utilizadas é a precipitação provocada pela adição de sais em altas concentrações e com alta força iônica. A precipitação ocorre pela neutralização das cargas da superfície do sal, pela redução da atividade química da enzima, e/ou pela diminuição da concentração efetiva da água. A concentração de qualquer sal necessário para a precipitação de uma proteína em particular está relacionada ao número e a distribuição de cargas e de grupos polares não iônicos na superfície da proteína, embora o tamanho e a forma da proteína também contribua para a precipitação da proteína (Scopes, 1987).

O sulfato de amônio é o agente precipitante mais utilizado. Suas principais vantagens são (Englard e Seifter, 1990):

1. a saturação - em altas concentrações provoca a precipitação da maioria das proteínas;

2. calor de solução - não possui um grande calor de solução, sendo assim o calor gerado é facilmente dissipado;
3. baixa densidade ($1,235 \text{ g/cm}^3$) - mesmo em solução saturada (4,04 M a 20°C) não interfere na sedimentação da maioria das proteínas;
4. em soluções concentradas previne e/ou diminui o crescimento da maioria das bactérias

1.5.2.4. Determinação da concentração de proteínas totais - Método de Bradford

Muitos métodos utilizados na determinação de proteínas podem ser encontrados e a escolha correta do método a ser utilizado depende principalmente de cinco critérios (Stoscheck, 1990):

1. quantidade de proteína disponível para o ensaio;
2. concentração da proteína;
3. especificidade do ensaio;
4. presença de substâncias químicas que possam interferir no ensaio;
5. confiabilidade do ensaio

O método de Bradford foi baseado na observação de que o corante Coomassie Brilliant Blue G-25 existe em duas diferentes cores, vermelha e azul. A ligação do corante com a proteína provoca o deslocamento no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm. O complexo corante-proteína formado tem um alta absorvidade (ϵ) conduzindo assim a uma excelente sensibilidade (Bell, 1988).

Embora a intensidade da cor seja totalmente dependente do pH, soluções tampão apropriadas conduzem a precisa estimativa da concentração de proteína, com nível de detecção de 0,1 g de proteínas. A simplicidade do método de Bradford está associada a sua alta sensibilidade configurando-se no método geralmente escolhido (Bell, 1988).

Entretanto, este método tem mostrado que uma variedade de moléculas de baixo peso molecular, tais como CsCl e guanidina-HCl, interferem na formação da cor, e isto pode conduzir a grandes erros na determinação da concentração de proteínas. Por outro lado, substâncias tais como o TRIS e o ditiotreitol não interferem no método de Bradford, enquanto que as mesmas apresentam um efeito significativo no método de Lowry, outro método bastante utilizado na determinação de proteína (Bell, 1988).

1.5.2.5. Eletroforese

Eletroforese é o processo de movimento de moléculas carregadas sobre a influência de um campo elétrico. Devido ao fato das moléculas moverem-se com uma velocidade dependente de suas cargas, forma e tamanho, a eletroforese tem sido extensivamente utilizada na separação de macromoléculas. Como ferramenta analítica a eletroforese é simples e relativamente rápida (Janson e Rydén, 1989).

A eletroforese de macromoléculas é normalmente conduzida pela aplicação de uma fina camada da amostra em uma matriz porosa. A matriz pode ser composta de diferentes materiais incluindo papel, celulose, acetato, ou géis feitos de poliacrilamida, agarose ou amido. Em géis de poliacrilamida e agarose, a matriz também atua como uma peneira seletiva por tamanho durante a separação (Hoefer Scientific Instruments, 1994).

Os géis de agarose e poliacrilamida apresentam ligações cruzadas formando estruturas como esponjas. O tamanho dos poros destes géis é similar ao tamanho da maioria das proteínas e ácido nucléicos. O movimento das moléculas através do gel pela aplicação da corrente elétrica permite que as moléculas maiores sejam retidas pelo gel em detrimento das menores (Hoefer Scientific instruments, 1994).

Uma vez finalizado o experimento, o gel pode ser analisado qualitativamente ou quantitativamente. A maioria das proteínas e todos os ácidos nucléicos usualmente não são diretamente visíveis, portanto devem ser processados para determinar a localização e a quantidade de moléculas presentes. O procedimento analítico mais utilizado é o tingimento do gel. As proteínas são usualmente reveladas com “Coomasie Brilliant Blue” em uma solução fixadora, ou depois das proteínas serem fixadas ao gel, podem ser reveladas com nitrato de prata por um processo semelhante à revelação fotográfica. Com “Coomasie Brilliant Blue” é possível detectar aproximadamente 1 µg de proteína em uma banda, enquanto que a revelação com prata é 100 vezes mais sensível, detectando aproximadamente 10 ng de proteína (Hoefer Scientific instruments, 1994).

1.6. Estudo biossintético de *Peperomia blanda*

1.6.1. Biossíntese de lignanas – considerações gerais

O termo lignana foi introduzido por Haworth (1936) para descrever um grupo de dímeros de fenilpropanóides, onde as unidades fenilpropanoídicas estavam ligadas pelos carbonos C-8/C-8' (figura 8, p. 19). McCredie e colaboradores (1969) propuseram a extensão do termo para todo produto natural de baixo peso molecular que ocorra do acoplamento oxidativo de unidades de *p*-hidroxifenilpropeno. O termo neolignana foi introduzido por Gottlieb (1972) para substâncias compostas de duas unidades de fenilpropano que apresentavam ligação diferente de C-8/C-8', contudo, este termo foi redefinido como sendo dímeros de unidade alil- e/ou propenilfenil, enquanto que o termo lignana ficou restrito a dímeros de álcoois cinâmicos e/ou ácidos cinâmicos (Gottlieb, 1978). Apesar destas redefinições, estes termos têm sido utilizados amplamente, sendo adotados no ano de 2000 pela IUPAC. A IUPAC finalmente definiu que, lignanas são dímeros de C_6C_3 unidos pela ligação entre os carbonos C-8/C-8', enquanto que as neolignanas são dímeros cuja união entre as duas unidades seja diferente de C-8/C-8' (Moss, 2000).

As lignanas e neolignanas são metabólitos secundários de ocorrência restrita em plantas vasculares (Gottlieb, 1984) e formadas pela dimerização (acoplamento oxidativo) de duas unidades fenilpropanoídicas (C_6C_3). Esses fenilpropanóides são provenientes da via do chiquimato e resultantes da desaminação da fenilalanina e/ou tirosina (Dewick, 1998; Knaggs, 2001), levando a produção de ácidos cinâmicos e, por redução destes, a álcoois cinâmicos substituídos. Etapas posteriores de redução resultam finalmente em alil- e fenilpropanóis, os quais, através de acoplamentos oxidativos iniciados por peroxidases ou lacases, produzem um grande número de lignóides.

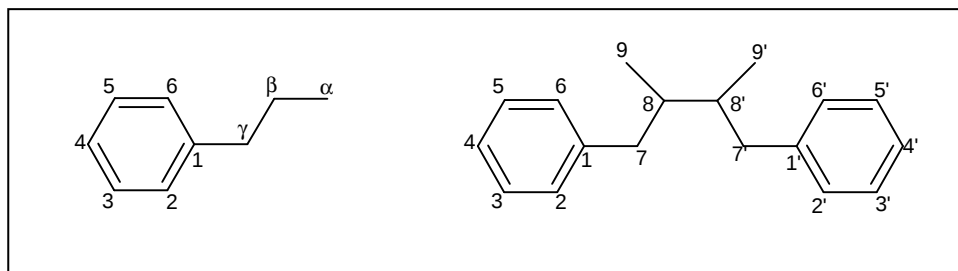


Figura 8: Ligação dos carbonos 8 e 8' de duas unidade C₆C₃ para formação das lignanas.

Estas substâncias desempenham funções específicas na interação planta-planta, planta-inseto, planta-fungo e na defesa contra patógenos e predadores (Ghisalberti, 1997; Ward *et al.*, 1984; Kuo *et al.*, 1993).

Os primeiros relatos envolvendo biossíntese de lignanas surgiram em 1965 (Neish, 1965). Ao lado dos compostos derivados da via do acetato e dos flavonóides, as lignanas são um grupo de metabólitos secundários que tem sua biossíntese bastante estudada. Isto se deve ao fato destes compostos terem apresentado um grande número de atividades biológicas importantes, como por exemplo, antitumoral, antimetabólico, e antiviral (Macrae e Towers, 1984; Aires e Loike, 1990; Umezawa, 1996). Sua rota de formação está estritamente relacionada com a dos alil- e propenilfenóis, bem como as ligninas.

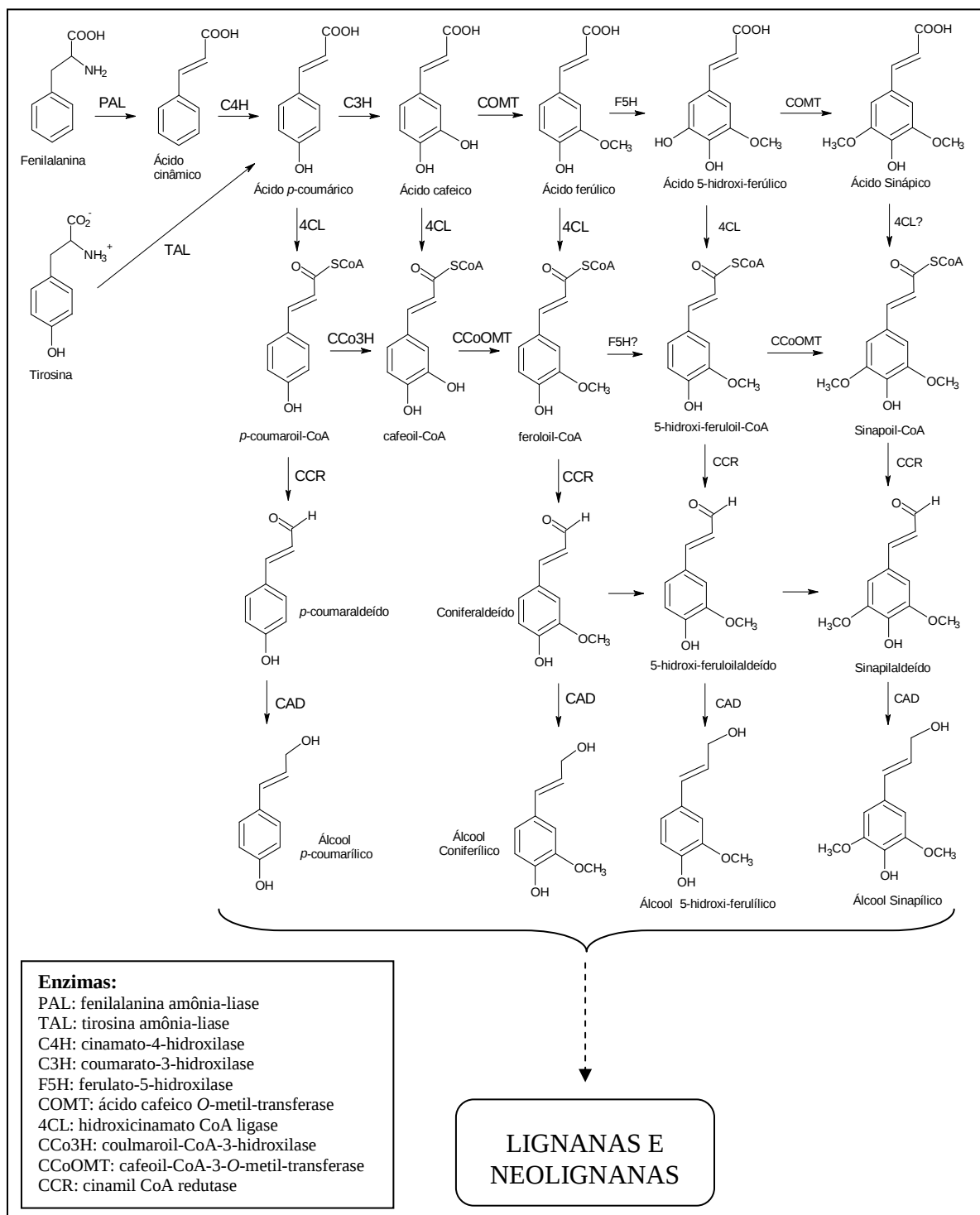


Figura 9: Via fenilpropanoídica geral de formação das lignanas e neolignanas.

As ligninas são polímeros naturais cujas unidades básicas são os mesmos monolignóis responsáveis pela biossíntese das lignanas e propenil- e alilfenóis (Sarkanen e Ludwig, 1972). O acoplamento oxidativo que leva a formação das lignanas e ligninas na natureza ocorre de modo diferente. No caso das lignanas, existe a ação de enzimas com alto controle régio- e

estereosseletivo levando a produtos opticamente ativos, enquanto que o acoplamento oxidativo que ocorre na biossíntese de ligninas dá origem a produtos racêmicos.

Por se tratarem de fenóis, os monolignóis que constituem as unidades formadoras de lignanas e ligninas sofrem ação das peroxidases e lacases formando os chamados intermediários quinona-metídeos, que, posteriormente, entram ressonância. As posições onde o radical se estabelece nas formas canônicas são preferencialmente 1, 3, 5 e 8 (figura 10, p.21). Esses radicais sofrerão acoplamentos oxidativos e vão dar origem a variadas formas de esqueletos básicos das lignanas e neolignanas.

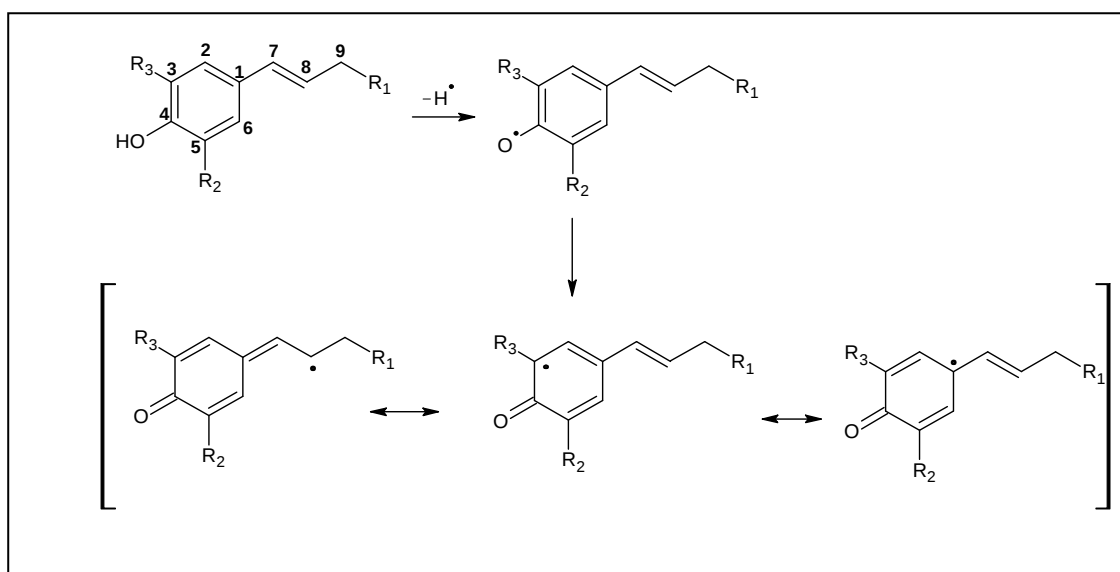


Figura 10: Formação de um radical fenóxido iniciado por peroxidases e lacases e suas estruturas de ressonância.

Apesar do número de esqueletos carbônicos serem limitados para as lignanas (acoplamento 8-8'), elas apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas, inclusive de estereoquímica, devido aos diferentes precursores monoméricos que geram novos subgrupos de lignanas por ciclizações e/ou modificações nos esqueletos carbônicos (Agrawal e Thakur, 1985; Lee e Xiao, 2003; Umezawa, 2003; Fuss, 2003).

1.7. Fenilalanina-amônia-liase (PAL)

A enzima fenilalanina-amônia liase (PAL) é tida como uma das mais importantes enzimas envolvidas no metabolismo fenilpropanoídico. A etapa mediada pela PAL é a iniciadora da sequência de reações que produzirão os diversos metabólitos desta via, como fenilpropanóides, flavonóides e lignanas, assim como também é responsável por produtos do metabolismo primário, como as ligninas (El-Shora, 2002). A PAL atua na conversão do aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico (figura 12, p. 23), que sofre uma série de transformações posteriores como hidroxilações, metilações, oxidações e reduções que vão dar origem aos produtos naturais acima citados (Jones, 1984).

A fenilalanina-amônia-liase (PAL) foi detectada pela primeira vez por Kuokol e Conn (1961) e a estrutura de uma de suas isoformas pode ser observada na figura 11 (p. 22). Esta enzima está localizada no citoplasma (Shaw *et al.*, 1990) e catalisa a eliminação de amônia e do hidrogênio 3-pró-S da fenilalanina para formar ácido *trans*-cinâmico (Rettig *et al.*, 2000) (figura 12, p. 23).

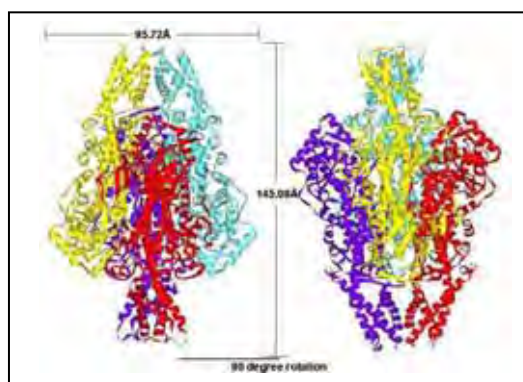


Figura 11: Estrutura da fenilalanina-amônia-liase (PAL)

http://stevens.scripps.edu/pku_ar.html (15/06/2007)

A PAL desempenha um papel importante na cor e aroma de frutos, assim como na resistência da planta (Mauch-Mani e Slusarenko, 1996). Além de plantas (Whetten e Sederoff, 1992; Kuokol e Conn, 1961), esta enzima foi encontrada também em cultura de células (Campbell e Ellis, 1992) e fungos, mas não em bactérias e tecidos animais (Kim *et al.*, 1996).

Estas enzimas usualmente apresentam estruturas do tipo tetrâmero, com peso molecular muito variado, mas em sua maioria estão entre 280000 e 330000 daltons (Dubery e Smit, 1994).

A produção da PAL é regulada durante o crescimento vegetal, mas também é induzida em células vizinhas ao local de infecção por vários estímulos ambientais, como ferimentos, contaminação por metais pesados, luz e reguladores de crescimento (Pinheiro *et al.*, 1999; Hahlbrock e Scheel, 1989; Kombrink e Somssich, 1995).

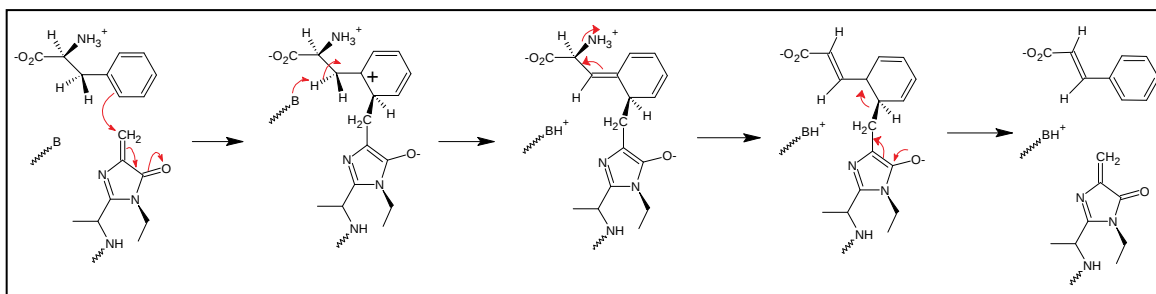


Figura 12: Mecanismo de reação da transformação de *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) (Rettig *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do projeto foram determinar o perfil do metabolismo constitutivo das partes aéreas de *Peperomia blanda* e dar início aos estudos do proteoma envolvido na biossíntese dos metabólitos aromáticos isolados.

Objetivos específicos:

- Isolar e identificar compostos presentes nas partes aéreas de *Peperomia blanda*.
- Submeter as substâncias isoladas a ensaio biológico.
- Determinar atividade enzimática da PAL (fenilalanina amônia-liase) presente nas folhas de *P. blanda*, a qual é a enzima iniciadora das rotas biossintéticas das lignanas estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material botânico

As partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda* utilizados nos estudos químicos foram coletadas na Reserva Ecológica da Ripasa, no município de São Carlos – SP, sendo que para a obtenção do primeiro extrato, a coleta foi realizada em janeiro de 2005 e, para a obtenção do segundo extrato, em janeiro de 2007. O material vegetal foi identificado previamente pela Dra. Elsie Franklin Guimaraes, e a exsicata foi depositada no Instituto de Biociência da USP, São Paulo (Kato-547).

Para realizar os experimentos com a enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), foram utilizadas folhas de plantas adultas de *Peperomia blanda* coletadas na casa de vegetação do Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

3.2. Cromatografia

3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise do extrato obtido foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico VARIAN ProStar com sistema quaternário de bombas modelo 240, detector UV – visível Diode Array modelo 230 e injetor auto Sampler modelo 410, mantido em ambiente climatizado a 25°C. A coluna analítica utilizada foi de sílica de fase reversa (C-18), Phenomenex, com tamanho de 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 UV-Vis modelo 320. A coluna preparativa utilizada foi Phenomenex, Phenyl-Hexyl, com tamanho 250 x 21,20 mm e partículas de 10 µm.

Para cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica para análises biossintéticas foi utilizado um cromatógrafo SHIMADZU, constituído por quatro bombas SHIMADZU modelo LC-10 e um detector UV-Vísivel SHIMADZU modelo SPD-10. A coluna utilizada foi de sílica de fase reversa Supelcosil LC -18, 250 x 4,60 mm, 5 µm, Supelco.

3.2.2. Eletroforese

A cuba utilizada na eletroforese SDS-PAGE foi uma Hoefer Mighty Small Mini-vertical Units SE 260.

A eletroforese 2D foi realizada utilizando o sistema o *Multiphor II* para a focalização das proteínas, sendo que as tiras de gradiente de pH imobilizados (IPG) foram comercialmente obtidas na forma desidratada e antes de serem utilizadas foram reidratadas na bandeja de reidratação (*DryStrip Reswelling Tray*). Na segunda dimensão foi utilizada uma cuba de eletroforese SE 600 Ruby system.

3.3. Solventes

Os solventes utilizados na obtenção e fracionamento dos extratos foram de grau P.A. e para cromatografia líquida de alta eficiência foram grau HPLC da marca J.T.Baker®.

3.4. Espectrofotometria UV/Visível

As análises no UV foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/Visível modelo “Ultrospec 2100 pro UV/Visible”, sendo que os dados foram manipulados utilizando o software “Swift II”.

3.5. Espectrometria

3.5.1. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . Como solvente foi utilizado CDCl_3 (99,8 %). Os deslocamentos químicos foram expressos δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

3.5.2. Espectros de massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro *Fisons-Platform II*, via ionização por electrospray. Gás nebulizador He.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro Bruker Daltronics, Billerica, MA modelo ultrOTOFQ ESI-TOF com as seguintes especificações de análise: voltagem da sonda do eletrospray 3 kV; voltagem do cone 25 V; nitrogênio foi usado como gás nebulizante a 345 L/h e 27 L/h, respectivamente), acoplado a um aparelho de CLAE da marca Varian PrepStar modelo SD-1 LC/UV/VIS com coluna C-18 Supelcosil (250 x 21.2 mm, Supelco).

3.6. Equipamentos

A centrífuga refrigerada utilizada durante o processo de extração enzimática é da marca SORVALL® RC PLUS.

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

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Estudo químico de *Peperomia blanda*

4.1.1. Perfil cromatográfico

Peperomia blanda (figura 13, p. 28) é uma planta pequena que pode atingir até 30 cm de altura e que possui raízes não muito profundas (plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au, 13/03/2008), tornando possível e fácil o estudo das raízes separadamente das partes aéreas. Flores e frutos ocorrem no ápice da planta e seus extratos também foram analisados para comparação de seus componentes.



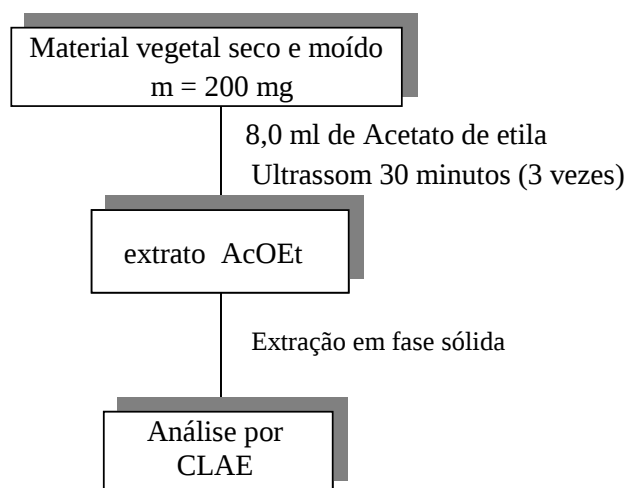
Figura 13: Foto de *Peperomia blanda* inteira (autoria da foto: Lidiane G. Felipe).

O perfil cromatográfico foi realizado com extratos de partes aéreas, raízes e frutos da espécie. Para obtenção dos extratos foram utilizados 200 mg dos materiais vegetais secos e moídos, os quais foram extraídos com 8 mL de acetato de etila em ultrassom, durante 30 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes. A solução foi filtrada e concentrada em rotaevaporador. Após secagem dos extratos, a massa obtida para as partes aéreas foi de 21,8 mg, para as raízes foi de 2,4 mg e para os frutos a massa obtida foi de 12,5 mg.

Todos os extratos analisados foram submetidos a uma extração em fase sólida prévia para retirada de compostos apolares. Para isso utilizou-se cartuchos SPE Strata (C-18-E 500 mg/3 mL), os quais foram ativados com 3 mL de metanol e depois condicionados em MeOH:H₂O na proporção 4:1. Os extratos foram dissolvidos em 1 mL da mesma fase móvel de

condicionamento do cartucho EFS e aplicados neste, sendo que para eluição da amostra foram adicionados mais 4 mL de fase móvel.

A condição utilizada em CLAE foi de gradiente com acetonitrila (35% ACN → 100% ACN) em 40 minutos e mais 15 minutos com acetonitrila 100%, com fluxo de 1 mL/min. Foram injetados 50 µL de cada extrato (esquema 1, p. 29).



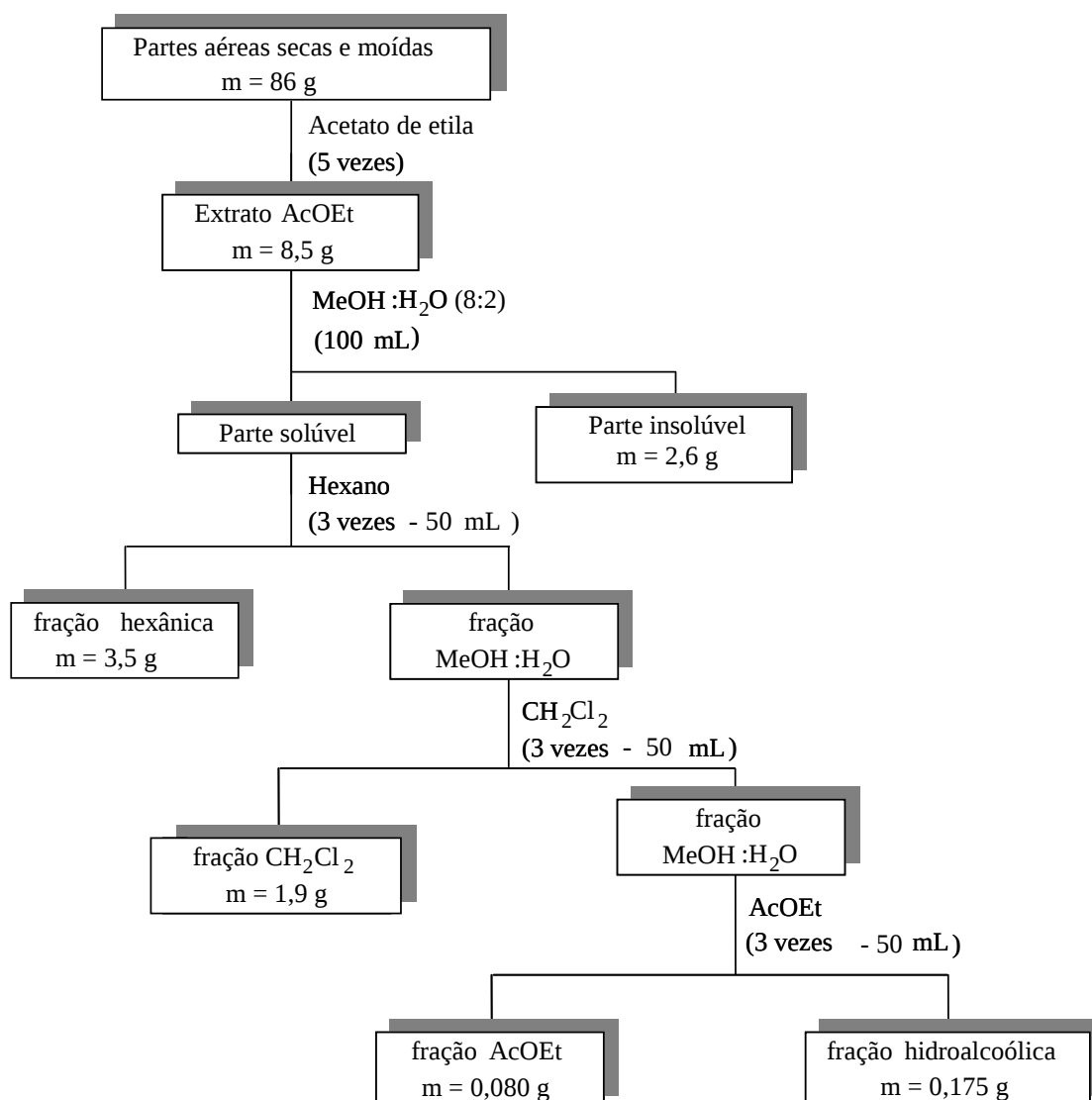
Esquema 1: Procedimento geral para análise do perfil químico dos extratos de partes aéreas, raízes e frutos de *Peperomia blanda*.

4.1.2. Extração e purificação de substâncias

As partes aéreas de *Peperomia blanda* foram secas em estufa a 40°C e trituradas em moinho Wiley. Posteriormente, as partes aéreas secas e trituradas (86 g) foram submetidas à extração com acetato de etila (5 vezes – 300 mL), por maceração. O extrato obtido (8,5 g) foi dissolvido em MeOH:H₂O na proporção 8:2 (100 mL) e a solução obtida foi colocada em um funil de separação. Uma parte do extrato de massa 2,6 g não foi solúvel na fase móvel citada e foi reservada.

Foi realizada extração líquido-líquido com a parte solúvel do extrato com hexano (3 vezes – 50 mL) e a solução obtida na extração foi concentrada em rotaevaporador (3,5 g). A fração MeOH:H₂O restante foi então extraída com CH₂Cl₂ (3 vezes – 50 mL) e concentrada em rotaevaporador (1,9 g). Por último a fração MeOH:H₂O foi extraída com AcOEt (3 vezes - 50

mL) e concentrada em rotaevaporador (0,080 g). A fração hidroalcoólica foi concentrada em rotaevaporador (0,175 g) (esquema 2, p. 30).



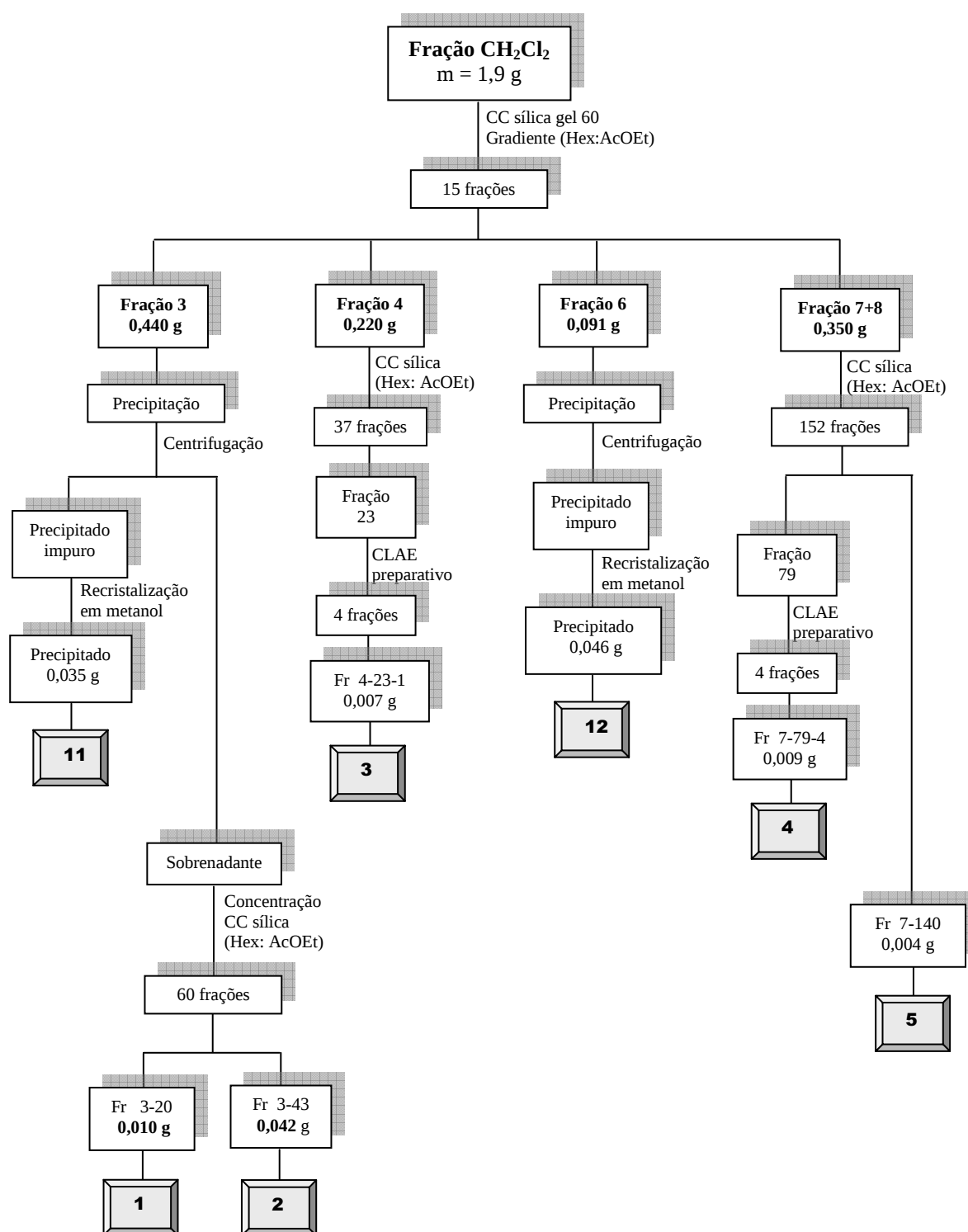
Esquema 2: Partição líquido-líquido do extrato AcOEt 1 das partes aéreas de *P. blanda*.

Iniciou-se o estudo fitoquímico pela fração CH₂Cl₂, a qual foi submetida a uma CC de sílica gel 60 de 5 cm de altura e 4 cm de diâmetro eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), sendo coletadas 15 frações.

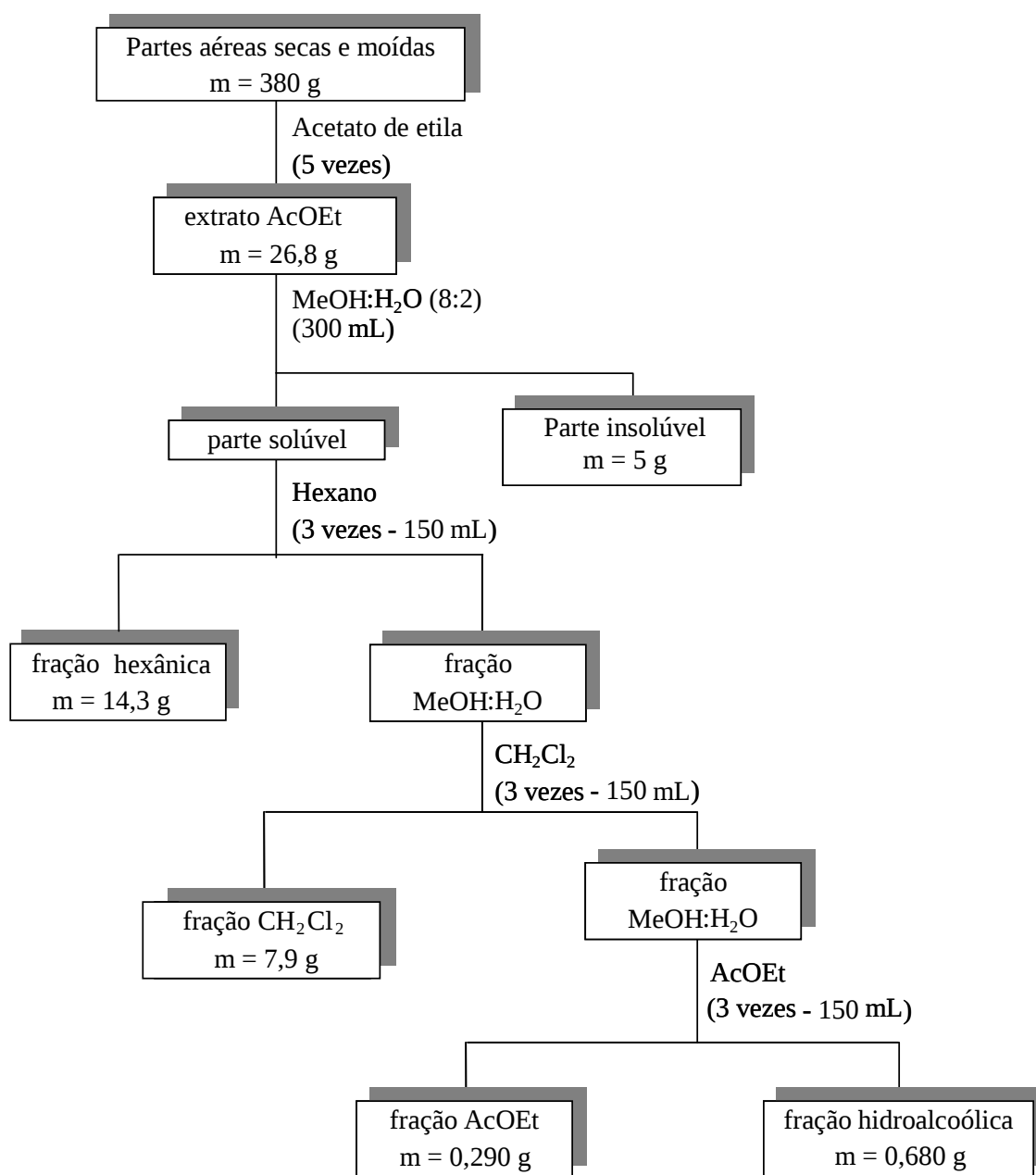
As frações 3 e 6 apresentaram precipitados amarelos, os quais foram separados por centrifugação e posteriormente recristalizados em metanol, sendo identificados respectivamente como as substâncias **11** (0,035 g) e **12** (0,046 g).

O sobrenadante da fração 3 foi concentrado em rotaevaporador (0,400 g) e posteriormente submetido a uma coluna de sílica (23 cm de altura e 2 cm de diâmetro) eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), obtendo-se 60 frações. Estas subfrações foram analisadas por CCDC e observou-se que as frações 3-20 e 3-43 estavam puras e foram identificadas como sendo as substâncias **1** (m = 0,010 g) e **2** (m = 0,042 g), respectivamente. A fração 4 (0,220 g) também foi fracionada utilizando uma coluna de sílica (16 cm de altura e 2 cm de diâmetro) eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), obtendo-se 37 frações. A subfração 4-23 foi fracionada em CLAE preparativo, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O na proporção 58:42, originando 4 frações na qual a subfração 4-23-1 foi identificada como sendo a substância **3** (0,007 g). As frações 7 e 8 foram reunidas (0,350 g) e submetidas a uma coluna de sílica (20 cm de altura e 2 cm de diâmetro) eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), obtendo-se 152 frações que foram analisadas por CCDC e observou-se que a subfração 7-140 estava pura e foi identificada como sendo a substância **5** (0,004 g) e a subfração 7-79 foi fracionada em CLAE preparativo, sendo a fase móvel MeOH:H₂O na proporção 50:50, originando 4 frações na qual a subfração 7-79-4 foi identificada como sendo a substância **4** (0,009 g) (esquema 3, p. 32).

Com o intuito de isolamento de maior quantidade das substâncias encontradas previamente, bem como na obtenção e identificação de novas substâncias, uma nova coleta foi realizada e um segundo extrato foi obtido a partir de 380 g de partes aéreas de *Peperomia blanda* secas e moídas. O extrato foi obtido pelos mesmos procedimentos anteriormente descritos, obtendo-se então 28,6 g do extrato AcOEt bruto. Foram também realizados os mesmos procedimentos de particionamento líquido-líquido com solventes de polaridades diferentes, tomando o cuidado de utilizar volumes proporcionais à nova massa de extrato. A massa não solúvel do extrato no solvente de partida para o particionamento foi de 5 g. A massa da fração hexânica foi de 14,3 g, da fração CH₂Cl₂ foi de 7,9 g, da fração AcOEt foi de 0,290 g e finalmente da fração hidroalcoólica foi de 0,680 g (esquema 4, p. 33).

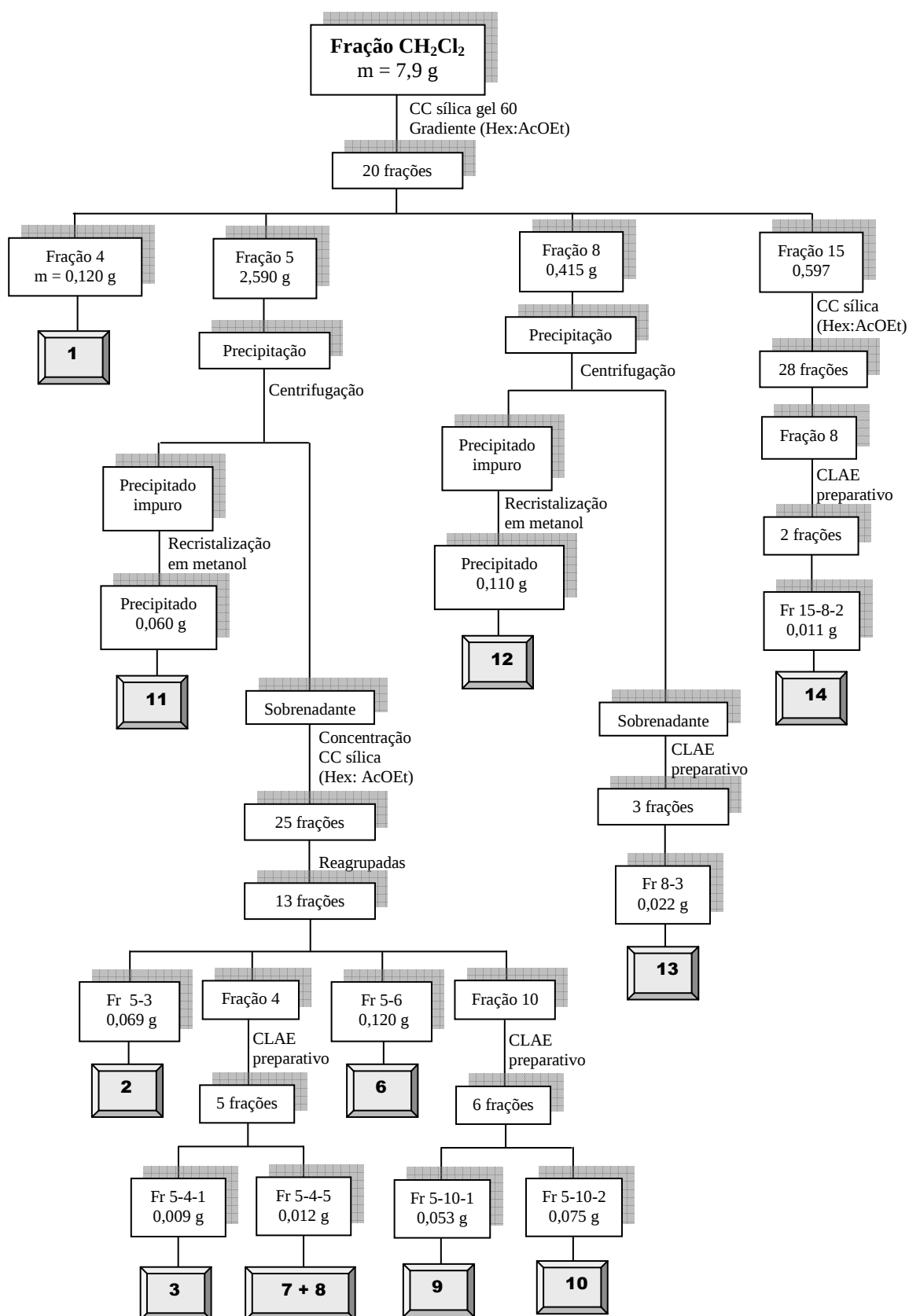


Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂ do extrato AcOEt 1 das partes aéreas de *P. blanda*.

Esquema 4: Partição líquido-líquido do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de *P. blanda*.

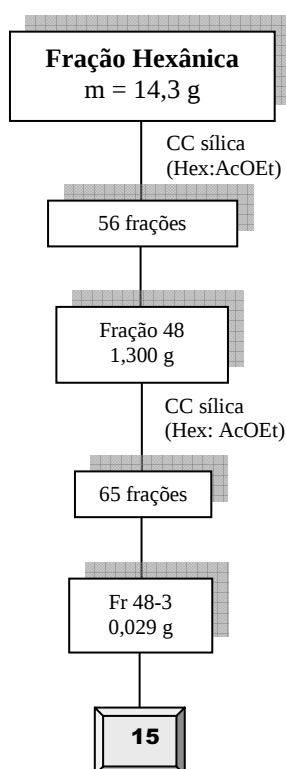
A fração CH₂Cl₂ foi então novamente submetida a uma CC de sílica gel 60 de 20 cm de altura e 6 cm de diâmetro eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), sendo coletadas 20 frações de 600 mL.

As frações 5 e 8 apresentaram os mesmos precipitados amarelos do extrato anterior, os quais foram separados por centrifugação e posteriormente recristalizados em metanol, sendo identificados respectivamente como as substâncias **11** (0,060 g) e **12** (0,110 g), previamente encontradas na espécie. A fração 4 (0,120 g) foi identificada como a substância **1** já isolada do extrato anterior. O sobrenadante da fração 5 foi concentrado (2,5 g) e submetido a uma coluna de sílica (27 cm de altura e 4 cm de diâmetro) eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), obtendo-se 25 frações que foram analisadas por CCDC utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (6:4) e agrupadas de acordo com seus R_f, resultando em 13 frações. A subfração 5-3 foi identificada como sendo a substância **2** (0,069 g) também já isolada de partes aéreas de *Peperomia blanda*. A subfração 5-4 foi fracionada em CLAE preparativo, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O na proporção 52:48, originando 5 frações na qual a fração 5-4-1 foi identificada como sendo a substância **3** (0,009 g) também já isoladas da espécie e a fração 5-4-5 como sendo uma mistura das substâncias **7** e **8** (massa da fração = 0,012 g). A subfração 5-6 foi identificada como sendo a substância **6** (0,120 g). Finalmente a fração 5-10 também foi submetida a cromatografia em CLAE preparativo, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O na proporção 60:40, originando 6 frações na qual a fração 5-10-1 foi identificada como sendo a substância **9** (0,053 g) e a fração 5-10-2 como a substância **10** (m = 0,075 g). O sobrenadante da fração 8 também foi concentrado obtendo-se 0,290 g e submetido a fracionamento em CLAE preparativo, originando 3 frações na qual a subfração 8-3 foi identificada como sendo a substância **13** (0,022 g). A fração 15 (m = 0,597 g) foi submetida a fracionamento em coluna de sílica (25 cm de altura e 3 cm de diâmetro) eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt), obtendo-se 28 frações. A subfração 15-8 foi fracionada em CLAE preparativo, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O na proporção 65:35, originando 2 frações na qual a fração 15-8-2 foi identificada como sendo a substância **14** (0,011 g) (esquema 5, p. 35).



Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração CH_2Cl_2 do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de *P. blanda*.

Deste último extrato, iniciou-se também o estudo da fração hexânica, a qual foi submetido a um fracionamento inicial em coluna de sílica (20 cm de altura e 3 cm de diâmetro), utilizando como fase móvel Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100% AcOEt). Deste fracionamento obteve-se 56 amostras, as quais foram analisadas por CCDC. A subfração 48 (m = 1,3 g) foi então submetida a novo fracionamento, utilizando coluna de sílica (24 cm de altura e 3 cm de diâmetro) e gradiente de Hex:AcOEt como fase móvel (100% Hex → 100% AcOEt). Deste fracionamento obteve-se 65 frações, onde a fração 48-3 foi identificada como sendo a substância **15** (0,029 g) (esquema 6, p. 36).



Esquema 6: Fracionamento cromatográfico da fração hexânica do extrato AcOEt 2 das partes aéreas de *P. blanda*.

4.2. Atividades biológicas

4.2.1. Ensaio tripanocida *in vitro*

Para a realização dos testes tripanocidas foi utilizada a forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mantida em meio de cultura LIT, incubado à 28°C (Bernacchi *et al.*, 2002).

As substâncias avaliadas foram diluídas em 3,0 µL de água esterelizada (podendo conter até 3% de DMSO) que foi somado a 72,0 µL de meio LIT. O volume final de 75,0 µL continha concentração da substância teste igual a 0,333 mg/mL e 10⁵ células/poço. A menor diluição encontrava-se no primeiro poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (ELISA). A partir deste foram efetuadas diluições seriadas, de ordem 3, com a transferência sucessiva de 25µL para os poços subseqüentes até o 7º. Em outras duas colunas foram efetuados o controle negativo, o qual continha as mesmas condições da coluna teste, exceto pela ausência da substância a ser avaliada e o controle positivo benznidazol, isolado a partir do medicamento Rochagan® (Roche), através de solubilização em AcOEt. A pureza e integridade do padrão positivo foram evidenciadas através de análise por RMN de ¹H e ¹³C. As placas tampadas foram incubadas a 28°C por 72 horas e utilizou-se, para a visualização da atividade tripanocida, a contagem do número de parasitas viáveis em câmara de Neubauer.

Os testes foram realizados pela equipe da Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, no Laboratório de Imunologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, em Araraquara.

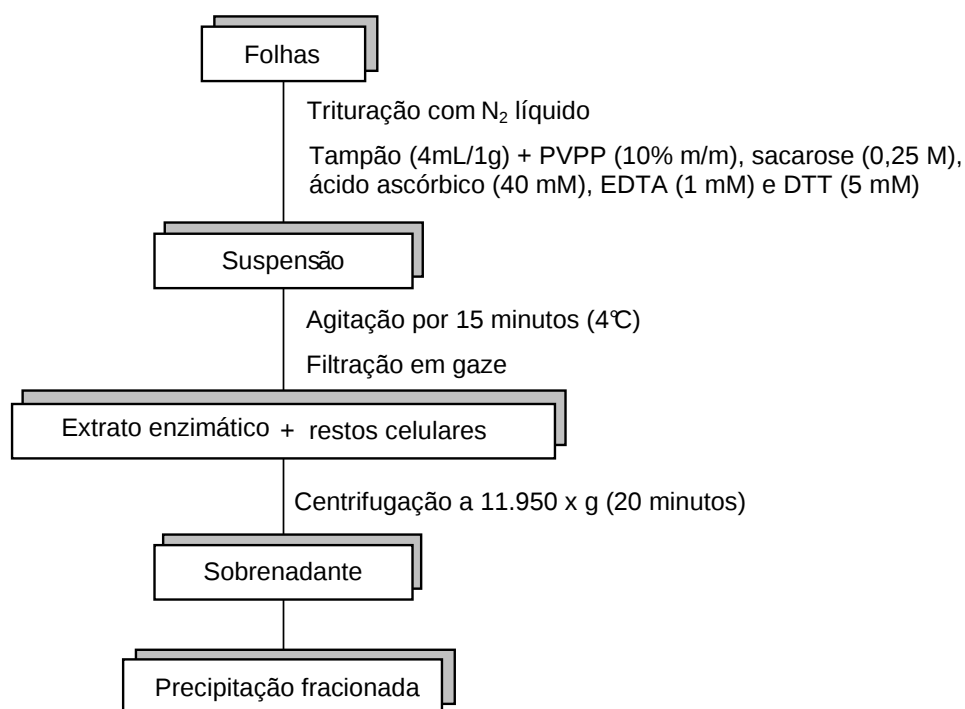
4.3. Estudo biossintético de *Peperomia blanda*

4.3.1. Determinação da atividade enzimática da PAL em folhas de plantas adultas de *Peperomia blanda*

4.3.1.1. Extração enzimática

A extração da enzima PAL envolvida na primeira etapa da biossíntese das lignanas foi realizada utilizando-se folhas de *Peperomia blanda*. 25 g de folhas foram trituradas em N₂ líquido utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente, foi adicionado 100 mL de solução tampão borato 0,1M (pH 8,8). A solução tampão continha PVPP (10% m/m), sacarose (0,25 M), ácido ascórbico (40 mM), EDTA (1 mM) e DTT (5 mM).

A suspensão obtida foi agitada por 15 minutos em banho de gelo antes do experimento. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze para um tubo de centrifuga mantido a 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 (esquema 7, p. 39).



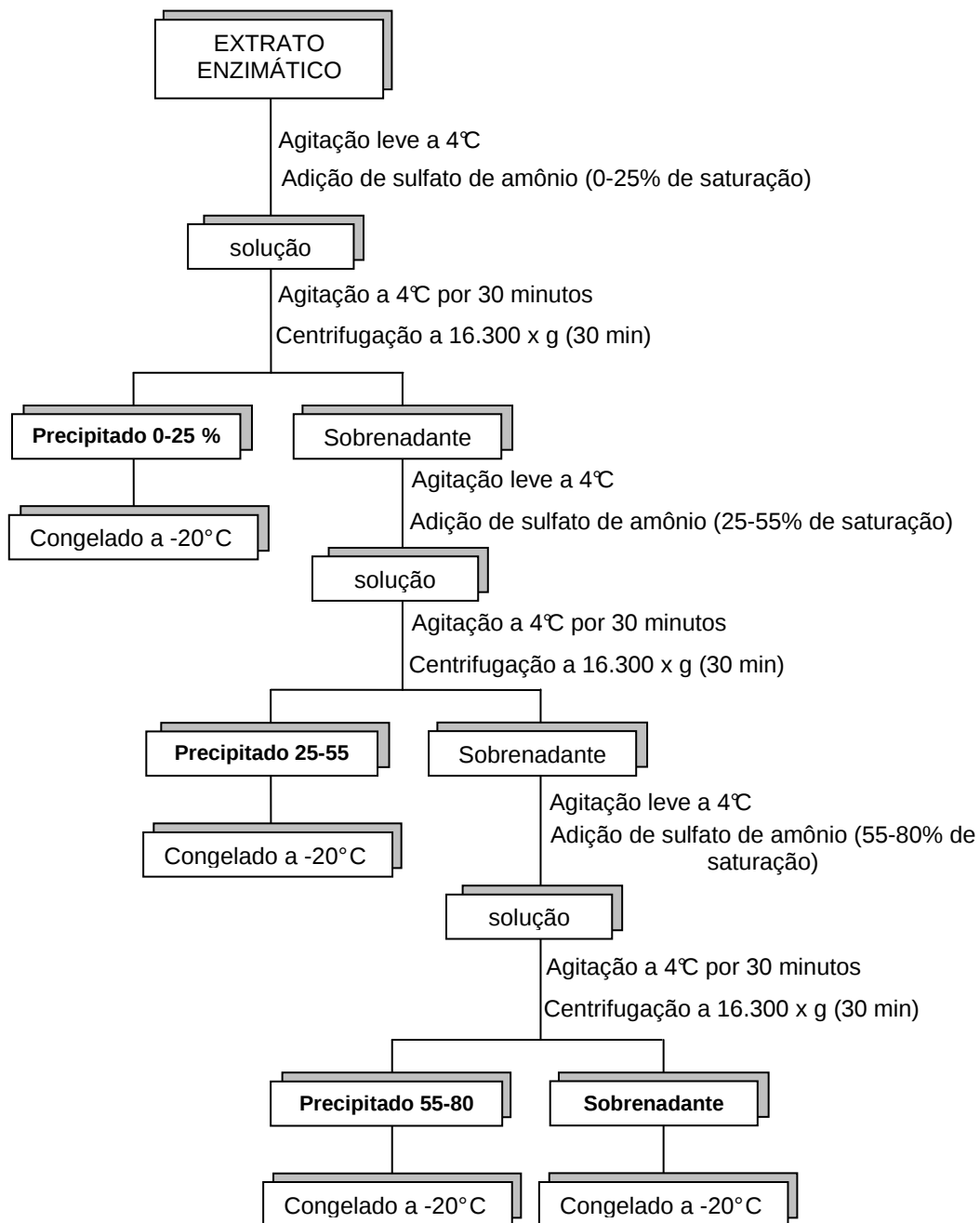
Esquema 7: Obtenção do extrato enzimático de folhas de *Peperomia blanda*.

4.3.1.2. Precipitação fracionada

Após obtenção da solução enzimática, foi realizada uma precipitação fracionada com o intuito de obter frações mais concentradas da enzima PAL. A quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para atingir a saturação desejada foi determinada utilizando a tabela descrita por Englard (1990) (tabela 4, p. 39). Primeiramente foi adicionado sulfato de amônio para atingir a saturação de 25%. Após todo o sal ter sido adicionado, a solução foi mantida sob agitação por 30 minutos a 4°C e posteriormente foi centrifugada a 16.300 x g por 30 minutos. O precipitado foi congelado a -20°C e o sobrenadante foi levado a 55% de saturação, como descrito anteriormente. Uma última adição de sulfato de amônio foi realizada para que o sobrenadante atingisse 80% de saturação (esquema 8, p. 40).

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

saturação (%)	sulfato de amônio (g/L)
0 – 25	134
25 – 55	179
55 – 80	161



Esquema 8: Precipitação fracionada com sulfato de amônio.

4.3.1.3. Dessalinação

Os precipitados obtidos na precipitação fracionada foram ressuspensos em 3 mL solução tampão borato 0,1M (pH 8,8).

As frações obtidas foram dessalinizadas utilizando-se coluna PD-10, sendo que para cada fração foi utilizada uma coluna diferente. As colunas foram equilibradas com 25 ml de

solução tampão borato 0,1M (pH 8,8). Posteriormente, foi adicionada uma alíquota de 2,5 ml da solução a ser dessalinizada e esta descartada. A eluição das frações foi feita utilizando-se 3,5 ml de solução tampão.

4.3.1.4. Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando-se o método de Bradford modificado. O reagente foi preparado utilizando 500 µL de HCl 0,6 M onde foi adicionado Coomassie blue até que foi observado uma 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 leituras a 595 nm.

O teste foi realizado utilizando-se 10 µL das frações dessalinizadas, 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 a leitura das absorbâncias a 595 nm foi anotada. A determinação da concentração protéica foi realizada em triplicata.

4.3.2. SDS-PAGE

Após as frações serem dessalinizadas e as concentrações protéicas definidas, estas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Primeiramente as frações foram diluídas para uma concentração próxima a 1 mg/mL. As amostras foram preparadas misturando-se 15 mL destas frações com 5 mL de solução tampão de corrida (*loading buffer*), o qual foi preparado da seguinte maneira:

- 0,83 mL de solução tampão TRIS-HCl 1,5 M (pH 6,8)
- 4,0 mL de glicerol
- 4,0 mL de SDS 20%
- 37,22 mg de EDTA
- 0,4 mg de azul de bromofenol
- o volume foi completado até 10 mL com água destilada, e esta solução foi armazenada a -20°C em alíquotas de 290 µL, sendo que antes do uso foi adicionado 13,5 µL de DTT (0,5 M)

Após as frações serem misturadas com a solução tampão de corrida, foram aquecidas em banho a 100°C por 5 minutos. Estas soluções foram então centrifugadas a 14.000 rpm por alguns segundos e posteriormente aplicadas no gel.

Removeu-se cuidadosamente o pente do gel e adicionou-se solução tampão até preencher todos os espaços. A solução tampão foi preparada segundo o protocolo descrito abaixo:

- 0,025 M TRIS
- 0,192 M de glicina
- 0,1% de SDS
- pH = 8,3
- foram preparados 4 litros de solução, os quais foram armazenados a 4°C.

Aplicou-se todas as amostras ao gel, de forma que cada uma foi colocada em uma janela do gel. A solução padrão (10 µL) foi adicionada pelo menos em uma das janelas do gel, geralmente na primeira e na última.

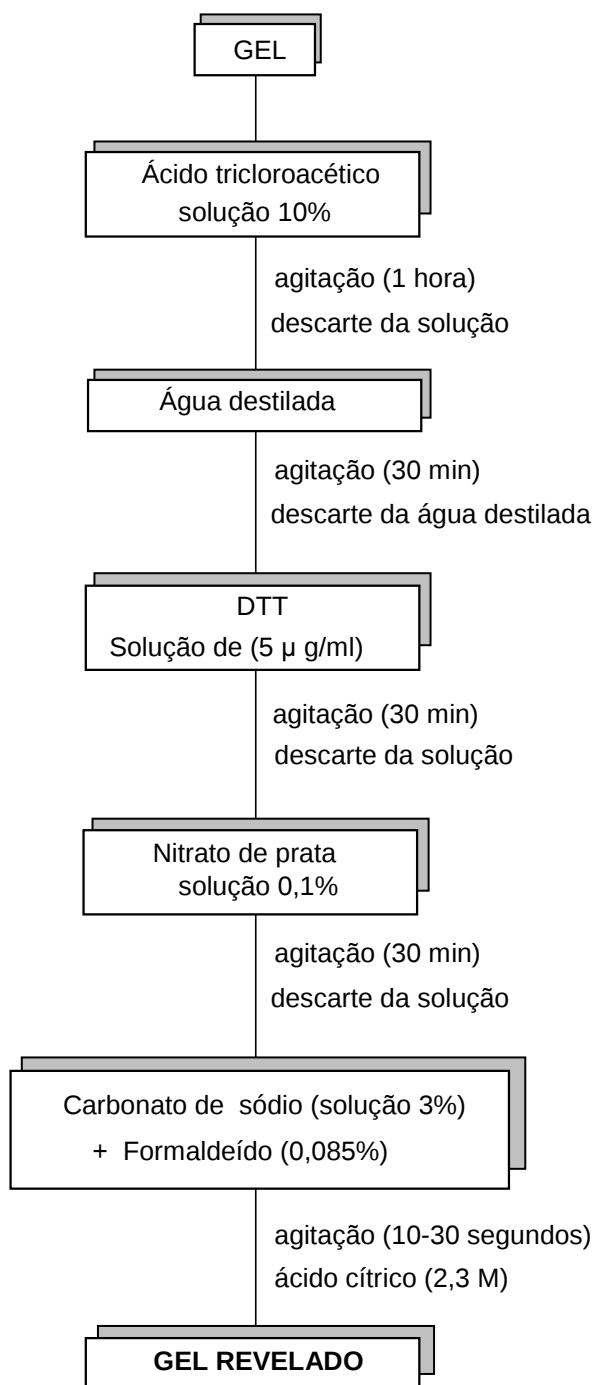
Como padrão foi utilizado 3 mL de uma solução que continha as enzimas descritas na tabela 5 (p. 42). A esta solução foram adicionados 25 mL de água destilada e 10 mL de tampão de corrida. O mesmo procedimento de aquecimento e centrifugação descrito para as amostras foi realizado com a solução padrão. Cerca de 10 µL deste padrão foram aplicados na primeira janela do gel.

Tabela 5: Enzimas presentes na solução padrão utilizada na eletroforese e seus respectivos massas moleculares

Enzimas	massa molecular (daltons)
fosforilase b	97.400
albumina sérica	66.200
ovalbumina	45.000
anidrase carbônica	31.000
inibidora de tripsina	21.500
α-lactalbumina	14.437

Ao gel foi então aplicado uma corrente de 20 mA e quando o tampão de corrida atingiu o final do gel, a fonte de corrente foi desligada. Neste momento, o gel foi retirado do suporte e iniciou-se o processo de revelação.

O gel foi colocado em uma solução 10% de ácido tricloroacético, na qual permaneceu por uma hora, sob agitação. Esta solução foi então descartada e adicionou-se água destilada. O gel ficou sob agitação em água destilada por 30 minutos. A solução foi então descartada e adicionou-se uma solução de DTT (5 µg/ml), na qual o gel ficou sob agitação por mais 30 minutos. Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionou-se uma solução 0,1% de nitrato de prata, a qual foi devidamente descartada após 30 minutos. Em seguida foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 3%, que continha 0,085% de formaldeído, após 10-30 segundos esta solução foi descartada, adicionando-se outra vez a solução de carbonato de sódio e formaldeído. Após o aparecimento das bandas relativas as proteína, a reação foi finalizada adicionando-se uma solução 2,3 M de ácido cítrico até não se observar mais o desprendimento de CO₂. Após 1 hora esta solução foi descartada, o gel foi lavado com água destilada por três vezes (esquema 9, p. 44).

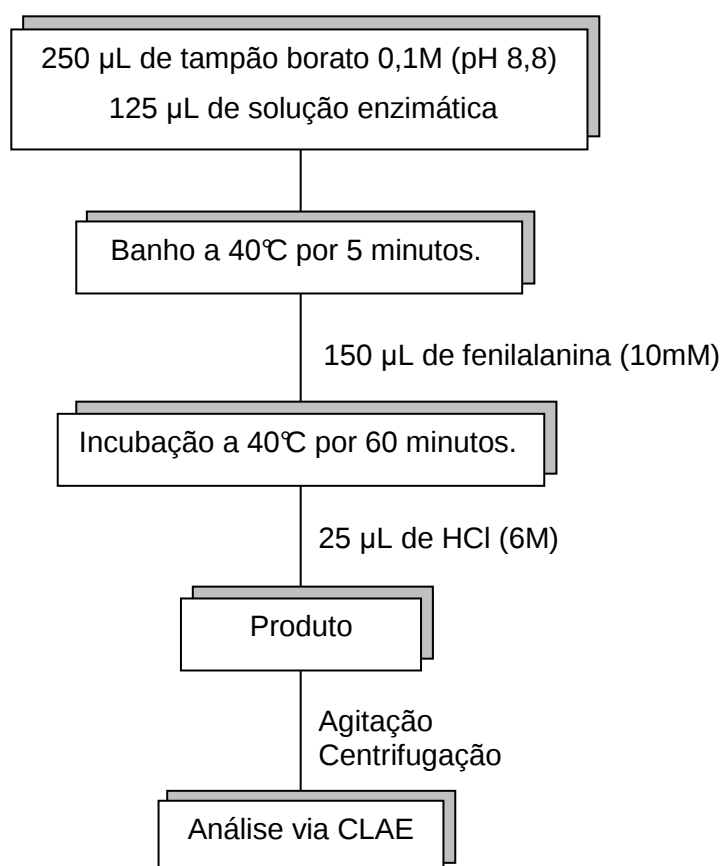


Esquema 9: Revelação do gel utilizando nitrato de prata.

4.3.3. Ensaio enzimático

4.3.3.1. Procedimento geral

O ensaio enzimático foi iniciado adicionando-se a um eppendorf 250 μ L de tampão borato 0,1M (pH 8,8), 125 μ L de solução enzimática e deixando esta solução em banho a 40°C por cinco minutos. A reação foi então iniciada com a adição de 150 μ L de fenilalanina (10mM) e incubada a 40°C sob agitação. Após 60 minutos a reação foi finalizada com a adição de 25 μ L de HCl (6M). A solução foi agitada e centrifugada a 14.000 rpm por alguns segundos (esquema 10 p. 45). Este experimento foi realizado em triplicata.



Esquema 10: Ensaio enzimático - procedimento geral.

Condições de análise via CLAE:

volume de amostra injetado: 10 μ L

fluxo = 1,0 mL/min

λ = 275 nm

coluna: supelcosil LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 μ m)

fase móvel: MeOH:H₂O (+0,1% de HAc) – 60:40

Preparou-se também brancos utilizando-se somente o extrato enzimático ou somente os substratos em duplicata para controle da análise. Os brancos foram submetidos aos mesmos tratamentos das reações completas.

4.3.3.2. Variação da concentração de fenilalanina

Para a variação de substrato foi utilizada a fração 25-55% obtida da precipitação fracionada com sulfato de amônio. Foram utilizadas as concentrações de: 0,5, 5, 10 e 20 mM. Esses ensaios foram realizados em triplicata, sendo que para todas as variações foram realizados brancos utilizando-se somente o extrato enzimático e somente os substratos.

4.3.3.3. Variação do tempo de reação

O procedimento descrito no esquema 10 (p. 45) foi repetido em diferentes tempos: 10, 30 minutos, 1, 2, 4 e 24 horas. Esses ensaios também foram realizados em triplicata, e em cada tempo foram realizados os experimentos controles, utilizando-se somente a o extrato enzimático e somente com os substratos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo químico de *Peperomia blanda*

5.1.1. Perfil cromatográfico

Para análise do perfil cromatográfico da espécie foram obtidos extratos das partes aéreas, raízes e frutos de *Peperomia blanda* com AcOEt, já que os compostos de interesse a serem analisados são de média polaridade. As análises via CLAE destes extratos foram obtidas com a finalidade de compará-los quanto suas composições e seguiram a condição cromatográfica descrita no item 4.1.1 (p. 28).

Considerando que as três partes analisadas são dos mesmos indivíduos e que foram submetidas às mesmas condições de secagem, moagem, extração, extração em fase sólida e análise, foi possível identificar apenas algumas diferenças nestes cromatogramas quanto à variação na concentração dos seus metabólitos (figura 14, p. 48). Por apresentarem grande semelhança quanto à composição das amostras, apenas as partes aéreas de *P. blanda* foram coletadas para obtenção dos extratos maiores, conservando assim a espécie no local de coleta, já que a permanência das raízes levam ao novo desenvolvimento dos indivíduos.

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

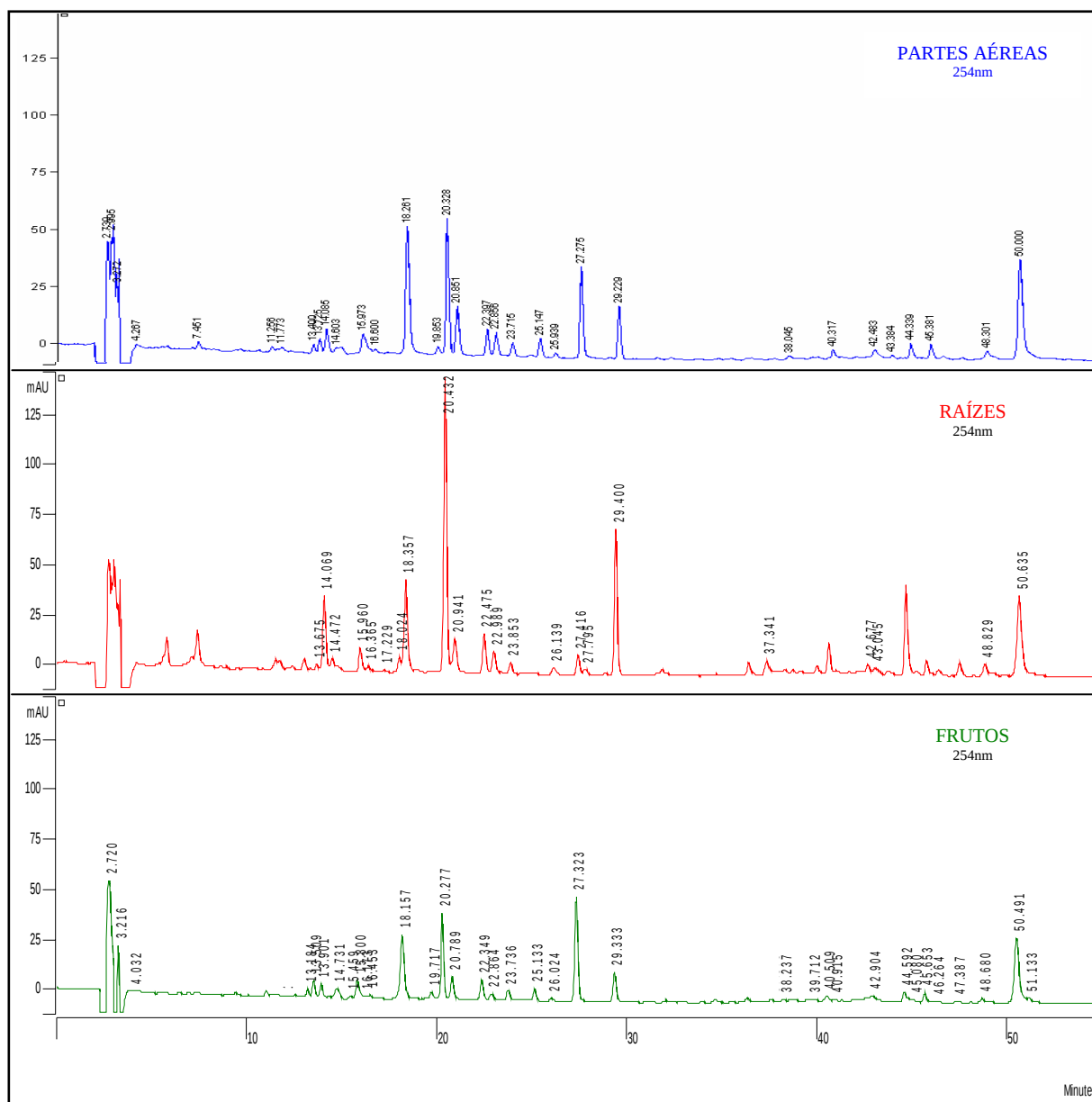


Figura 14: Cromatogramas obtidos via CLAE das partes aéreas, raízes e frutos de *Peperomia blanda*. (Condições de análise: 35% ACN → 100% ACN em 40 minutos e mais 15 minutos em 100% de ACN, fluxo de 1 mL.min⁻¹)

5.1.2. Determinações Estruturais

5.1.2.1. Lignanas tetraidrofurânicas

5.1.2.1.1. Considerações gerais

Cinco lignanas inéditas da classe tetraidrofurânica foram isoladas da fração CH₂Cl₂ do extrato AcOEt das partes aéreas de *Peperomia blanda* (figura 15, p. 49)

Os espectros de RMN de ¹H (espectros 1, 20, 41, 62 e 83, p. 117, 128, 140, 152 e 164; tabela 6, p. 61) das substâncias **1-5** são característicos de lignanas tetraidrofurânicas assimétricas, pois exibem um par de dupletos em δ 0,63 $\pm$ 0,05 (CH₃-9) e 1,04 $\pm$ 0,04 (CH₃-9') que correspondem aos grupos metílicos. Um segundo grupo de dupletos em δ 5,03 $\pm$ 0,02 (H-7) e 4,32 $\pm$ 0,03 (H-7') que foram atribuídos aos grupos metínicos oxibenzílicos, e multipletos em δ 2,18 $\pm$ 0,03 e 1,69 $\pm$ 0,03 associados, respectivamente com os hidrogênios H-8 e H-8'. Os dados de RMN de ¹³C (espectros 5, 23, 44, 65 e 87, p. 119, 130, 142, 154 e 166) (tabela 7, p. 62) confirmaram a presença dos sistemas tetraidrofurânicos de cada substância.

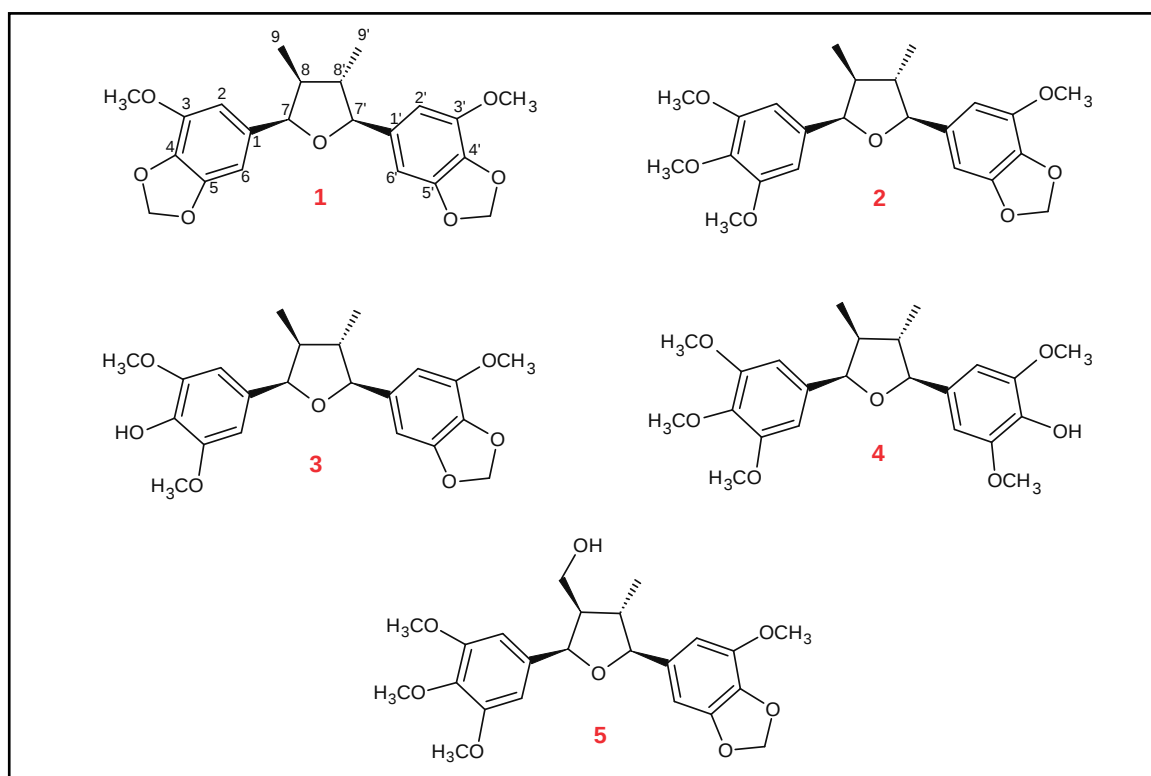


Figura 15: Estruturas químicas das lignanas tetraidrofurânicas de *P. blanda*.

Como previamente reportado por Biftu e Stevenson (1987), a magnitude das constantes de acoplamento dos H-7 e H-7' indica a configuração destes. A constante de acoplamento de 8,5 e 9,0 Hz para dupletos em δ 5,05, e 4,33 Hz para H-7 e H-7', respectivamente, indica que estes hidrogênios estão em configuração *cis* em relação ao H-8 e em *trans* em relação ao adjacente H-8' em um anel tetraidrofurânico (tabela 8, p. 50).

Tabela 8: Deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio oxibenzílico H-7.

Relação entre Ar-7 e Me-8	Configuração de H-7 em relação à H-7'	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>
<i>trans</i>	4,3 – 4,55	4,55 – 4,7
<i>cis</i>	5,0 – 5,15	5,30 – 5,55

As diferenças observadas nos espectros de RMN para as cinco lignanas tetraidrofurânicas são resultantes das diferenças nos padrões de substituição nos anéis aromáticos.

5.1.2.1.2. Lignana tetraidrofurânica **1**

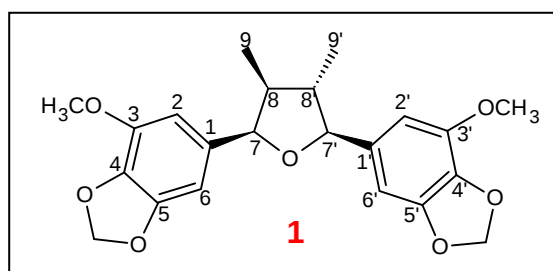


Figura 16: Estrutura química de **1**.

A fórmula molecular da substância **1** (figura 16, p. 50) foi estabelecida como $C_{22}H_{24}O_7$ por espectrometria de massas de alta resolução (espectro 19, p. 127) que apresentou íon *quasi* molecular $[M+H]^+$ em 401.

O espectro de RMN de 1H (espectros 1-4, p. 117-118; tabela 6, p. 61) apresenta quatro sinais entre δ 6,52 e 6,69 (s) que correspondem aos hidrogênios H-2, H-6 e H-2', H-6' de dois

anéis aromáticos 1,3,4,5-tetrassubstituídos. Os sinais referentes aos substituintes dos anéis podem ser observados em δ 5,97 (s, 2H) e δ 5,96 (s, 2H) que correspondem a dois grupos metilenodioxílicos ligados aos carbonos 4/5 e 4'/5', respectivamente. Foram também observados simpletos em δ 3,93 (3H) e δ 3,90 (3H) correspondentes a duas metoxilas, ligadas aos carbonos 3 e 3'. Em δ 5,05 ($J = 8,5$ Hz) e em δ 4,33 ($J = 9,0$ Hz) são observados dois dupletos característicos de hidrogênios oxibenzílicos (H-7 e H-7'). Além disso, são observados dois multipletos em δ 2,20 e 1,72, atribuídos a dois grupos metínicos (H-8 e H-8'), e dois dupletos em δ 0,68 ($J = 7,0$) e 1,06 ($J = 6,5$) correspondentes a dois grupos metílicos (H-9 e H-9').

No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 5, p. 119) observam-se sinais em δ 101,3 e 101,4 atribuídos aos grupos metilenodioxílicos e em δ 56,6 observa-se o sinal das metoxilas. Os sinais correspondentes aos carbonos oxibenzílicos (C-7 e C-7') podem ser observados em δ 83,1 e 87,4, sinais de carbonos metínicos (C-8 e C-8') em δ 48,2 e 46,0 e sinais de carbonos metílicos em δ 15,0 e 14,9 (C-9 e C-9') (tabela 7, p. 62).

As correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC (espectros 6-9, p. 120-121) revelam a posição dos anéis aromáticos. Neste espectro é possível observar a correlação do carbono em δ 83,1 (C-7) com hidrogênios em δ 0,68 (H-9), δ 6,52 e δ 6,54 (H-2 e H-6), e do carbono em δ 87,4 (C-7') com os hidrogênios em δ 1,06 (H-9'), 6,68 (H-2) e 6,69 (H-6), indicando a ligação dos anéis aromáticos aos carbonos C-7 e C-7' (figura 17, p. 52).

Nos espectros de NOESY 1D (espectros 13-18, p. 123-126) observa-se que, ao se irradiar o H-7 (δ 5,05), houve aumento dos sinais correspondentes ao H-8 (δ 2,20), H-6 (δ 6,54) e H-7' (δ 4,33) mostrando que estes hidrogênios estão do mesmo lado da molécula. Quando o H-7' (δ 4,33) é irradiado, observa-se aumento dos sinais correspondentes ao H-7 (δ 5,05), H-8 (δ 2,20), H-2', H-6' e H-9', e ao se irradiar no H-8', aparecem os sinais correspondentes aos H-2, H-2' e H-9 (figura 18, p. 52), sugerindo que a metila C-9' aparece em posição *trans* em relação à metila C-9 e que, juntamente com os dados da literatura (Biftu, 1987), confirmam a configuração relativa desta substância.

Analizando estes dados, a identidade da substância **1** foi então estabelecida como sendo *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana.

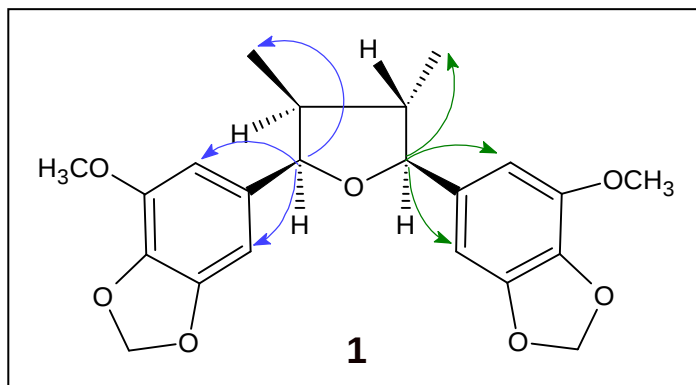


Figura 17: Correlações observadas no mapa de contorno $g\text{HMBC}$ de **1**.

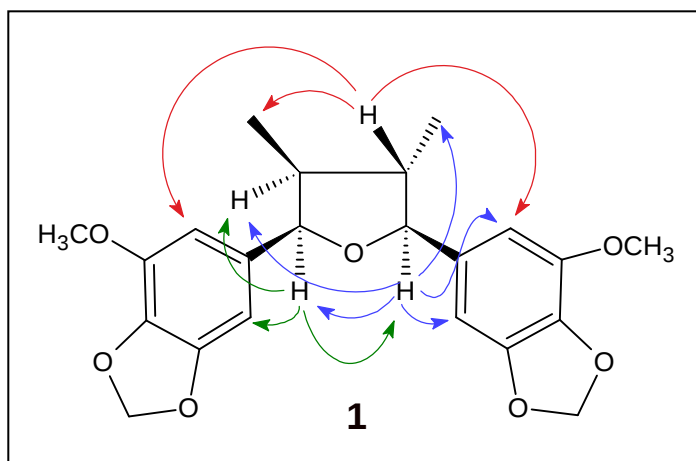


Figura 18: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **1**.

5.1.2.1.3. Lignana tetraidrofurânica 2

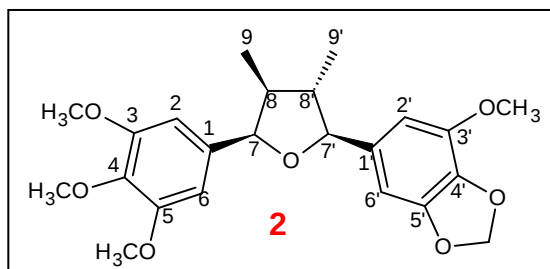


Figura 19: Estrutura química de 2.

A substância **2** (figura 19, p. 53) apresentou sinais de RMN bastante semelhantes ao da substância **1**. Sua fórmula molecular foi estabelecida como sendo $C_{23}H_{28}O_7$ por espectrometria de massas de alta resolução (espectro 40, p. 139) que apresentou íon *quasi* molecular $[M+H]^+$ em 417.

É possível verificar que esta substância difere da substância **1** quanto aos substituintes de um dos anéis aromáticos. No espectro de RMN de 1H (espectros 20-22, p. 128-129; tabela 6, p. 61) observa-se a presença de três simpletos entre δ 3,76 e 3,84 (12 H), que se referem a 4 metoxilas ligadas aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-3' e um sinal em δ 5,89 (s, 2H) correspondente a um grupo metilenodioxílico ligado aos carbonos C-4', C-5'. O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 23, p. 130; tabela 7, p. 62) apresenta sinal em δ 101,3 referente ao grupo metilenodioxílico e em δ 56,0, 60,7 e 56,6 observam-se os sinais das metoxilas ligadas aos carbonos C-3/C-5, C-4 e C-3'. Os sinais correspondentes aos carbonos oxibenzílicos podem ser observados em δ 83,2 e 87,3, sinais de carbonos metínicos (C-8 e C-8') em δ 45,8 e 47,8 e sinais de carbonos metílicos (C-9 e C-9') em δ 15,0 e 14,8.

As correlações observadas no mapa de contorno de *g*HMBC (espectros 24-29, p. 131-133; figura 20, p. 54) são semelhantes às observadas para a substância **1**, bem como as correlações do experimento de NOESY 1D indicando a mesma estereoquímica relativa da primeira lignana (espectros 34-39, p. 136-138; figura 21, p. 54).

Analisando os dados citados, propôs-se a identificação da substância **2** como sendo *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4',5'-metilenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana.

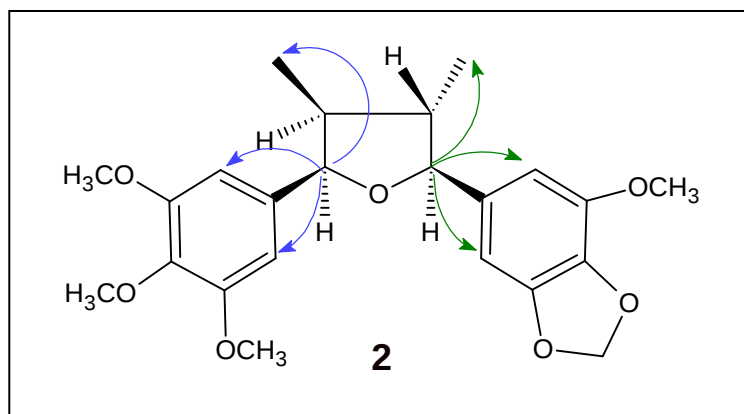


Figura 20: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC de 2.

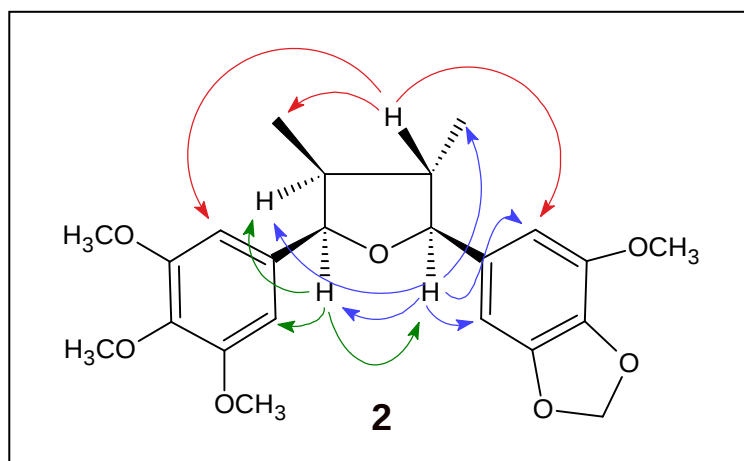


Figura 21: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 2.

5.1.2.1.4. Lignana tetraidrofurânica **3**

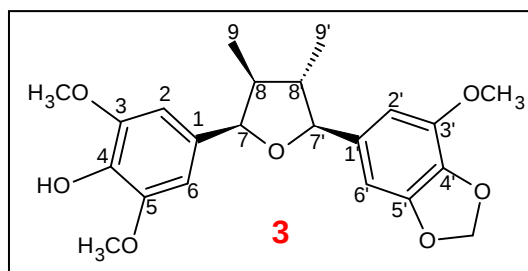


Figura 22: Estrutura química de **3**.

A substância **3** (figura 22, p. 55) também apresentou uma grande semelhança com as lignanas anteriores. Sua fórmula molecular foi estabelecida como sendo $C_{22}H_{26}O_7$ por espectrometria de massas de alta resolução (espectro 61, p. 151) que apresentou íon *quasi* molecular $[M+H]^+$ em 403.

Pelo espectro de RMN de 1H (espectros 41-43, p. 140-141; tabela 6, p. 61) os substituintes puderam ser identificados como sendo três metoxilas com deslocamentos químicos em δ 3,80 e 3,84 (s, 9H) ligados aos carbonos C-3/C-5 e C-3' e um grupo metilenodioxílico em δ 5,89 ligado aos carbonos C-4' e C-5'. O substituinte ligado ao carbono C-4 foi identificado como sendo uma hidroxila. O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 44, p. 142; tabela 7, p. 62) apresenta sinal em δ 101,4 referente ao grupo metilenodioxílico e em δ 56,3 e 56,7 observam-se os sinais das metoxilas ligadas aos carbonos C-3/C-5 e C-3'. Os sinais correspondentes aos carbonos oxibenzílicos podem ser observados em δ 83,3 e 87,4, sinais de carbonos metínicos (C-8' e C-8) em δ 46,0 e 47,9 e sinais de carbonos metílicos (C-9 e C-9') em δ 14,9 e 15,1.

As correlações observadas nos espectros de *g*HMBC (espectros 45-50, p. 143-145; figura 23, p. 56) são semelhantes às observadas para as outras substâncias, bem como as correlações do experimento de NOESY 1D (espectros 55-60, p. 148-150; figura 24, p. 56), indicando a mesma estereoquímica relativa das demais.

Analizando os dados acima citados, propôs-se a identificação da substância **3** como sendo *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4-hidroxi-4',5'-metilenodioxí-3,5,3' -trimetoxi-7,7'-epoxilignana.

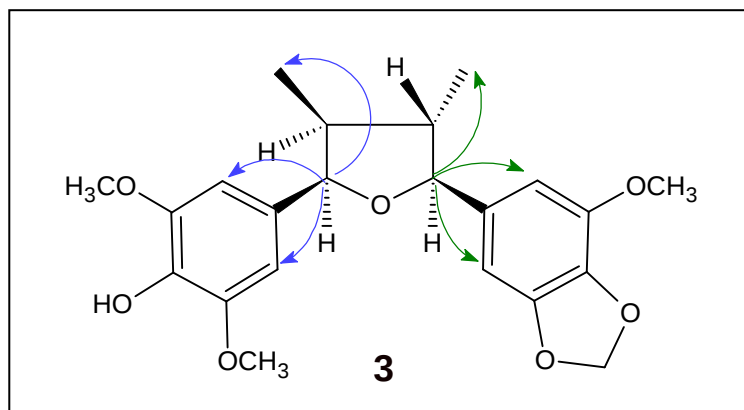


Figura 23: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC de 3.

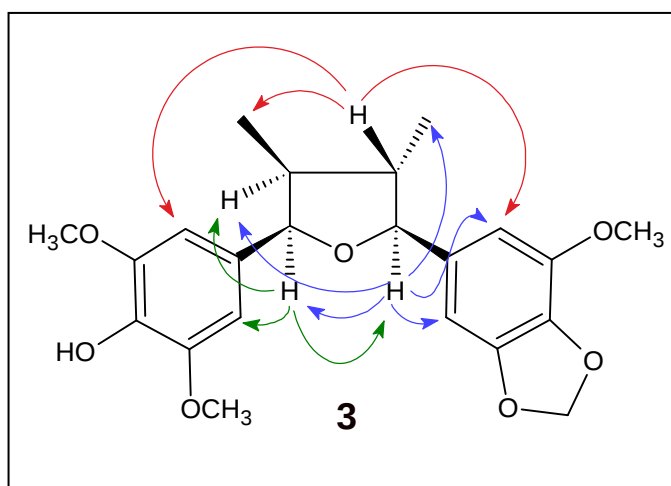


Figura 24: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de 3.

5.1.2.1.5. Lignana tetraidrofurânica **4**

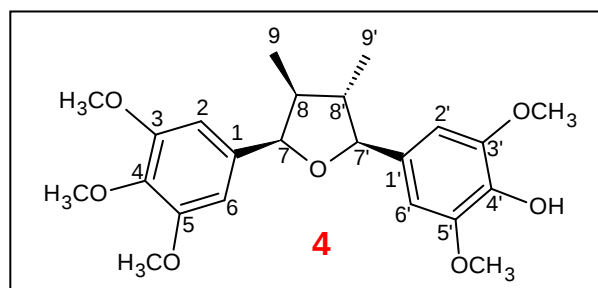


Figura 25: Estrutura química de **4**.

Assim como para as outras lignanas, a substância **4** (figura 25, p. 57) teve sua fórmula molecular estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução (espectro 82, p. 163) e determinada como sendo $C_{23}H_{30}O_7$, apresentando íon *quasi* molecular $[M+H]^+$ em 419.

É possível verificar que esta substância também difere das demais quanto aos substituintes dos anéis aromáticos. No espectro de RMN de 1H (espectros 62-64, p. 152-153; tabela 6, p. 61) observa-se a presença de simpletos entre δ 3,76 e 3,83 correspondentes a cinco metoxilas ligadas aos carbonos C-3, C-4, C-5, C-3' e C5'. No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 65, p. 154; tabela 7, p. 62) observam-se sinais em δ 56,0, 56,6 e 60,8 correspondentes às metoxilas.

As correlações observadas nos espectros de *g*HMBC (espectros 66-71, p. 155-157; figura 26, p. 58) são semelhantes às observadas para as demais lignanas, bem como as correlações do experimento de NOESY 1D indicando a mesma estereoquímica relativa (espectros 76-81, p. 160-162; figura 27, p. 58).

Analisando os dados citados, chegou-se a identificação da substância **4** como sendo *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-4'-hidroxi-3,4,5,3',5'-pentametoxi-7,7'-epoxilignana.

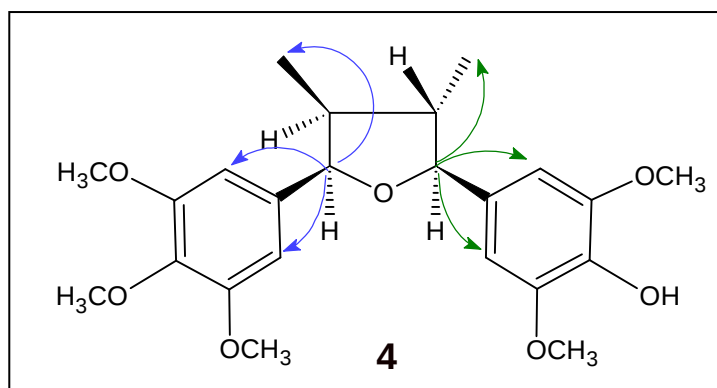


Figura 26: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC da substância 4.

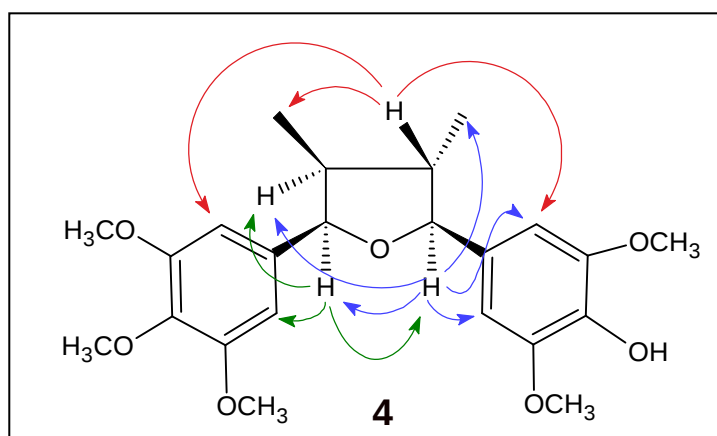


Figura 27: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D para a substância 4.

5.1.2.1.6. Lignana tetraidrofurânica 5

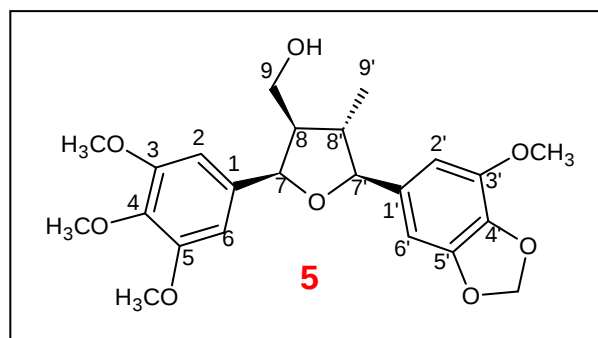


Figura 28: Estrutura química de 5.

A substância **5** difere da lignana **2** pela presença de um grupo hidroxila ligado ao C-9. Este grupo foi identificado no espectro de RMN de ^1H (espectros 83-86, p. 164-165, tabela 6, p. 61) pela presença do sinal em δ 3,40 (2H, d) e do sinal em δ 1,08 (referente a apenas um grupo metila), no espectro de RMN de ^{13}C (espectro 87, p. 166, tabela 7, p. 62) pelo sinal em δ 62,5 e pelo experimento de *g*HMBC (espectros 88-93, p. 167-169; figura 29, p. 60) que mostrou correlação entre o H-9 e C-7. A fórmula molecular da substância **5** (figura 28, p. 59) foi estabelecida como sendo $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_8$ por espectrometria de massas de alta resolução (espectro 104, p. 175).

As correlações observadas no experimento de NOESY 1D (espectros 99-103, p. 172-174; figura 30, p. 60) indicam a mesma estereoquímica relativa das demais lignanas.

Analisando os dados acima, propôs-se a identificação da substância **5** como sendo *rel*-(7*R*,8*S*,7'*S*,8'*S*)-9-hidroxi-4',5'-metilenedioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana.

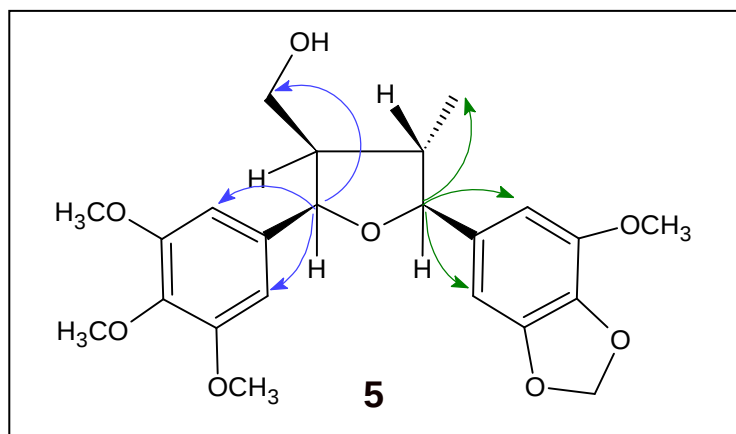


Figura 29: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC da substância 5.

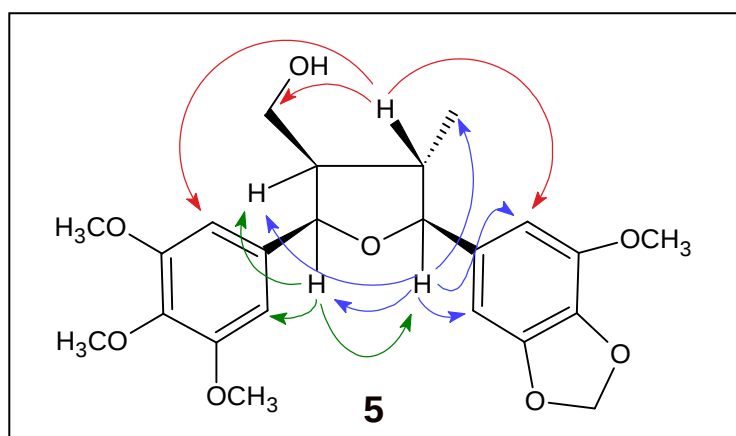


Figura 30: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D para a substância 5.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **1-5**.

Posição	1	2	3	4	5
	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)
2	6,52 (s)	6,48 (s)	6,49 (s)	6,49 (s)	6,61 (s)
6	6,54 (s)	6,48 (s)	6,49 (s)	6,49 (s)	6,61 (s)
7	5,05 (d; 8,5)	5,02 (d; 8,5)	5,00 (d; 8,5)	5,03 (d; 9,0)	5,07 (d; 8,0)
8	2,20 (m)	2,16 (m)	2,15 (m)	2,18 (m)	2,31 (m)
9	0,68 (d; 7,0)	0,61 (d; 7,5)	0,59 (d; 7,0)	0,62 (d; 7,0)	3,40 (d; 6,0)
2'	6,68 (s)	6,61 (s)	6,61 (s)	6,67 (s)	6,59 (d; 1,5)
6'	6,69 (s)	6,65 (s)	6,64 (s)	6,67 (s)	6,63 (d; 1,5)
7'	4,33 (d; 9,0)	4,30 (d; 9,0)	4,29 (d; 9,5)	4,34 (d; 9,5)	4,29 (d; 8,5)
8'	1,72 (m)	1,68 (m)	1,67 (m)	1,71 (m)	1,93 (m)
9'	1,06 (d; 6,5)	1,01 (d; 6,5)	1,00 (d; 6,5)	1,02 (d; 6,5)	1,08 (d; 7,0)
O_2CH_2 (4,5)	5,97 (s)	-	-	-	-
O_2CH_2 (4',5')	5,96 (s)	5,89 (s)	5,89 (s)	-	5,91 (s)
OCH_3 (3)	3,93 (s)	3,77 (s)	3,80 (s)	3,76 (s)	3,80 (s)
OCH_3 (4)	-	3,76 (s)	-	3,77 (s)	3,77 (s)
OCH_3 (5)	-	3,77 (s)	3,80 (s)	3,76 (s)	3,86 (s)
OCH_3 (3')	3,90 (s)	3,85 (s)	3,84 (s)	3,84 (s)	3,86 (s)
OCH_3 (5')	-	-	-	3,84 (s)	-

Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 1-5.

Posição	1 δ_{C}	2 δ_{C}	3 δ_{C}	4 δ_{C}	5 δ_{C}
1	135,4	137,0	132,2	136,7	134,9
2	106,6	104,5	103,8	104,2	103,5
3	143,5	152,8	146,7	152,9	153,4
4	134,2	136,6	133,8	136,7	137,5
5	149,0	152,8	146,7	152,9	153,4
6	101,2	104,5	103,8	104,2	103,5
7	83,1	83,2	83,3	83,2	81,3
8	48,2	45,8	47,9	45,9	53,8
9	15,0	15,0	15,1	15,2	62,5
1'	135,8	135,4	135,6	131,9	135,0
2'	106,5	106,6	106,7	103,4	106,7
3'	143,2	143,4	143,5	147,0	143,5
4'	134,7	134,6	134,7	134,4	135,0
5'	148,6	149,0	149,0	147,0	149,1
6'	100,5	100,3	100,4	103,4	100,4
7'	87,4	87,3	87,4	87,5	87,6
8'	46,0	47,8	46,0	47,7	44,1
9'	14,9	14,8	14,9	14,8	16,2
O_2CH_2 (4,5)	101,3	-	-	-	-
O_2CH_2 (4',5')	101,4	101,3	101,4	-	101,4
OCH_3 (3)	56,6	56,0	56,3	56,0	56,1
OCH_3 (4)	-	60,7	-	60,8	60,9
OCH_3 (5)	-	56,0	56,3	56,0	56,1
OCH_3 (3')	56,6	56,6	56,7	56,3	56,7
OCH_3 (5')	-	-	-	56,3	-

5.1.2.2. Secolignanas

5.1.2.2.1. Considerações gerais

Substâncias pertencentes à classe de secolignanas foram isoladas pela primeira vez de *Peperomia japonica* (Chen *et al.*, 1989). Segundo a IUPAC, o prefixo *seco-* indica a clivagem de uma ligação em um anel com a correção apropriada do número de hidrogênios na estrutura (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan/>) (figura 31, p. 63).

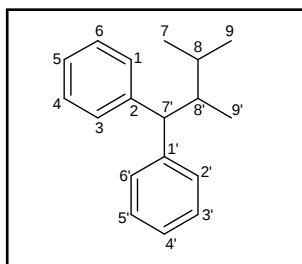


Figura 31: Exemplo da estrutura química de uma 1,7-seco-2,7'-ciclolignana.

Uma série especial de secolignanas encontradas apenas em espécies de *Peperomia*, conhecidas como peperominas, desperta grande interesse por apresentarem significativas atividades antitumorais (Wu *et al.*, 2006). Da fração CH_2Cl_2 do extrato AcOEt das partes aéreas de *Peperomia blanda* foram isoladas cinco secolignanas deste tipo (figura 32, p. 63), e estão descritas a seguir.

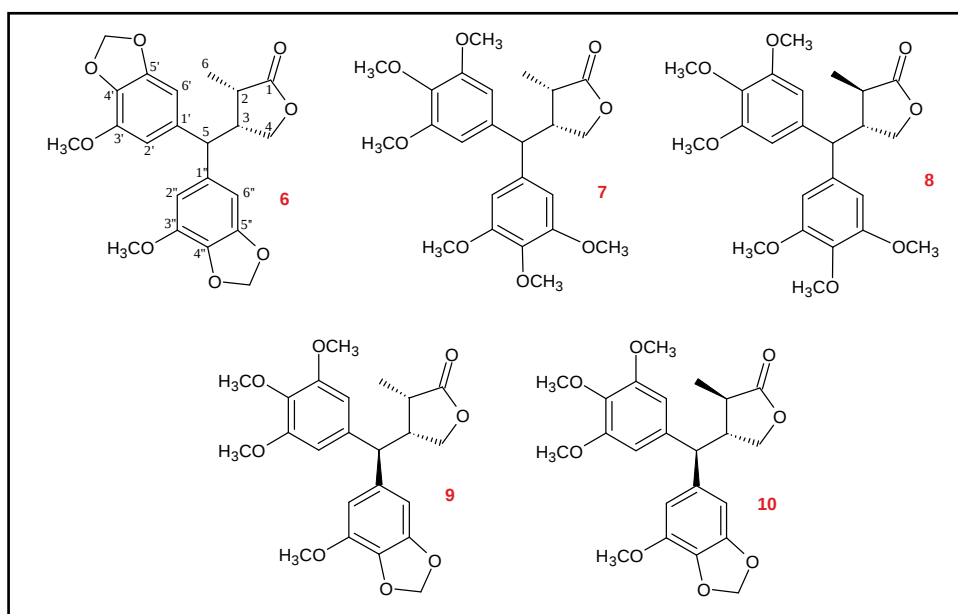


Figura 32: Estruturas químicas das secolignanas isoladas de *Peperomia blanda*.

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **6-10** mostraram a presença de sinais compatíveis com um anel butirolactônico. Os hidrogênios metínicos H-2 e H-3 deste anel estão em configuração *cis* para as substâncias **6**, **7** e **9**, apresentando sinais em $\delta 2,64 \pm 0,01$ e $\delta 3,29 \pm 0,04$, respectivamente. Os hidrogênios do grupo metílico H-6 aparecem em $\delta 1,05 \pm 0,01$ para esta configuração. As substâncias **8** e **10** possuem configuração *trans* para os hidrogênios H-2 e H-3, atribuída em função dos deslocamentos químicos em $\delta 2,29 \pm 0,01$ e $\delta 2,85$, respectivamente. Na configuração *trans* os hidrogênios do grupo metílico H-6 mostram sinal em $\delta 0,88$. as principais diferenças nos espectros de RMN das secolignanas estão centrados nos padrões de substituição dos anéis aromáticos (figura 32, p. 63).

5.1.2.2.2. Secolignana 6

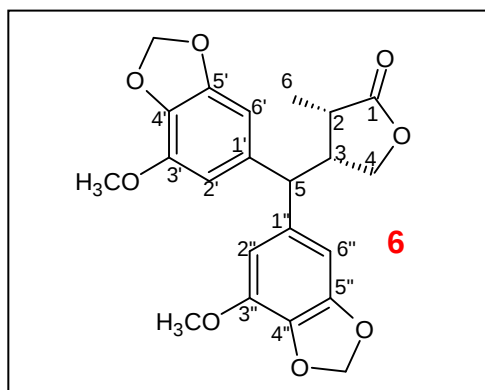


Figura 33: Estrutura química de **6**

O espectro de massas de alta resolução da substância forneceu a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$ (espectro 125, p. 186).

O espectro de RMN de ^1H (espectros 105-108, p. 176-177, tabela 9, p. 75) da substância **6** (figura 33, p. 64) exibe sinais característicos de dois grupos metilenodioxílicos em $\delta 5,86$ (2H, dd, $J = 1,5$ e $2,5$ Hz) e $\delta 5,84$ (2H, dd, $J = 1,5$ e $8,5$ Hz) ligados aos carbonos C-4'/C-5' e C4''/C-5'', respectivamente, além de dois grupos metoxílicos com simpletos em $\delta 3,82$ e $3,83$ (3H cada) ligados aos carbonos C-3' e C-3''. Os sinais dos hidrogênios H-2', H-6', H-2'' e H6'' aromáticos foram observados em $\delta 6,28$, $6,31$, $6,35$ e $6,41$ (todos com $J = 1,5$ Hz, 4H), respectivamente. Os sinais em $\delta 3,96$ (m) e $3,84$ (m) foram atribuídos aos hidrogênios geminais H-4a e H-4b do grupo metilênico do anel butirolactônico e em $\delta 3,59$ (1H, d, $J = 12,0$

Hz) e 1,04 (3H, d, $J = 8,0$ Hz) foram observados os sinais dos H-5 e H-6, respectivamente, um grupo metínico e um metílico. Os deslocamentos em δ 2,63 (1H, dq, $J = 8,0$ e $7,5$ Hz) e δ 3,25 (1H, m) foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-2 e H-3.

As interações espaciais observadas nos experimentos de NOESY 1D (espectros 119-123, p. 183-185; figura 35, p. 66) entre os hidrogênios em δ 2,63 (H-2) e δ 3,25 (H-3), indicam a configuração *cis* entre estes, confirmados pelas interações observadas entre o hidrogênio em δ 3,59 (H-5) e a metila com hidrogênios em δ 1,04, sendo assim determinada sua configuração relativa.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectros 109, p. 178, tabela 10, p. 76), apresenta um sinal de carbonila em δ 179,9 do anel butirolactônico. Os sinais em δ 43,0, 37,2 e 70,3 correspondem aos carbonos C-2, C-3 e C-4 e do mesmo anel, e o sinal em δ 10,4, ao grupo metila C-6 ligado ao carbono C-2. Observa-se também um sinal em δ 50,2 atribuído a um carbono metínico C-5 onde os três anéis da estrutura estão ligados. Os grupos metoxílicos ligados na posição 3' e 3'' dos anéis aromáticos exibem sinais em δ 56,9 e 57,0, respectivamente, enquanto que os dois grupos metilenodioxílicos apresentam sinais em δ 101,4.

O mapa de contorno de *g*HMBC (espectros 110-115, p. 179-181; figura 34, p. 66) confirma a união dos três anéis no C-5. Neste mapa é possível observar a correlação do hidrogênio em δ 3,59 (H-5) com os carbonos em δ 37,2 (C3) e 70,3 (C-4) do anel butirolactônico e com os carbonos em δ 101,0 (C-6'), 101,1 (C-6'') e 107,4 (C-2'/2'') dos anéis aromáticos.

A configuração absoluta da molécula foi determinada através de experimento de dicroísmo circular (DC) (espectro 124, p. 186) onde é possível observar um efeito Cotton positivo em 245-255 nm e um negativo em 275-280 nm. A atividade óptica a 25°C também foi medida, apresentando um valor médio de $[\alpha]_D^{25} = -54,75^\circ$, em CHCl_3 .

A comparação destes dados aos disponíveis na literatura (Chen *et al.*, 1989), nas mesmas condições, possibilitou a identificação da substância **6** como sendo a (2*S*,3*R*)-2-metil-3-[bis(4',5'-metilenodioxi-3'-metoxifenil)metil]butirolactona.

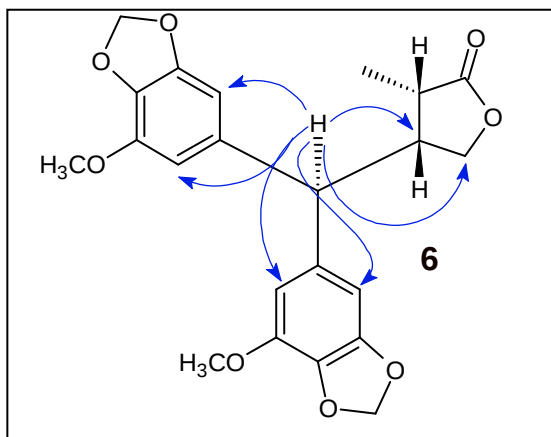


Figura 34: Principais correlações observadas no mapa de contorno de *g*HMBC de **6**.

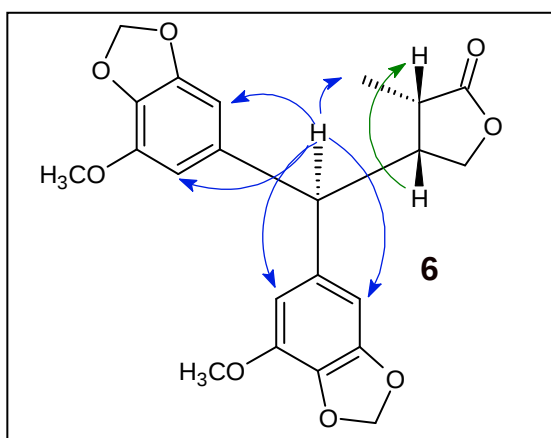


Figura 35: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **6**.

5.1.2.2.3. Seco-lignanas **7** e **8**

As substâncias **7** e **8** foram identificadas em uma mistura de dois diastereoisômeros na proporção aproximada de 2:1. Algumas pequenas variações nos deslocamentos químicos nos espectros de ^1H e ^{13}C foram observadas e puderam ter seus sinais atribuídos a cada substância de acordo com a integração de cada sinal e as correlações nos mapas de contorno de *g*HMQC e *g*HMBC.

Estas substâncias apresentam similaridade à substância **6** quanto aos sinais de RMN de ^1H , sendo que as diferenças observadas estão apenas nas substituições dos anéis aromáticos. Os substituintes foram identificados como sendo seis metoxilas nas posições C-3', C-3'', C-4, C-4'', C-5' e C-5''.

Os experimentos de NOESY 1D (espectros 144-146, p. 196-197) foram realizados para a mistura, sugerindo uma configuração *cis* para a substância **7**, majoritária na mistura, e *trans* para a substância **8**.

As correlações observadas no mapa de contorno de *g*HMBC (espectros 132-137, p. 190-192; figuras 37 e 40, p. 68 e 69) para as duas substâncias são semelhantes às da substância **6**, confirmando também a ligação dos três anéis no C-5, característico das peperominas.

O espectro de massas da mistura foi realizado confirmando a fórmula molecular das duas substâncias como sendo $C_{24}H_{30}O_8$ (espectro 147, p. 197).

A atividade óptica a 25°C da mistura também foi medida, apresentando um valor médio de $[\alpha]_D^{25} = -18,4$, em $CHCl_3$. Não foi possível determinar a configuração absoluta destas substâncias.

- **Secolignana 7**

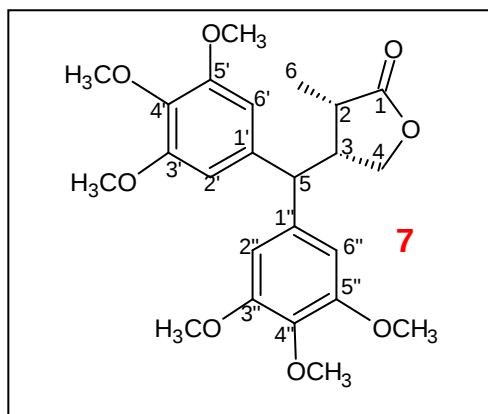


Figura 36: Estrutura química de 7.

Para a substância **7**, os sinais de RMN de 1H (espectros 126-130, p. 187-188; tabela 9, p. 75) em δ 6,36 e 6,45 (4H) foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H2'' e H-6'/H6'' aromáticos. Os sinais em δ 3,96 (dd, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz) e 4,2 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios geminais H-4a e H-4b do grupo metilênico do anel butirolactônico e em δ 2,65 (1H, qui, $J = 7,5$ Hz), δ 3,33 (1H, m) e δ 3,67 (1H, d, $J = 12,0$ Hz) foram observados os sinais atribuídos aos grupos metínicos H-2, H-3 e H-5, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 131, p. 189, tabela 10, p. 76) apresentou um sinal de carbonila em δ 179,9 do anel butirolactônico. Os sinais em δ 43,1, 37,4 e 70,4 correspondem aos grupos C-2, C-3 e C-4, e o sinal em δ 10,4, ao grupo metílico C-6 ligado ao carbono C-2. Observa-se também um sinal em δ 50,7 atribuído ao carbono metínico C-5.

As interações espaciais observadas nos experimentos de NOESY 1D (espectros 144-145, p. 196; figura 38, p. 68) entre os hidrogênios em δ 1,06 (H-6) e δ 3,67 (H-5) e entre os hidrogênios em δ 2,65 (H-2) e δ 3,33 (H-3) sugerem configuração relativa *cis* entre H-2 e H-3.

Com base nos dados apresentados e comparados aos da literatura (Chen *et al.*, 1989) é possível identificar a substância **7** como sendo *rel*-(2*S*,3*R*)-2-metil-3-[bis(3',4',5'-trimetoxifenil)metil]butirolactona.

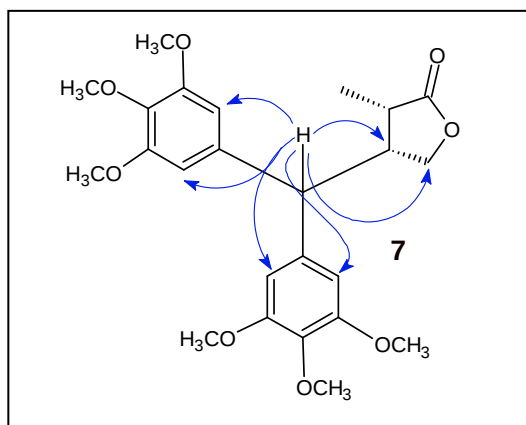


Figura 37: Principais correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC de **7**.

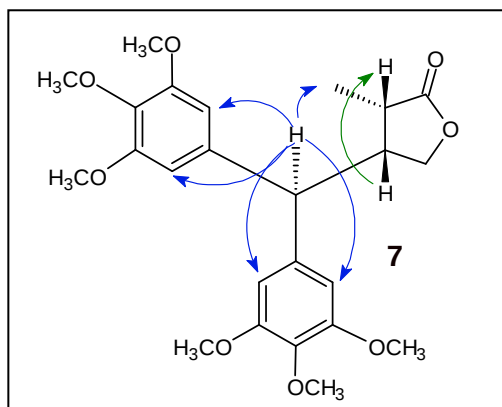


Figura 38: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **7**.

- **Secolignana 8**

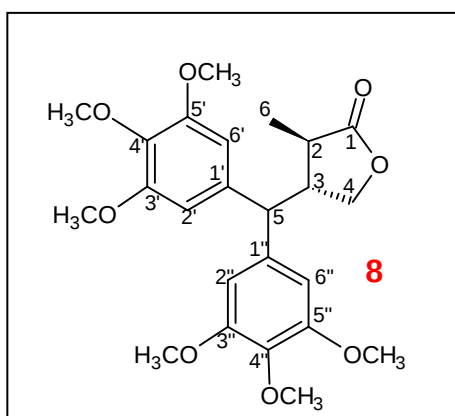


Figura 39: Estrutura química de **8**.

A substância **8** apresenta sinais de RMN de ^1H (espectros 126-130, p. 187-188, tabela 9, p. 75) muito semelhantes aos do seu diastereoisômero, sendo que as maiores diferenças são encontradas nos sinais em δ 0,88 (3H, d, $J = 7,0$ Hz) atribuído aos hidrogênios do grupo metila na posição 6 e nos sinais dos hidrogênios do anel butirolactônico: os hidrogênios metínicos H-2 e H-3 apresentam sinais em δ 2,30 (1H, qui, $J = 7,5$ Hz) e δ 2,85 (1H, m), respectivamente, e os sinais em δ 3,78 (m) e 3,89 (t, $J = 9,0$) foram atribuídos aos hidrogênios geminais H-4b e H-4a do grupo metilênico.

Os dados de RMN de ^{13}C (espectro 131, p. 89, tabela 10, p. 76) possuem maiores diferenças também na mesma região: o sinal em δ 15,7, foi atribuído ao grupo metila C-6 ligado ao carbono C-2, o sinal em δ 56,6 atribuído ao C-5 e os sinais em δ 40,2 e 47,3 atribuídos aos grupos metínicos C-2 e C-3.

As interações espaciais observadas nos experimentos de NOESY 1D (espectro 146, p. 197; figura 41, p. 70) entre os hidrogênios em δ 0,88 (H-6) e δ 2,85 (H-3) sugerem a configuração relativa *trans* H-2 e H-3.

Com base nos dados apresentados e comparados aos da literatura (Chen *et al.*, 1989) é possível identificar a substância **8** como sendo *rel*-(2*R*,3*R*)-2-metil-3-[bis(3',4',5'-trimetóxfenil)metil]butirolactona.

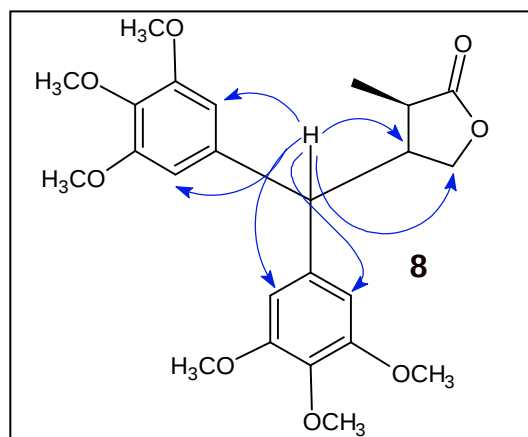


Figura 40: Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC de **8**.

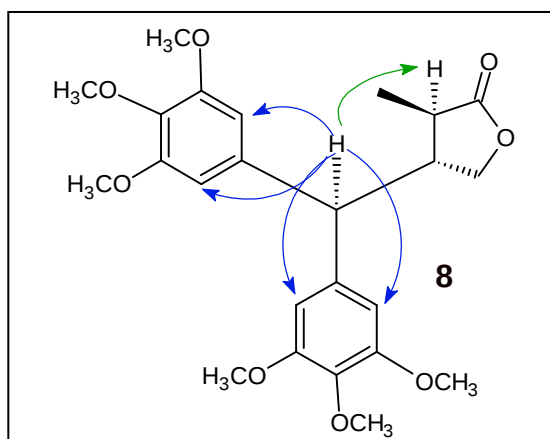


Figura 41: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **8**

5.1.2.2.4. Secolignana **9**

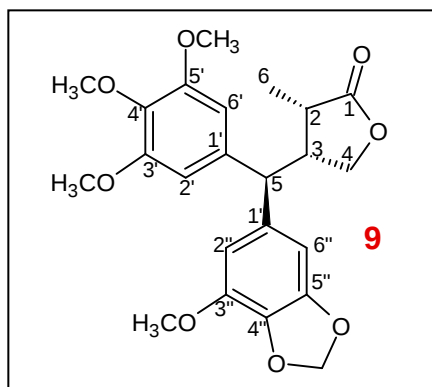


Figura 42: Estrutura química de **9**.

O espectro de massas de alta resolução da substância **9** foi realizado indicando a fórmula molecular C₂₃H₂₆O₈ (espectro 168, p. 208).

A substância **9** também apresenta similaridade às substâncias anteriores. Os sinais de RMN de ¹H (espectros 148-151, p. 198-199, tabela 9, p. 75) mostram que as maiores diferenças estão nas substituições dos anéis aromáticos. Os substituintes da secolignana **9** foram identificados como sendo quatro metoxilas, em δ 3,75 (s, 3H), 3,79 (s, 6H) e 3,83 (s, 3H) ligadas aos carbonos C-4', C-3'/C-5' e C-3'', respectivamente. Apresenta também um grupo metílico em δ 1,04 (3H, d, *J* = 7,5 Hz), sinais em δ 3,87 (t, *J* = 9,5 Hz) e δ 3,97 (dd, *J* = 1,5 e 9,0 Hz) atribuídos aos hidrogênios geminais H-4a e H-4b do grupo metilênico do anel butirolactônico e em δ 2,65 (1H, qui, *J* = 7,5 Hz), δ 3,30 (1H, m) e δ 3,65 (1H, d, *J* = 12,0 Hz) foram observados os sinais de H-2, H-3 e H-5, respectivamente.

Os dados de RMN de ^{13}C (espectro 152, p. 200, tabela 10, p. 76) apresentam um sinal de carbonila em δ 179,9 do anel butirolactônico. Os sinais em δ 43,0 e 37,4 foram atribuídos aos grupos metínicos C-2 e C-3 deste mesmo anel, e o sinal em δ 10,4, ao grupo metila C-6 ligado ao carbono C-2. Observa-se também um sinal em δ 50,4 atribuído ao carbono metínico C-5 onde o anel butirolactônico se une aos dois anéis aromáticos da molécula.

As correlações observadas nos mapa de contorno gHMBC (espectros 153-159, p. 201-204; figura 43, p. 71) mostram correlações semelhantes às encontradas para as demais substâncias, confirmando a ligação dos três anéis no C-5.

As interações espaciais observadas nos experimentos de NOESY 1D (espectros 163-166, p. 206-207; figura 44, p. 72) para esta substância, sugere configuração *cis* entre os hidrogênios em δ 2,65 (H-2) e δ 3,30 (H-3), configuração relativa também confirmada pelas interações espaciais observadas entre o hidrogênio em δ 3,65 (H-5) e a metila com hidrogênios em δ 1,04.

A configuração absoluta da molécula foi estabelecida através de experimento de dicroísmo circular (DC) (espectro 167, p. 208) onde é possível observar o efeito Cotton positivo em 245-255 nm e negativo em 275-280 nm. A atividade óptica a 25°C apresentou um valor médio de $[\alpha]_D^{25} = -55,32^\circ$, em CHCl_3 .

Comparando estes dados aos disponíveis na literatura (Chen *et al.*, 1989; Sibi, *et al.*, 2001), nas mesmas condições, foi possível identificar a substância **9** como sendo a (2*S*,3*R*,5*R*)-2-metil-3-[5-(3',4',5'-trimetoxifenil)-5-(4'',5''-metilenodioxil-3''-metoxifenil)metil]butirolactona.

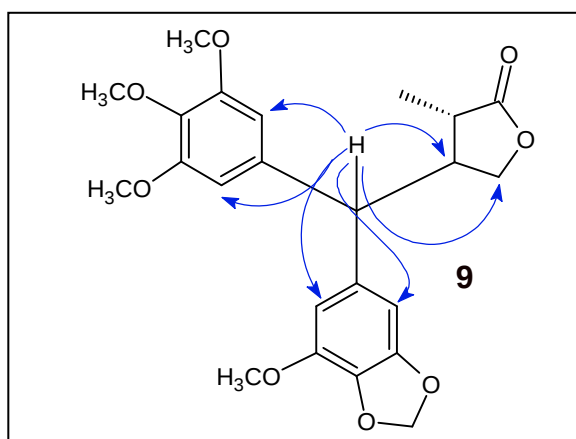


Figura 43: Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC de **9**.

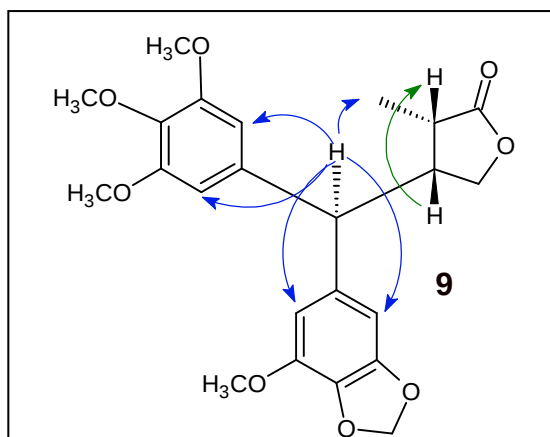


Figura 44: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **9**.

5.1.2.2.5. Secolignana **10**

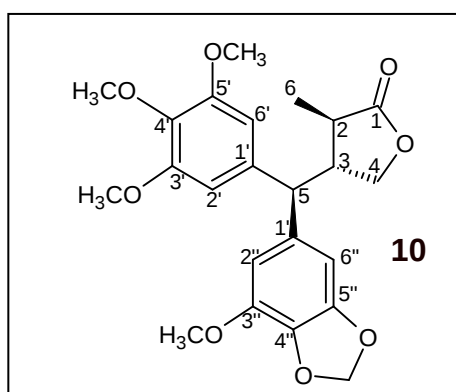


Figura 45: Estrutura química de **10**.

O espectro de massas de alta resolução da substância **10** foi realizado mostrando se tratar de um diastereoisômero da substância **9**, indicando a mesma fórmula molecular de $C_{23}H_{26}O_8$ (espectro 192, p. 221).

A substância **10** apresenta sinais de RMN de 1H (espectro 169-172, p. 209-210; tabela 9, p. 75) muito semelhantes ao do seu diastereoisômero, sendo que as maiores diferenças são encontradas nos sinais em δ 0,88 (3H, d, $J = 7,5$ Hz) atribuído aos hidrogênios do grupo metila da posição 6 e nos sinais dos hidrogênios do anel butirolactônico: os hidrogênios metínicos H-2 e H-3 apresentam sinais em δ 2,28 (1H, qui, $J = 7,5$ Hz) e δ 2,85 (1H, m), respectivamente, e os sinais em δ 3,77 e 4,25 (dd, $J = 2,0$ e 8,0 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios geminais H-4a e H-4b do grupo metilênico.

Os dados de RMN de ^{13}C (espectro 173, p. 211, tabela 10, p. 76) apresentam maiores diferenças também no grupo metínico C-5 em δ 56,3, no grupo metila C-6 com sinal em δ 15,8 e na região do anel butirolactônico: sinais em δ 40,2 e 47,2 correspondentes aos grupos metínicos C-2 e C-3 e o sinal em δ 70,2 do grupo metilênico C-4.

As interações espaciais observadas nos experimentos de NOESY 1D (espectros 186-190, p. 218-220; figura 47, p. 74) para esta substância sugere configuração *trans* entre os hidrogênios em δ 2,28 (H-2) e δ 2,85 (H-3), configuração relativa também confirmada pelas interações espaciais observadas entre o hidrogênio em δ 3,55 (H-5) e a metila com hidrogênios em δ 0,88.

O experimento de dicroísmo circular (DC) (espectro 191, p. 220) também foi realizado para a determinação da configuração absoluta da molécula, onde foi possível observar o efeito Cotton positivo em 245-255 nm e também positivo em 275-280nm. A atividade óptica a 25°C apresentou um valor médio de $[\alpha]_D^{25} = + 21,88^\circ$, para concentração da amostra de 4,9 mg/ml em CHCl_3 .

Comparando estes dados aos disponíveis na literatura (Chen *et al.*, 1989; Sibi, *et al.*, 2001), nas mesmas condições, é possível identificar a substância **10** como (2*R*,3*R*,5*R*)-2-metil-3-[5-(3',4',5'-trimetoxifenil)-5-(4'',5''-metilenodioxi-3''-metoxifenil)metil]butirolactona.

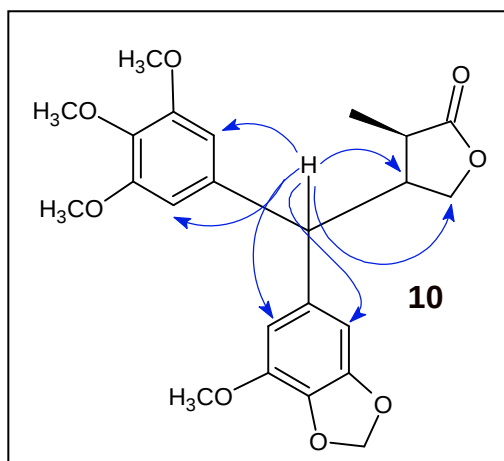


Figura 46: Principais correlações observadas no mapa de contorno g HMBC de **10**.

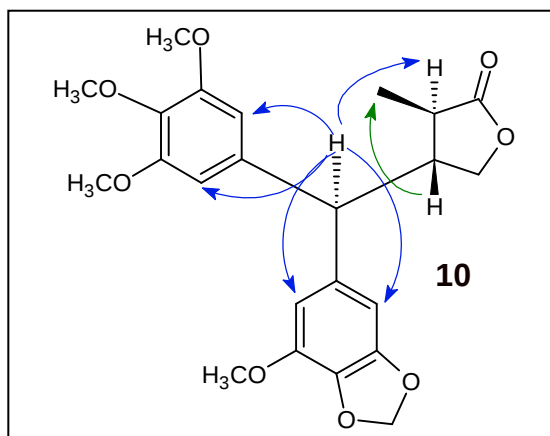


Figura 47: Correlações observadas no experimento de NOESY 1D de **10**.

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **6 – 10**.

POSIÇÃO	6	7	8	9	10
	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)
2	2,63(dq; 8,0, 7,5)	2,65 (qui; 7,5)	2,30 (qui; 7,5)	2,65(qui; 7,5)	2,28 (qui; 7,5)
3	3,25 (m)	3,33 (m)	2,85 (m)	3,30(m)	2,85 (m)
4 – Ha	3,96 (m)	3,96 (dd; 8,0, 1,5)	3,89 (t; 9,0)	3,97 (dd; 1,5, 9,0)	4,25 (dd; 2,0,8,0)
4 – Hb	3,84 (m)	4,2(dd; 8,0, 2,0)	3,78 (sobreposto)	3,87 (t, 9,0)	3,77 (sobreposto)
5	3,59 (d, 12,0)	3,67 (d, 12,0)	3,57 (d, 11,0)	3,65(d, 12,0)	3,55 (d, 11,5)
6	1,04 (d, 8,0)	1,06 (d, 7,5)	0,88 (d, 7,0)	1,04 (d, 7,5)	0,88 (d, 7,5)
2'	6,28 (d, 1,5)	6,36 (s)	6,41 (s)	6,42 (s)	6,39 (s)
6'	6,31 (d, 1,5)	6,45 (s)	6,42 (s)	6,42 (s)	6,39 (s)
2''	6,35 (d, 1,5)	6,36 (s)	6,41 (s)	6,31 (d, 1,5)	6,36 (d, 1,5)
6''	6,41 (d, 1,5)	6,45 (s)	6,42 (s)	6,34 (d, 1,5)	6,42 (d, 1,5)
OCH_2O (4'/5')	5,86 (dd, 1,5, 2,5)	---	---	---	---
OCH_2O (4''/5'')	5,84 (dd, 1,5, 8,5)	---	---	5,85 (dd, 1,5, 7,0)	5,87 (dd, 0,5, 1,5)
OCH_3 (3')	3,82 (s)	3,79 (s)	3,79 (s)	3,79 (s)	3,78 (s)
OCH_3 (3'')	3,83 (s)	3,79(s)	3,79 (s)	3,83 (s)	3,85 (s)
OCH_3 (4')	---	3,73 (s)	3,74 (s)	3,75 (s)	3,74 (s)
OCH_3 (4'')	---	3,76 (s)	3,74 (s)	---	---
OCH_3 (5')	---	3,76 (s)	3,77 (s)	3,79 (s)	3,78 (s)
OCH_3 (5'')	---	3,76 (s)	3,77 (s)	---	---

Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias **6-10**.

Posição	6	7	8	9	10
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	179,9	179,9	179,7	179,9	179,5
2	43,0	43,1	40,2	43,0	40,2
3	37,2	37,4	47,3	37,4	47,2
4	70,3	70,4	70,3	70,4	70,2
5	50,2	50,7	56,6	50,4	56,3
6	10,4	10,4	15,7	10,4	15,8
1'	136,3	137,1	137,1	137,3	136,1
2'	107,4	104,4	104,9	104,4	104,9
3'	143,6	153,5	153,5	153,6	153,5
4'	134,3	137,4	137,4	136,5	137,5
5'	149,5	153,6	153,6	153,6	153,5
6'	101,0	104,6	105,0	104,4	104,9
1''	136,5	137,1	137,1	137,2	136,1
2''	107,4	104,4	104,9	107,5	108,1
3''	143,7	153,5	153,5	143,5	143,6
4''	134,3	137,4	137,4	134,3	134,2
5''	149,5	153,6	153,6	149,4	149,5
6''	101,1	104,6	105,0	101,0	101,2
$\text{OCH}_2\text{O}'$	101,4	---	---	---	---
$\text{OCH}_2\text{O}''$	101,4	---	---	101,4	101,4
$\text{OCH}_3(3')$	56,9	56,3	56,3	56,3	56,3
$\text{OCH}_3(3'')$	57,0	56,3	56,3	57,0	57,0
$\text{OCH}_3(4')$	---	60,7	60,8	60,8	60,8
$\text{OCH}_3(4'')$	---	60,8	60,8	---	---
$\text{OCH}_3(5')$	---	56,2	56,3	56,3	56,3
$\text{OCH}_3(5'')$	---	56,2	56,3	---	---

5.1.2.3. Flavonóides

5.1.2.3.1. Considerações gerais

Os flavonóides compõem uma grande classe de metabólitos secundários derivados da via do chiquimato e policetídica. São encontrados na natureza quatro diferentes tipos de esqueletos carbônicos, os quais são ilustrados na figura 48 (p. 77).

Por conveniência os anéis foram denominados de A, B e C. O anel A é caracterizado pelo padrão de hidroxilação do fluoroglucinol ou resorcinol, e deriva da via do acetato, e o anel B geralmente é hidroxilado nas posições 4' ou 3' e 4' ou 3', 4' e 5' e deriva da via do chiquimato (Dewick, 1998).

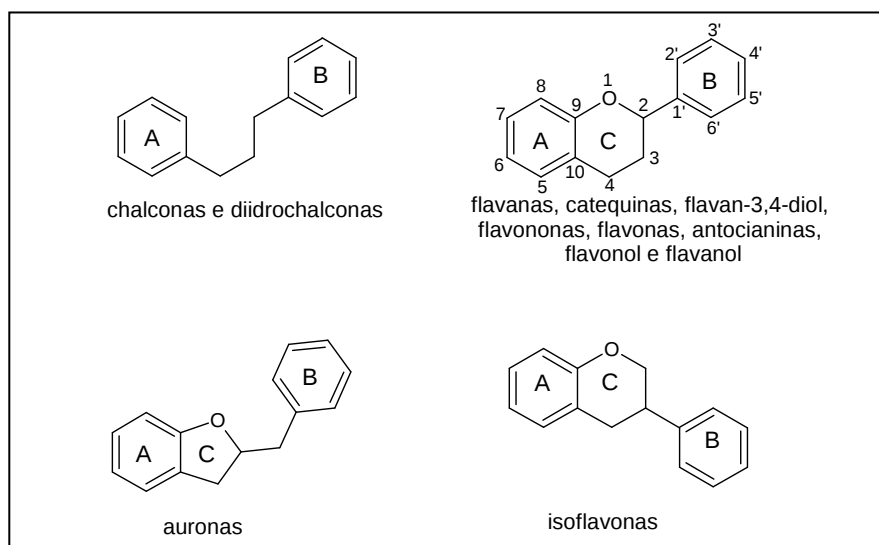


Figura 48: Tipos de esqueletos carbônicos de flavonóides

Dois flavonóides da classe das flavonas foram isolados do extrato AcOEt das partes aéreas de *Peperomia blanda*. Os espectros de RMN de ^1H de flavonas apresentam um simpleto entre δ 6,0 e 8,0 característico do hidrogênio ligado ao C-3, sendo que no espectro de RMN de ^{13}C o sinal correspondente está entre δ 90,0 e 135,0 (Agrawal e Bansal, 1989). As flavonas, assim como os outros flavonóides podem ser encontrados na forma de agliconas, O-glicosídeos e de C-glicosídeos. As flavonas encontradas em partes aéreas de *Peperomia blanda* são agliconas e já foram previamente isolados de *Peperomia sui*. (Cheng *et al.*, 2003).

5.1.2.3.2. Flavona 11

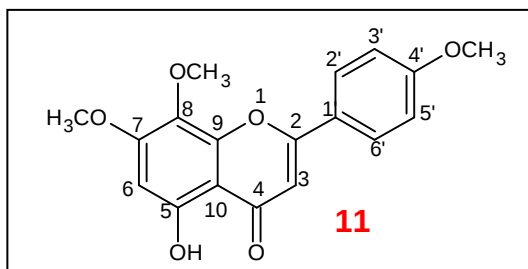


Figura 49: Estrutura química de **11**.

O espectro de RMN de ^1H (espectro 193, p. 222; tabela 11, p. 80) da substância **11** apresentou um sinal em δ 6,58 (1H, s) atribuído ao hidrogênio ligado ao C-3, o qual caracteriza essa substância como sendo uma flavona. O sinal em δ 6,42 (1H, s), foi atribuído ao hidrogênio do um anel aromático penta substituído (anel A) e os dois dupletos em δ 7,04 e 7,90 ($J = 9,0$ Hz, 2H cada), foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3', H-5' do anel B. Os singletos em δ 3,90, 3,94 e 3,95 (3H, s) indicaram a presença de três metoxilas ligadas aos carbonos C-4', C-8 e C-7.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 194, p. 223; tabela 12, p. 81) apresentou um sinal em δ 182,6 que corresponde ao carbono carbonílico C-4. Os sinais dos três grupos metoxílicos foram observados em δ 61,6, 56,3 e 55,5, ligados aos carbonos C-7, C-8 e C-4', respectivamente. Associados aos dados da literatura (Cheng *et al*, 2003), os espectros apresentados confirmaram a estrutura da substância **11** como sendo a 5-hidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona (figura 49, p. 78).

5.1.2.3.3. Flavona 12

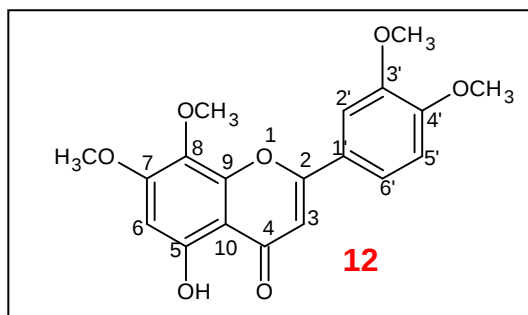


Figura 50: Estrutura química de **12**.

A substância **12** apresenta espectro de RMN de ^1H (espectro 195, p. 224; tabela 11, p. 80) muito semelhante ao da substância **11**. O sinal em δ 6,51 (1H, s) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C-3, o qual caracteriza esta substância como sendo uma flavona. O sinal em δ 6,35 (1H, s), foi atribuído ao hidrogênio H-6 ligado ao anel aromático pentassubstituído (anel A). O anel B foi identificado como sendo trissubstituído devido a presença de um sinal em δ 7,36 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-2', o qual está acoplado com o hidrogênio H-6' em δ 7,52 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz, 1H). O hidrogênio H-5' apresentou sinal em δ 6,93 (d, $J = 8,0$ Hz) mostrando acoplamento *orto* com o H-6'. Os simpletos em δ 3,87, 3,88, 3,89 e 3,91 (12H) indicaram a presença de quatro metoxilas ligadas aos carbonos C-7, C-8, C-3' e C-4'.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 196, p. 225; tabela 12, p. 81) apresenta sinal em δ 182,6 referente ao carbono carbonílico C-4. A presença dos quatro grupos metoxílicos foi observada em δ 61,5, 56,3, 56,0 e 56,1 que estão ligados aos carbonos C-7, C-8, C-3' e C-4', respectivamente. Assim como para a substância **11**, a estrutura da substância **12** foi confirmada com auxílio dos dados da literatura (Cheng, 2003), e determinada como sendo 5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona (figura 50, p. 78).

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **11** e **12**.

H	11	12
	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)
3	6,58 (s, 1H)	6,51 (s, 1H)
6	6,42 (s, 1H)	6,35 (s, 1H)
2'	7,90 (d, 9,0)	7,36 (d, 2,0)
3'	7,04 (d, 9,0)	---
5'	7,04 (d, 9,0)	6,93 (d, 8,0)
6'	7,90 (d, 9,0)	7,52 (dd, 2,0 e 8,0)
OCH_3 (7)	3,95 (s)	3,87 (s)
OCH_3 (8)	3,94 (s)	3,88 (s)
OCH_3 (3')	---	3,89 (s)
OCH_3 (4')	3,90 (s)	3,91 (s)

Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias **11** e **12**.

Posição	11	12
	δ_{C}	δ_{C}
2	163,9	163,8
3	103,8	104,0
4	182,6	182,6
5	149,4	149,4
6	95,7	95,7
7	158,5	158,6
8	129,0	129,0
9	157,5	157,5
10	104,8	104,8
1'	123,6	123,8
2'	114,5	108,9
3'	128,0	149,4
4'	162,7	152,4
5'	128,1	111,3
6'	114,6	120,1
OCH_3 (7)	61,6	61,5
OCH_3 (8)	56,3	56,3
OCH_3 (3')	---	56,0
OCH_3 (4')	55,5	56,1

5.1.2.4. Policetídeos

5.1.2.4.1. Considerações gerais

Policetídeos se configuram em uma classe de produtos naturais com atividades biológicas diversas e atuam como antibiótico, antifúngico, imunossupressor, antiparasitário, antitumoral e também estão disponíveis comercialmente como promotores de crescimento animal e como inseticida natural (Hranueli *et al.*, 2001).

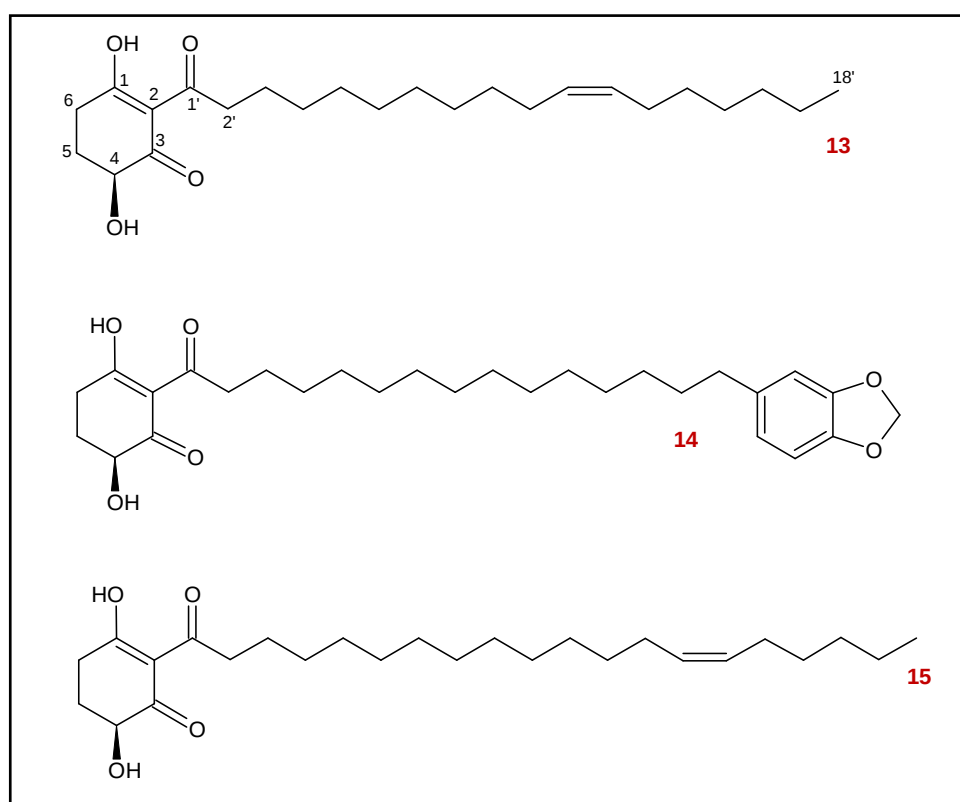


Figura 51: Estruturas químicas dos policetídeos de *P. blanda*

Três policetídeos foram isolados das partes aéreas de *Peperomia blanda* (figura 51, p. 82). As substâncias **13**, **14** e **15** apresentaram no espectro de RMN ^1H (espectros 197, 211 e 228, p. 226, 234 e 243) um sinal de hidrogênio excepcionalmente desprotegido em $\delta 18,15 \pm 0,01$, característico de hidrogênio de um enol quelado com uma β -dicetona (Silverstein *et al.*, 1981). A maioria dos sinais em RMN ^1H destas substâncias aparecem em uma região mais protegida do espectro, indicando a presença de uma cadeia alifática saturada, o que foi corroborado pelos espectros de RMN de ^{13}C (espectros 201, 215 e 232, p. 228, 236 e 245) e

DEPT (espectros 202, 216 e 233, p. 229, 237 e 246) que mostram a presença de pelo menos 15 grupo metilênicos. Outros sinais no espectro de RMN ^1H (espectros 197, 211 e 228, p. 226, 234 e 243; tabela 14, p. 89) são comuns entre as substâncias **13-15**, como os sinais em $\delta 2,90 \pm 0,01$ e $\delta 3,01 \pm 0,02$ que foram atribuídos aos hidrogênios Ha-2' e Hb-2', respectivamente. Os multipletos em $\delta 1,55 \pm 0,01$ foram atribuídos aos hidrogênios da posição 3'. Os sinais observados em $\delta 4,01 \pm 0,01$ foram atribuídos aos H-4, os sinais em $\delta 1,73 \pm 0,01$ e $\delta 2,30 \pm 0,01$ foram atribuídos aos hidrogênios H-5ax e H-5eq, respectivamente, e os sinais em $\delta 2,71$ foram atribuídos aos H-6.

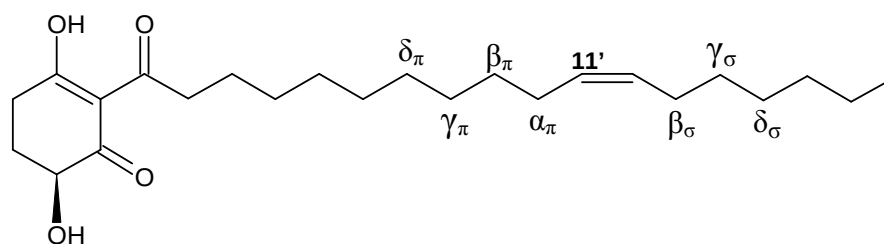
Os espectros de RMN de ^{13}C (espectros 201, 215 e 232, p. 228, 236 e 245; tabela 15, p. 90) das substâncias **13-15** também apresentaram grandes semelhanças na região do anel. Os sinais em $\delta 195,5 \pm 0,1$ e $\delta 206,0 \pm 0,1$ foram atribuídos as carbonilas das posições C-3 e C-1', respectivamente e os sinais em $\delta 197,7 \pm 0,1$ aos C-1. Os carbonos C-4, ligados a hidroxilas, exibem sinais em $71,5 \pm 0,1$. Os sinais em $\delta 110,2 \pm 0,1$ foram atribuídos aos carbonos C-2, os sinais em $\delta 26,9 \pm 0,2$ e $\delta 31,3 \pm 0,5$ foram atribuídos aos carbonos metilênicos C-5, C-6, e os sinais observados em $\delta 40,2 \pm 0,1$ e $\delta 24,4 \pm 0,1$, foram atribuídos aos carbonos, também metilênicos, C-2', C-3', respectivamente.

As cadeias laterais das substâncias **13** e **15** apresentaram uma insaturação, cujo carbonos olefínicos exibiram sinais no espectro de RMN de ^{13}C em $\delta 129,8$ e $\delta 129,7$, que são compatíveis aos valores teóricos dos deslocamentos encontrados na literatura para duplas ligações com configuração *cis*. De acordo com Breitmaier e Voelter (1990), os carbonos olefínicos de isômeros *cis* apresentam deslocamentos químicos ligeiramente menores dos que os em configuração *trans*, sendo estes valores calculados a partir da equação: $\delta_{\text{C}} = 122,1 + \sum A_{\text{L}} + S$, onde A_{L} é o incremento adicionado de acordo com a posição da dupla ligação e S é a correção para isômeros em *cis* (tabela 13, p. 84).

Tabela 13: Incrementos dos deslocamentos químicos dos carbonos oleofínicos observados em policetídeos.

Posição (L)	Incremento A_L
α_π	11,0
β_π	-7,1
β_σ	6,0
γ_π	-1,9
γ_σ	-1,0
δ_π	1,1
δ_σ	0,7
S	-1,2

Sendo assim, o valor calculado para o C-11' da substância **13** é:



$$\delta_{C-11'} = 122,1 + (11,0 - 7,1 - 1,9 + 1,1 + 6,0 - 1,0 + 0,7) - 1,2 = \mathbf{129,7}$$

Este valor é o mesmo para o C-12' da substância **13**, bem como para os carbonos olefínicos da substância **15**, indicando a configuração *cis* para as mesmas.

Os carbonos alílicos da dupla ligação também confirmam a configuração *cis*. Estes carbonos apresentam deslocamentos em δ 27,1, que são iguais aos carbonos alílicos de dupla encontrados na literatura (Breitmaier e Voelter, 1990) e significativamente diferentes de dupla *trans* que tem seu deslocamento em aproximadamente δ 32,6.

Os mapas de contorno *g*HMBC (espectros 203, 217, 234, p. 229, 237, 246) obtidos para os policetídeos **13-15** apresentam semelhantes correlações. É possível observar nestes mapas as correlações dos hidrogênios das hidroxilas da posição 1 em δ 18,15 $\pm$ 0,01 com os carbonos em δ 31,3 $\pm$ 0,5 (C-6), δ 110,3 $\pm$ 0,1 (C-2), δ 206,0 $\pm$ 0,1 (C-1') e δ 40,2 $\pm$ 0,1 (C-2'), indicando a ligação das cadeias alifáticas na posição 2 dos anéis. Observa-se também correlações entre os hidrogênios em δ 2,90 $\pm$ 0,01 e δ 3,01 $\pm$ 0,01, atribuídos aos hidrogênios H-2'a e H-2'b, e os hidrogênios H-3' em δ 1,55 $\pm$ 0,01, com os carbonos C-1' em δ 206,0 $\pm$ 0,1.

5.1.2.4.2. Policetídeo 13

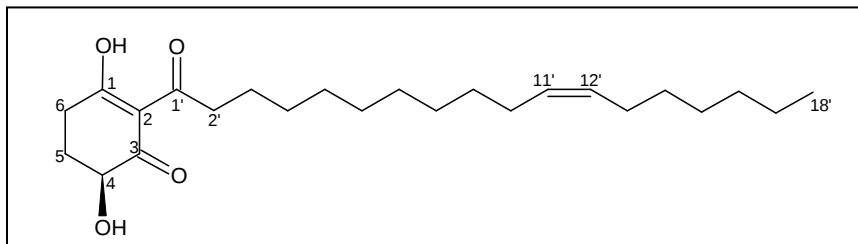


Figura 52: Estrutura química de **13**

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C realizada no item anterior mostrou grande semelhanças estruturais entre os policetídeos **13-15**. A substância **13** difere, nos espectros de RMN de ^1H (espectros 197-200, p. 226-228; tabela 14, p. 89), quanto aos sinais de hidrogênios metilênicos nas posições H-4'-H-9' e H-14'-H-17', que exibem sinais em δ 1,18-1,28 (20H, m) e o sinal em δ 5,27 (m) atribuído aos hidrogênios da dupla ligação da cadeia alifática, H-11' e H-12'. A metila na posição H-18' exibe sinal em δ 0,82 (t, $J = 7,0$ Hz).

As diferenças observadas para a substância **13** no espectro de ^{13}C (espectro 201, p. 228; tabela 15, p. 90) estão nos sinais dos carbonos metilênicos da cadeia alifática nas posições C-4'-C-9' e C-14'-C-15' observados em δ 29,2-29,7. Os carbonos olefínicos C-11' e C-12' exibem sinais em δ 129,8.

Foi realizada a espectrometria de massas de baixa resolução para a substância **13**, na qual foi possível observar o pico do íon *quasi* molecular $[\text{M}-\text{H}]^- = 391$ (100%) sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$ (espectro 210, p. 233).

A estereoquímica na posição 4 pôde ser determinada após medida a atividade ótica da substância que apresentou um valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20,9^\circ$ com concentração de 0,1 mg/ml, em EtOH que foi comparada a da literatura (Cheng, *et al*, 2003), e também pela constante de acoplamento alta ($J = 13,0$ Hz) entre H-5 (ψ -axial) e H-4, sugerindo que a hidroxila OH-4 está na posição ψ -equatorial.

Estes dados comparados aos dados disponíveis na literatura (Cheng, *et al*, 2003; Seeram *et al.*, 2000) levaram a identificação da substância **13** (figura 52, p. 87) como sendo a Proctoriona C, isolada pela primeira vez de *Peperomia proctorii*.

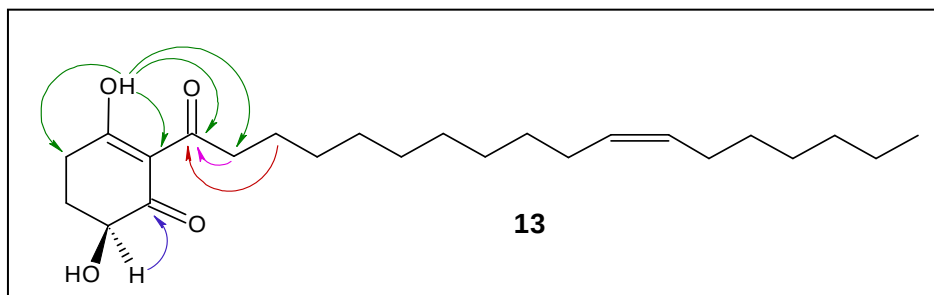


Figura 53: Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC de 14

5.1.2.4.3. Policetídeo 15

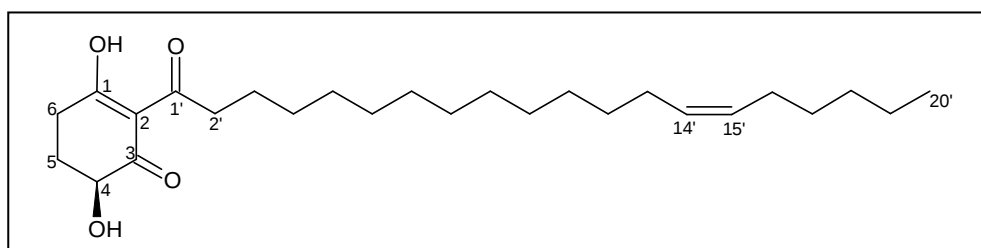


Figura 54: Estrutura química de 15

A substância **15** difere da substância **13** apenas pelo acréscimo de dois grupos metilênicos na cadeia alifática, que foram identificados pelo espectro de massas da molécula. Com a espectrometria de massas de baixa resolução foi possível observar o pico do íon *quasi* molecular $[M-H]^- = 419$ (100%) sugerindo a fórmula molecular $C_{26}H_{44}O_4$ (espectro 244, p. 251).

Desta forma o espectro de RMN de 1H (espectros 228-231, p. 243-244; tabela 14, p. 89) apresentou os sinais dos hidrogênios metilênico H-4'-H-12' e H-17'-H-19' em δ 1,18-1,29 (24H, m) e o sinal em δ 5,31 (2H, m) foi atribuído aos hidrogênios da dupla ligação da cadeia alifática, H-14' e H-15'. O espectro de ^{13}C (espectro 232, p. 245; tabela 15, p. 90) apresentou os sinais dos carbonos metilênicos C-4'-C-12' e C-17' em δ 29,1-29,6 e os sinais dos carbonos olefínicos, agora nas posições C-14' e C-15', exibem sinais em δ 129,7.

A atividade ótica da substância **15** não foi medida, mas por apresentar o mesmo valor alto da constante de acoplamento ($J = 13,0$ Hz) entre H-5 (ψ -axial) e H-4, podemos sugerir novamente que a hidroxila OH-4 está na posição ψ -equatorial.

Estes dados comparados aos dados disponíveis na literatura (Cheng, *et al*, 2003; Seeram *et al.*, 2000) levaram a identificação da substância **15** (figura 54, p. 88) como sendo a Surinona C, isolada de *Peperomia sui*.

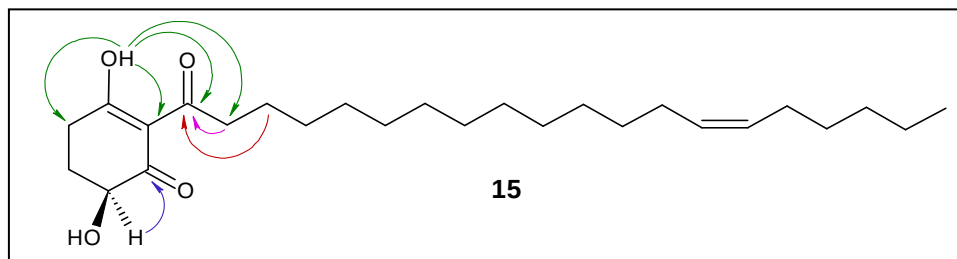


Figura 55: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC de **15**.

5.1.2.4.4. Policetídeo **14**

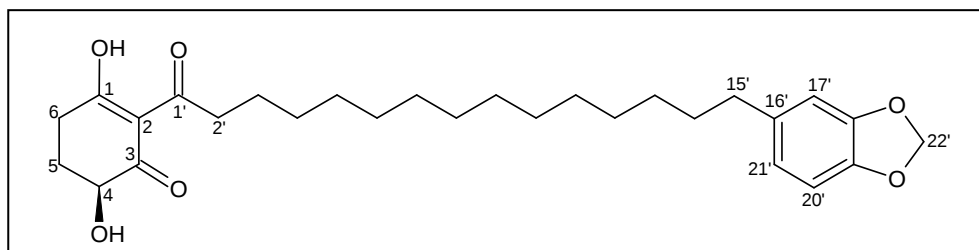


Figura 56: Estrutura química de **14**.

A diferença encontrada para a substância **14** no espectro de RMN de ^1H (espectros 211-214, p. 234-235; tabela 14, p. 89) está na presença de um anel aromático ligado a cadeia alifática, na posição 15', com isso o H-15' apresenta um sinal em δ 2,44 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H). Os hidrogênios aromáticos aparecem em δ 6,59 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), δ 6,63 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H) e δ 6,53 (dd, $J = 1,5$ e 7,5 Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos H-17', H-20' e H-21', caracterizando um anel *orto,meta* tri-substituído. O sinal observado em δ 5,83 (s, 2H), confirma o grupo metilenodioxílico como substituinte do anel aromático nas posições 18'/19'.

A análise do espectro de ^{13}C (espectro 215, p. 236; tabela 15, p. 90) confirmou a presença do anel aromático com sinais em δ 136,8, δ 108,8, δ 145,3, δ 147,4, δ 108,0 e δ 121,0, atribuídos respectivamente aos C-16' - C-21'. O grupo metilenodioxílico substituinte exibe seu sinal em δ 100,6.

As correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC (espectros 217-223, p. 237-240; figura 57, p. 88) são as mesmas observadas para a substância **13**, contudo pode-se acrescentar as correlações observadas entre o carbono em δ 35,6 (C-15') e os hidrogênios aromáticos em δ 6,53 (C-21') e δ 6,59 (C-17'), o que permite concluir a ligação da cadeia alifática ao C-16' do anel aromático, e também a correlação dos hidrogênios do grupo metilenodioxila em δ 5,83 com os carbonos em δ 145,3 (C-18') e δ 147,4 (C-19') deste mesmo anel.

Na espectrometria de massas de baixa resolução foi possível observar o pico do íon *quasi* molecular $[M-H]^- = 471$ (100%) sugerindo a fórmula molecular $C_{28}H_{40}O_6$ (espectro 227, p. 242).

A estereoquímica na posição 4 pôde ser determinada após medida a atividade ótica da substância que apresentou um valor de $[\alpha]_D^{25} = -21,1^\circ$ com concentração de 0,6 mg/ml, em $CHCl_3$, e também pela constante de acoplamento alta ($J = 13,0\text{Hz}$) entre H-5 (ψ -axial) e H-4, sugerindo que a hidroxila OH-4 está na posição ψ -equatorial.

Estes dados comparados aos dados disponíveis na literatura (Cheng, *et al*, 2003; Seeram *et al.*, 2000) levaram a identificação da substância **14** (figura 56, p. 89) como sendo a Surinona A, isolada de *Peperomia sui*. (Cheng *et al.*, 2003).

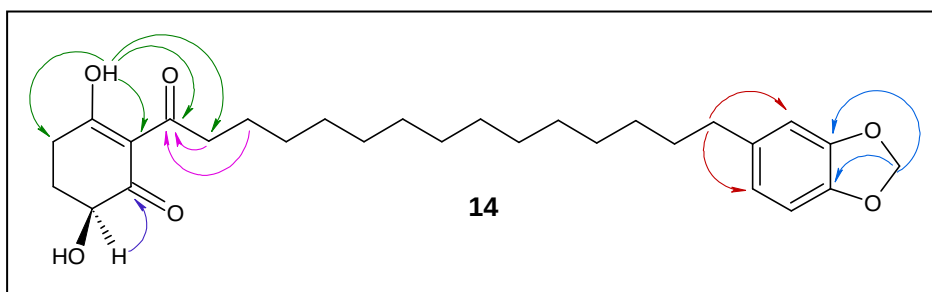


Figura 57: Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC da substância 14

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **13-15**.

Posição	13	14	15
	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)	δ_{H} (mult; J/Hz)
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	4,01 (dd; 5,5 e 13,0)	4,01 (dd; 5,5 e 13,0)	4,00 (dd; 5,5 e 13,0)
5 H _{ax}	1,73 (ddt, 7,0, 11,5, 13,0)	1,74 (ddt, 7,0, 11,0, 13,0)	1,74 (ddt, 7,0, 11,0, 13,0)
5 H _{eq}	2,30 (m)	2,31 (m)	2,31 (m)
6	2,71 (m)	2,71 (m)	2,71 (m)
1'	---	---	---
2' H _a	2,90 (ddd, 6,0, 9,0, 16,0)	2,91 (ddd; 6,0, 8,5, 16,0)	2,89 (ddd; 6,0, 9,0, 15,0)
2' H _b	3,01 (ddd, 6,0, 9,0, 16,0)	2,99 (ddd; 6,0, 8,5, 16,0)	2,99 (ddd; 6,0, 9,0, 15,0)
3'	1,55 (m)	1,54 (m)	1,55 (m)
4'	1,18 - 1,28 (m)	1,18 - 1,31 (m)	1,18 - 1,29 (m)
5'			
6'			
7'			
8'			
9'			
10'	1,94 (m)	1,54 (m)	1,95 (m)
11'	5,27 (m)		
12'	5,27 (m)		
13'	1,93 (m)		
14'	1,18-1,28 (m)		
15'	1,18-1,28 (m)	1,54 (m)	5,31 (m)
16'		2,44 (t; 7,5)	5,31 (m)
17'		---	1,95 (m)
18'	0,82 (t, 7,0)	6,59 (d; 1,5)	1,18-1,29 (m)
19'		---	
20'	---	6,63 (d; 7,5)	
21'	---	6,53 (dd; 1,5, 7,5)	---
22'	---	5,83 (s)	---
OH (4)	---	---	3,95 (s)
OH (1)	18,15 (s)	18,16 (s)	18,16 (s)

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substâncias **13-15**.

Posição	13 δ_{C}	14 δ_{C}	15 δ_{C}
1	197,8	197,8	197,7
2	110,3	110,3	110,2
3	195,5	195,5	195,4
4	71,6	71,6	71,5
5	26,9	27,1	26,8
6	31,3	31,3	31,8
1'	206,0	206,0	205,9
2'	40,2	40,2	40,1
3'	24,5	24,5	24,4
4'	29,2-29,7	29,1-29,6	29,1-29,6
5'			
6'			
7'			
8'			
9'			
10'	27,1	29,1-29,6	29,1-29,6
11'	129,8		
12'	129,8		
13'	27,1		
14'	29,2-29,7	31,7	129,7
15'		35,6	129,7
16'	31,9	136,8	27,0
17'	22,3	108,8	29,1-29,6
18'	13,9	145,3	31,1
19'	---	147,4	22,2
20'	---	108,0	13,8
21'	---	121,0	---
22'	---	100,6	---

5.3. Análise do perfil cromatográfico do extrato AcOEt das folhas de *Peperomia blanda*.

As substâncias isoladas foram identificadas nos cromatogramas dos extratos AcOEt, utilizando as mesmas condições de análise usadas para o estudo inicial de perfil cromatográfico apresentadas no item 4.1.1 (p. 28).

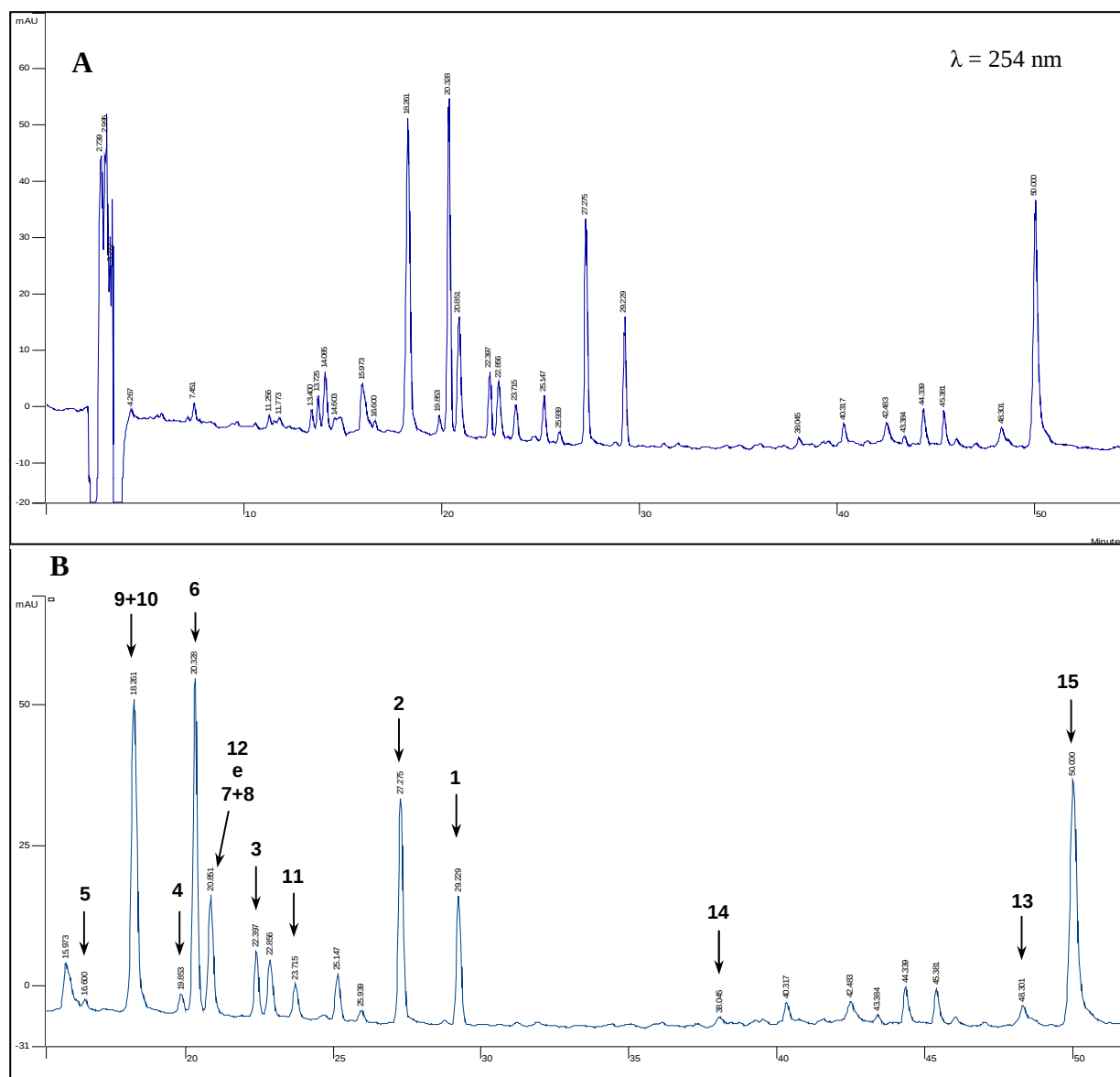


Figura 58: A – Cromatograma do extrato AcOEt das partes aéreas de *Peperomia blanda*. B – Ampliação com identificação das substâncias isoladas (1-15). (Condições de análise: 35% ACN $\rightarrow$ 100% ACN em 40 min e mais 15 min em 100% de ACN, fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

Os cálculos dos rendimentos em massa de cada substância em relação ao extrato bruto e frações estão descritos nas tabelas 16 e 17 (p. 92).

Tabela 16: Rendimentos das substâncias isoladas do extrato AcOEt 1.

Massa do extrato bruto 1 (g)	Massa da fração DCM (g)	Substância	Massa da substância (g)	Rendimento em relação ao extrato (%)
8,5	1,9	1	0,010	0,118
		2	0,042	0,494
		3	0,007	0,082
		4	0,009	0,106
		5	0,004	0,047
		11	0,035	0,412
		12	0,046	0,541

Tabela 17: Rendimentos das substâncias isoladas do extrato AcOEt 2.

Massa do extrato bruto 2 (g)	Fração ^a - massa (g)	Substância	Massa da substância (g)	Rendimento em relação ao extrato (%)
26,8	DCM - 7,9	1	0,120	0,447
		2	0,069	0,257
		3	0,009	0,033
		6	0,120	0,447
		7+8	0,012	0,045
		9	0,053	0,198
		10	0,075	0,279
		11	0,060	0,224
		12	0,110	0,410
		13	0,022	0,082
	Hexânica - 14,3	14	0,011	0,041
		15	0,029	0,108

^a Frações da partição líquido-líquido

5.2. Avaliação da atividade tripanocida

Todas as lignanas tetraidrofurânicas isoladas foram submetidas à bioensaio *in vitro* frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e os respectivos valores de CI_{50} são apresentados na tabela 18 (p. 93).

Tabela 18: Atividade tripanocida das lignanas tetraidrofurânicas **1-5** isoladas de *Peperomia blanda* frente a forma epimastigota de *T. cruzi*.

Substância	CI_{50} (μM)
1	23,9
2	30,3
3	46,2
4	56,6
5	58,7
Benznidazol ^a	33,5

^a Controle positivo

Todas as lignanas tetraidrofurânicas apresentaram potente atividade tripanocida. A substância **1**, que possui dois grupos metilenodioxílico, foi mais ativa que as outras lignanas que possuem apenas um ou nenhum grupo metilenodioxílico.

Ao contrário das lignanas tetraidrofurânicas, as secolignanas não apresentaram atividades significantes, com CI_{50} maiores de 200 μM frente a este mesmo ensaio.

Os policetídeos mostraram ser uma classe com atividades muito interessantes frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As substâncias **13-15** foram submetidas aos mesmos ensaios anteriores e apresentaram valores de CI_{50} menores, sendo mais potente que as lignanas tetraidrofurânicas (tabela 19, p. 94).

Tabela 19: Atividade tripanocida dos policetídeos **13-15** isolados de *Peperomia blanda* frente a forma epimastigota de *T. cruzi*.

Substância	CI ₅₀ (μM)
13	18,3
14	17,3
15	16,2
Benznidazol ^a	33,5

^a Controle positivo

5.3. Estudo biossintético de *Peperomia blanda*

5.3.1. Obtenção da PAL de folhas de *Peperomia blanda*

A fenilalanina-amônia liase (PAL) é a enzima iniciadora da sequência de reações que produzem as lignanas, além de estarem também envolvidas na biossíntese do anel A dos flavonóides. Sendo assim foram realizados experimentos buscando caracterizar essa enzima nas folhas de *P. blanda*, uma vez que foram isoladas lignanas e flavonas dos extratos obtidos desse órgão vegetal.

Geralmente, a PAL é extraída de espécies vegetais e de microorganismos utilizando tampão borato (Cunha *et al.*, 1996; Fritz, 1976). Para preservar a atividade enzimática, os experimentos foram realizados a baixa temperatura. Os processos de oxidação foram inibidos pela adição de DTT e de ácido ascórbico. O DTT foi escolhido devido ao fato de ser menos tóxico do que o mercaptoetanol, outro agente antioxidante comumente utilizado. Além disso, é necessário apenas 1 mM de DTT, enquanto que são necessários 20 mM de mercaptoetanol para se obter o mesmo efeito.

A complexação dos compostos fenólicos foi feita pela adição de PVPP, além disso a solução tampão extratora continha DTT, um agente oxidante forte que inibe a ação das fenóis oxidases. Para a complexação dos metais foi utilizado EDTA devido ao fato deste complexar com a maioria dos íons, enquanto que EGTA é específico para o cálcio.

A sacarose foi adicionada à solução tampão extratora para aumentar a estabilidade da enzima durante os processos de congelamento.

Para a clarificação do extrato foi realizada centrifugação a 16.300 x g por trinta minutos. Nesta centrifugação são retirados dos extratos restos celulares, tais como: pedaços de membranas, organelas, núcleo, enzimas insolúveis e todas as outras substâncias celulares insolúveis na solução tampão extratora.

A purificação da PAL foi iniciada utilizando a técnica de precipitação salina. A precipitação de proteínas pela alta concentração de sais é um processo importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a solubilidade da proteína é devida, em grande parte, à distribuição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da molécula e, desta maneira, proteínas diferentes respondem de modo distinto para agentes precipitantes. Foram obtidas as frações de 0 a 25%, de 25 a 55%, de 55 a 80% de saturação, sendo que esses valores foram escolhidos com base em trabalhos de purificação da PAL de

outras espécies vegetais e microorganismos que mostram que esta enzima usualmente precipita quando a saturação da solução está entre 25 e 55% (Chen, *et al.*, 1988, Hao, *et al.*, 1996).

Os precipitados obtidos na precipitação fracionada foram ressuspensos em 3 mL de solução tampão borato 0,1M (pH 8,8) e submetidos a dessalinização em coluna de PD-10 para a eliminação da alta concentração de sulfato de amônio que pode vir a interferir na atividade da enzima.

Primeiramente foi determinada a concentração protéica do extrato bruto e das frações obtidas na precipitação fracionada através do 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, onde 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 (figura 59, p. 96).

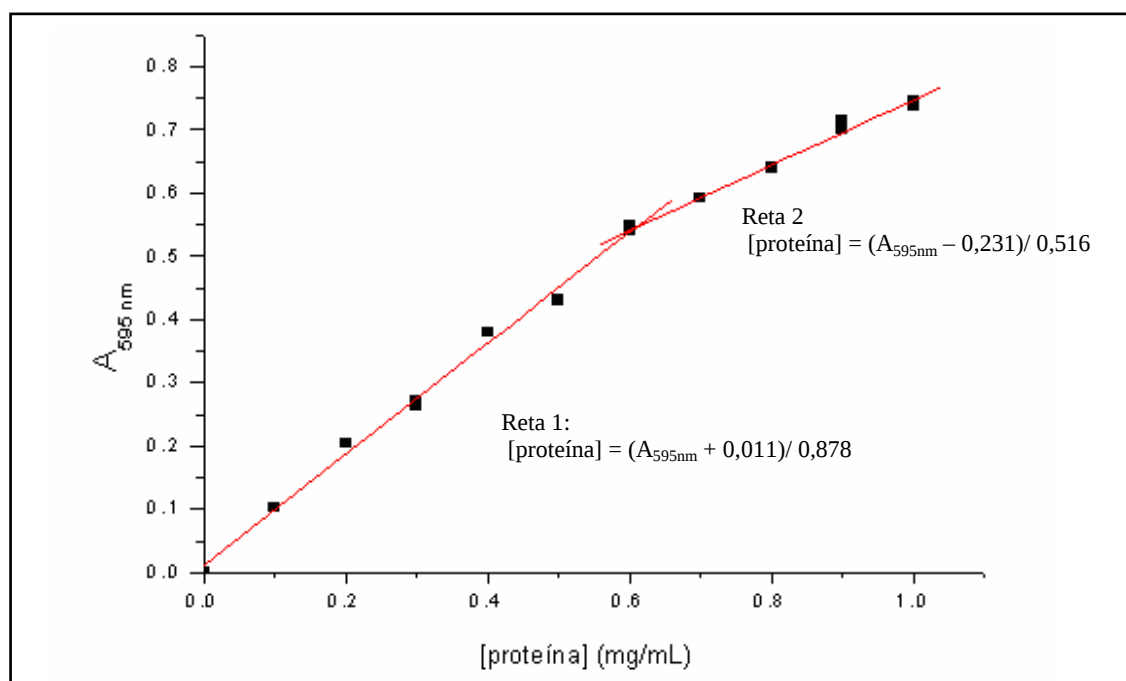


Figura 59: Curva analítica da ovoalbumina bovina (fração V).

A leitura das absorbâncias de cada fração foi realizada adicionando-se um volume de 10 μL de solução. Um exemplo dos cálculos feitos para a quantificação das proteínas nas amostras está na tabela 20 (p. 97).

Tabela 20: Cálculo das concentrações de proteína, estimada pelo método de Bradford, das frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio e após dessalinização.

Amostras	A ₁	A ₂	média A	[proteína]	conc. (mg/mL)*
0-25%	0,049	0,048	0,048	0,042	0,210
25-55%	0,634	0,627	0,630	0,773	3,866
55-80%	0,222	0,221	0,221	0,239	1,196
Sobrenadante (80%)	0,013	0,011	0,012	0,001	0,005

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

5.3.2. Ensaios enzimáticos

O extrato bruto e as frações obtidas na precipitação fracionada foram incubadas com fenilalanina para a avaliação da atividade da PAL. Após a incubação por 24 horas, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de HCl 6M, centrifugada e analisada por CLAE. A reação foi acompanhada pela observação do aparecimento do pico do ácido cinâmico em aproximadamente 4,1 minutos (figura 60, p. 98). A identificação do pico foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos com o obtido pela injeção de solução de ácido cinâmico puro nas mesmas condições.

A quantificação do ácido cinâmico produzido em cada ensaio foi feita através da curva analítica obtida em diferentes concentrações deste (figura 61, p. 99), sendo que as injeções foram realizadas nas mesmas condições experimentais das reações.

A atividade da enzima foi maior na fração 25-55% de saturação, sendo observada em menor grau nas demais frações, exceto no sobrenadante (tabela 21, p. 97).

Tabela 21: Concentração de ácido cinâmico formado nas reações com extrato bruto e frações da precipitação salina.

Frações	[ácido cinâmico] μ M	[ácido cinâmico] μ M/mg de proteína
bruto	0,82	1,57
0-25%	3,58	10,23
25-55%	133,63	46,27
55-82%	3,92	2,63
sobrenadante	---	---

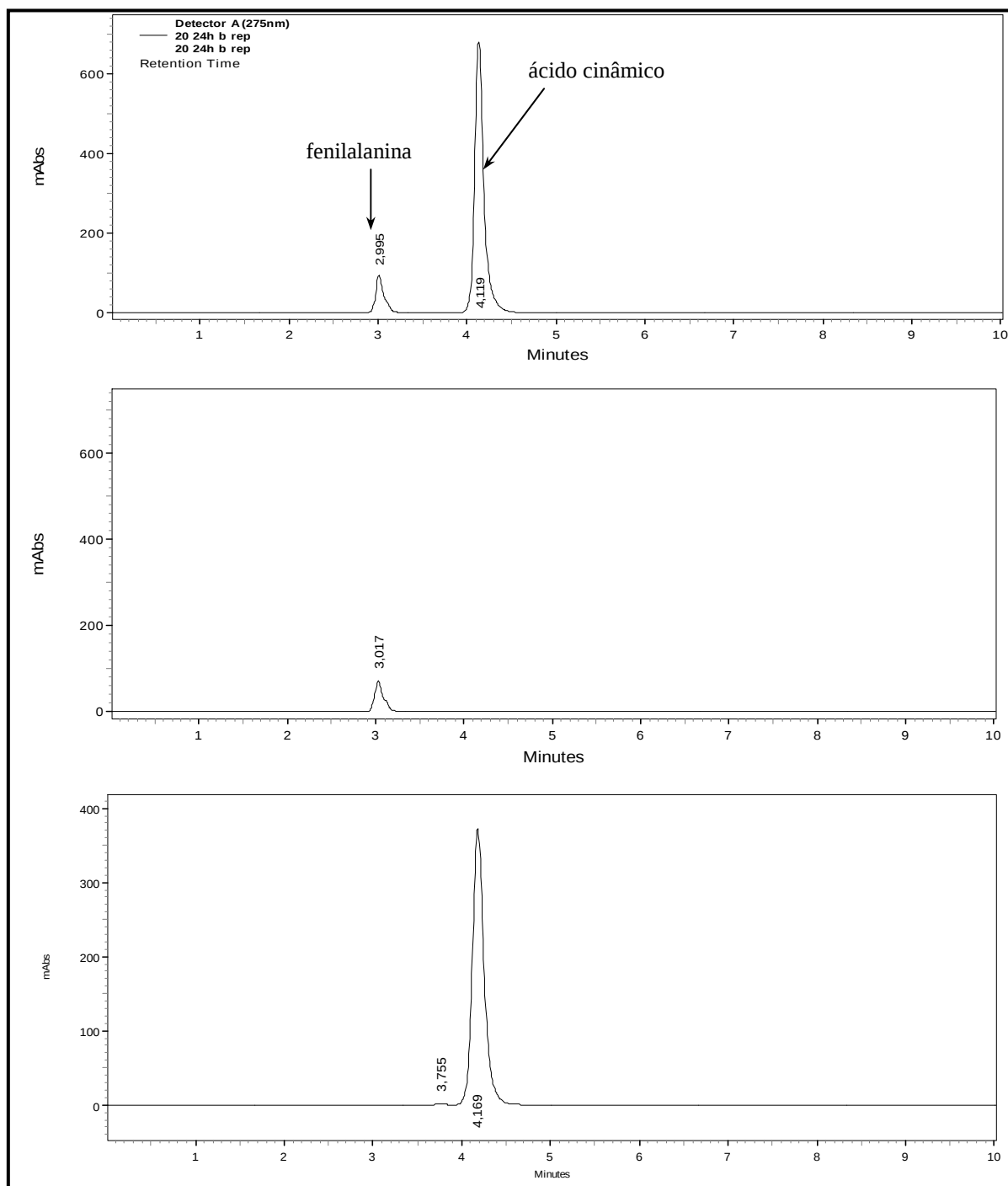


Figura 60: **A** – Cromatograma obtido após a incubação da fração 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) com o precursor fenilalanina 20 mM em tampão borato 0,1M (pH 8,8). Condições de análise: T = 40°C, tempo de incubação de 24 horas. **B** – Cromatograma obtido após a incubação da fração 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) com o precursor fenilalanina 20 mM em tampão borato 0,1M (pH 8,8) na presença de HCl 6M, nas mesmas condições de análise de A. **C** - Cromatograma obtido da injeção do ácido cinâmico nas mesmas condições experimentais.

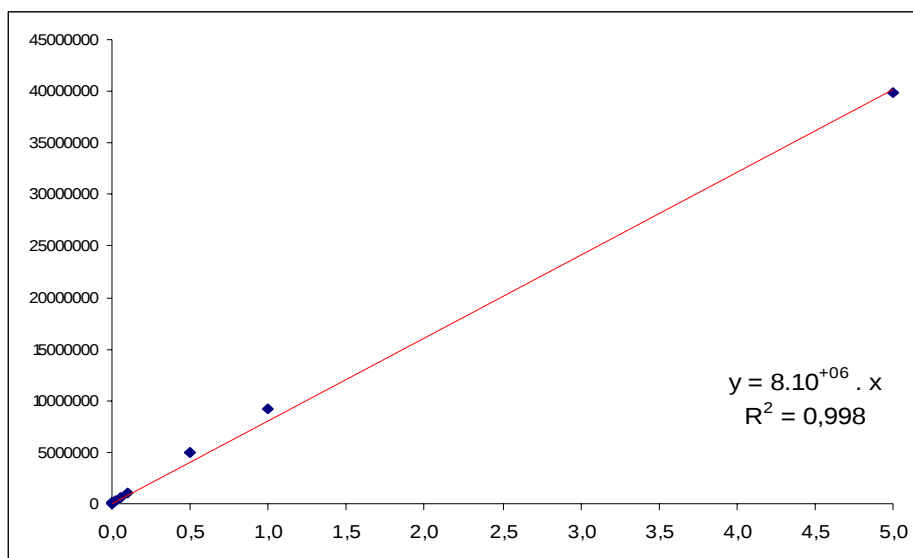


Figura 61: Curva analítica do ácido cinâmico

O extrato bruto e as frações obtidas na precipitação salina foram diluídas para uma concentração aproximada de 0,2 mg/mL, tratadas como descrito em materiais e métodos e aplicadas ao gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após a eluição, o gel foi submetido à revelação com nitrato de prata, uma vez que este método é muito mais sensível do que o método de revelação com Coomassie Blue.

O método de tingimento com nitrato de prata baseia-se na ligação dos íons de prata com os grupos sulfidríla e carbonila das proteínas. As proteínas foram fixadas ao gel utilizando-se ácido tricloroacético e reduzidas com DTT. Em uma etapa posterior foi adicionada a solução de carbonato de sódio/formaldeído para a revelação das proteínas.

Após a adição do carbonato de sódio/formaldeído, sais de prata se formaram rapidamente tornando a solução amarelada. Esta foi descartada para prevenir que o precipitado de prata fosse adsorvido na superfície do gel, e uma nova solução de carbonato de sódio/formaldeído foi adicionada. O carbonato de sódio é utilizado para tornar o gel alcalino e assim o formaldeído pode reduzir os íons de prata para a forma metálica. Além disso, o ácido fórmico produzido também é tamponado pela adição do carbonato de sódio (Merril, 1984).

A fração ativa (25-55%) apresenta uma banda entre 45.000 e 66.200 daltons (figura 62, p. 100), a qual provavelmente é referente a enzima PAL. É possível observar que esta banda aparece no extrato bruto e muito fracamente na fração 0-25%, o que corrobora a atividade enzimática observada.

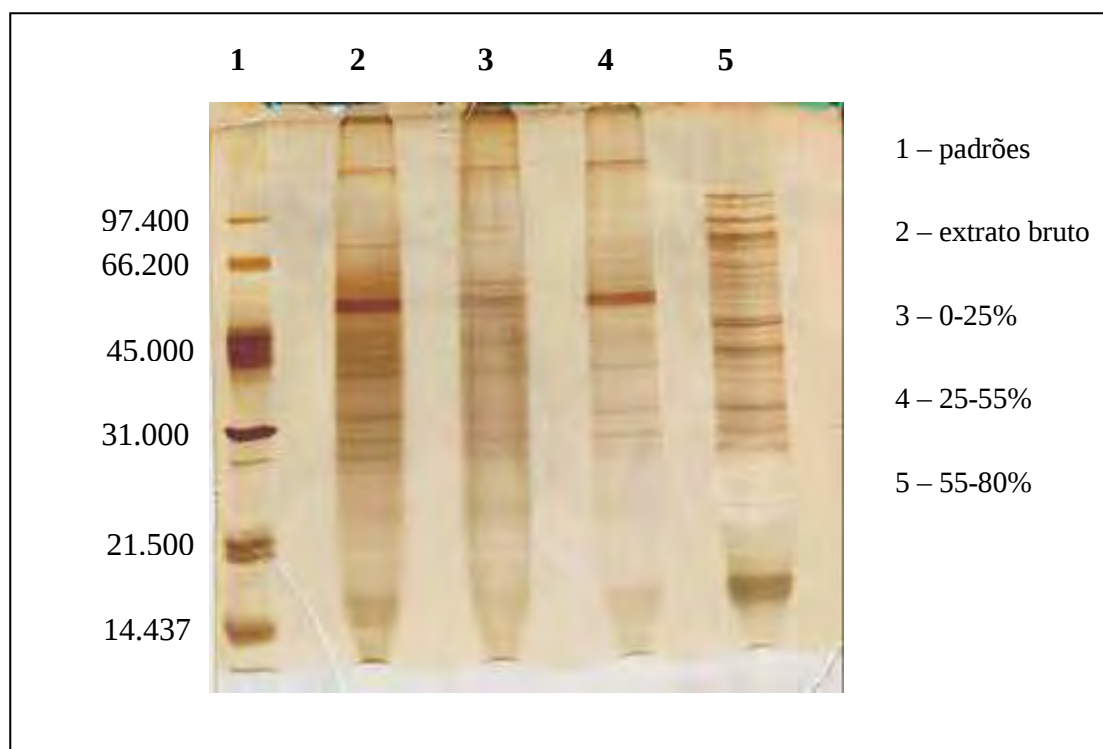


Figura 62: Gel de poliácridamida obtido por eletroforese das frações preparadas por precipitação fracionada, revelado com nitrato de prata.

Geralmente a PAL é descrita como uma enzima tetramérica, com pesos moleculares entre 150000 Da a 330000 Da (Hao, *et al.*, 1996). No entanto, o gel apresentado foi realizado com a enzima desnaturada, e a banda visualizada em aproximadamente 52000 Da deve ser referente a um monômero da enzima. Seu tetrâmero mostraria, portanto, um peso molecular de aproximadamente 208000 Da.

5.3.3. Caracterização da PAL de *P. blanda*

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação *in vitro*, catalisada por uma enzima, é a concentração do substrato. Sendo assim, foi realizado um experimento variando-se a concentração de substrato, onde foram utilizadas as concentrações de 0,5, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 mM de fenilalanina e em diferentes tempos de reação (10, 30, 60, 120, 240 e 1440 minutos), mantendo-se a concentração de proteína constante em todos os experimentos (1,0 mg/mL).

Os ensaios foram realizados em triplicada, sendo obtida a área média dos picos. A tabela 22 (p. 101) mostra os cálculos da média das áreas, desvio padrão e concentração do ácido cinâmico formado para a reação utilizando fenilalanina a 0,5 mM e tempos de 10, 30, 60, 120, 240 e 1440 minutos. Os desvios apresentados não foram maiores que 3%, o que indica uma boa reprodutibilidade. Esses mesmos cálculos foram feitos para as demais concentrações de fenilalanina.

Tabela 22: Cálculos do desvio padrão e da concentração de ácido cinâmico formado na reação utilizando fenilalanina 0,5 mM em tempos diferente.

Tempo de reação (minutos)	Área 1	Área 2	Área 3	Área média	Desvio padrão	Concentração de ácido cinâmico (mM)
10	38217	39020	38042	38426	1,36	0,0048
30	87865	88359	91645	89290	2,30	0,0112
60	140469	140035	142623	141042	0,98	0,0176
120	276472	290863	279988	282441	2,66	0,0353
240	499380	529022	510245	512882	2,92	0,0641
1440	1268391	1286733	1235976	1263700	2,03	0,1420

Estudar os efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de que este varia durante o curso de uma dada reação, à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial quando a concentração de substrato é muito maior que a concentração da enzima. Assim, se o tempo for suficientemente curto, as variações de concentração do substrato serão desprezíveis, e consideradas constante.

A partir da concentração do ácido cinâmico formado para os primeiros minutos da reação, construiu-se gráficos de [ácido cinâmico] x tempo, para cada ensaio (como na figura 63, p. 102). Utilizando-se regressão linear pode-se determinar as respectivas velocidades iniciais de reação (V_0). A partir do coeficiente angular da reta, obteve-se a velocidade inicial de formação do ácido cinâmico para cada ensaio (tabela 23, p. 102).

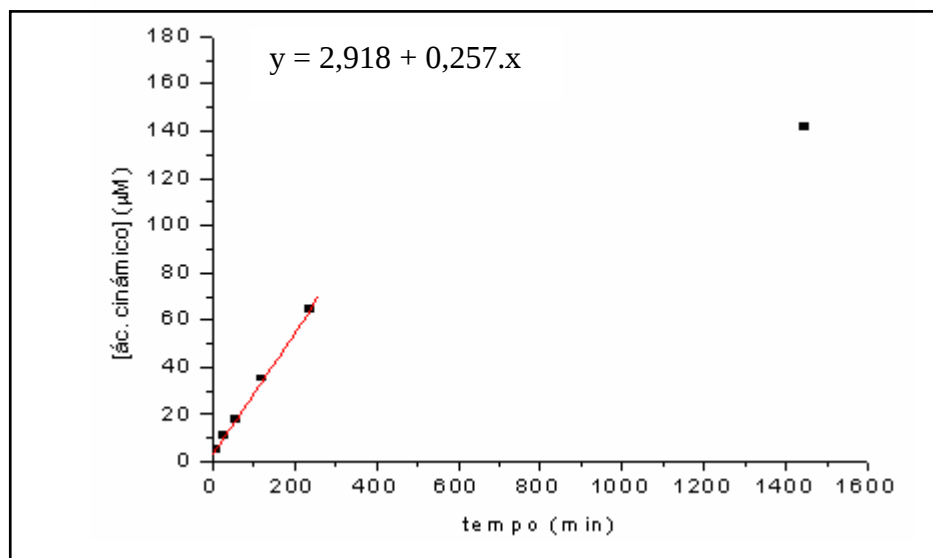


Figura 63: Variação da concentração de ácido cinâmico formado em relação ao tempo de reação quando foram utilizadas uma concentração de 0,5 mM de fenilalanina e a fração enzimática semipurificada (1 mg/mL).

Tabela 23: Velocidade inicial em cada ensaio enzimático de acordo com a concentração real de substrato adicionado.

[S]* (mM)	V_0 (mM/min)
0,136	0,257
0,680	0,344
1,363	0,386
2,727	0,416
5,454	0,464

* Concentração real de fenilalanina na solução final de cada reação.

O efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente pode ser representada graficamente (figura 64, p. 103).

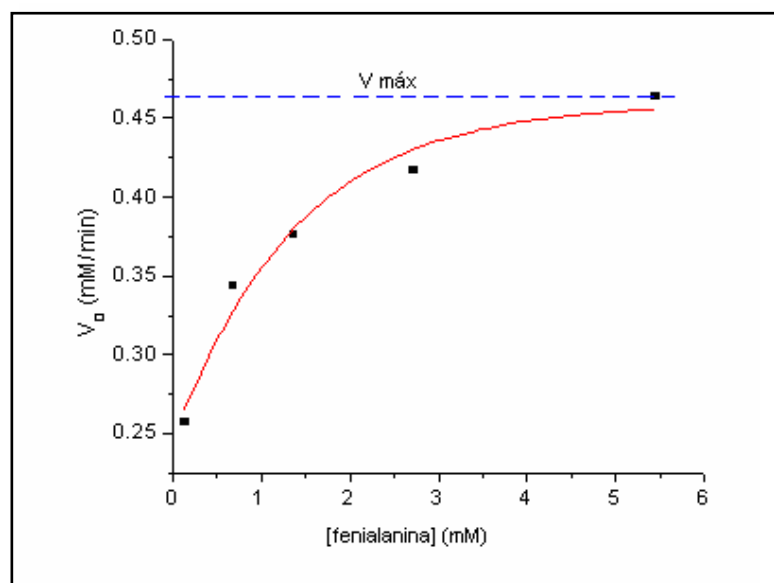


Figura 64 : Gráfico de Michaelis-Menten construído para a reação enzimática da PAL de *P. blanda*.

É possível verificar através deste gráfico que essa reação segue o modelo da cinética de Michaelis-Menten, no qual é verificado o efeito da variação da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática quando a concentração de enzima é mantida constante. Em concentrações de substrato muito baixas, a velocidade da reação é muito baixa, mas ela aumentará com um aumento da concentração de substrato. Com o aumento da concentração de substrato, observa-se que o aumento da velocidade será cada vez menor, chegando a um ponto além do qual haverá apenas acréscimos desprezíveis desta. Não importa o quanto seja aumentada a concentração do substrato além deste ponto, a velocidade da reação se aproximará de um patamar constante, sem nunca atingi-lo de fato. Neste patamar, chamado de velocidade máxima ($V_{\max}$), a enzima está saturada com o substrato e não pode funcionar mais rápido. Sendo assim, o gráfico de Michaelis-Menten nos dá uma estimativa da velocidade máxima atingida pela reação, em aproximadamente 0,45 mM/min. No entanto, é possível determinar a velocidade máxima com maior precisão, utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco do gráfico de Michaelis-Menten, representado pela figura 65 (p. 104).

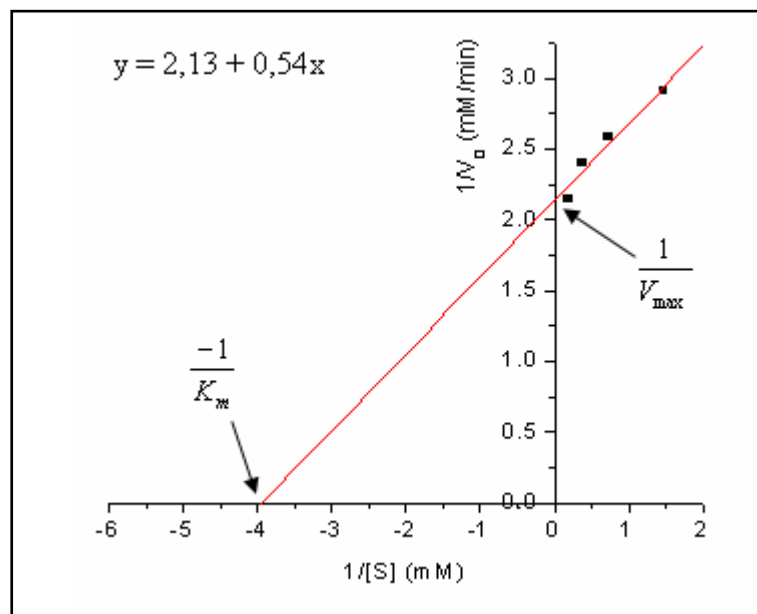


Figura 65: Gráfico de duplo-recíproco construído para a reação enzimática da PAL de *P. blanda*.

A reta obtida no gráfico de duplo-recíproco nos dá, em seu ponto de intersecção com eixo y, o valor do $1/V_{\max}$, sendo calculado $V_{\max}$ igual a $0,469 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$. Com este gráfico também é possível determinar o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m), que será o inverso do valor encontrado na intersecção da reta com o eixo x ($1/K_m$), sendo K_m calculado igual a $253 \mu\text{M}$. A constante de Michaelis-Menten pode ser definida como a concentração de substrato específico na qual uma enzima produz metade de sua velocidade máxima, o que significa de forma geral que, quanto maior o valor de K_m , maior será a concentração de substrato necessária para atingir a metade da velocidade máxima da reação. O valor de K_m foi comparado aos encontrados na literatura, sendo que Sarma e Sharma (1999) apresentaram K_m de $500 \mu\text{M}$ para PAL de sementes de arroz e Hao (1996) mostrou que para PAL de *Ocimum basilicum*, o valor de K_m é $3,29 \mu\text{M}$.

É importante ressaltar, que apesar da fração enzimática conter grande concentração da enzima PAL, ela não se encontra totalmente pura, sendo estes valores encontrados de K_m e $V_{\max}$, uma estimativa próxima dos valores reais da reação com a enzima pura.

CONCLUSÕES

O estudo químico das folhas de *Peperomia blanda* resultou no isolamento de quinze substâncias, entre as quais cinco lignanas tetraidrofurânicas, cinco secolignanas, duas flavonas e três policetídeos.

As configurações relativas das lignanas tetraidrofurânicas foram determinadas através de experimentos de NOESY 1D, e todas apresentaram estruturas químicas inéditas. As secolignanas também tiveram suas estereoquímicas relativas determinadas por experimentos de NOESY 1D, e as estereoquímicas absolutas foram determinadas por dicroísmo circular. As secolignanas isoladas foram previamente obtidas por síntese, sendo que todas estão sendo descritas pela primeira vez como produto natural de planta. As flavonas e os policetídeos já foram encontrados em outras espécies de *Peperomia*.

A análise do extrato bruto das folhas de *P. blanda* por CLAE e a comparação deste com os cromatogramas obtidos para as substâncias puras mostrou que praticamente todas as substâncias que ocorrem em *P. blanda* foram isoladas.

Todas as lignanas tetraidrofurânicas apresentaram potente atividade tripanocida, sendo que a mais ativa foi a substância **1** com um CI_{50} de 23,9 μM . Ao contrário das lignanas tetraidrofurânicas, as secolignanas não apresentaram significativa atividade, apresentando CI_{50} maiores que 200 μM . Os policetídeos foram mais potentes que as lignanas tetraidrofurânicas, frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando CI_{50} entre 16,2 e 18,3 μM , menores que o do padrão utilizado no experimento, benznidazol que mostrou CI_{50} de 33,5 μM .

A variedade de classe de metabólitos secundários encontrados na espécie vegetal estudada e as potentes atividades tripanocida da maioria destas substâncias mostraram a importância da ampliação do estudo químico e biológico do gênero *Peperomia*, que ainda é pouco explorado em relação aos outros gêneros da família Piperaceae.

Visto que essa espécie mostra o acúmulo de uma grande variedade de lignanas e flavonas, foram realizados experimentos para determinar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), enzima envolvida na primeira etapa da biossíntese destas classes de substâncias. A PAL foi extraída das folhas utilizando tampão borato. A incubação do extrato obtido com fenilalanina levou a formação do ácido cinâmico.

A purificação da PAL das folhas de *P. blanda* foi baseada em experimentos de precipitação salina utilizando sulfato de amônio, sendo que a fração de 25-55% mostrou-se a mais ativa.

A análise do extrato bruto e das frações obtidas na precipitação salina por SDS- PAGE mostrou uma banda proeminente na fração ativa entre 45.000 e 66.200 Da, a qual provavelmente é referente a enzima PAL, uma vez que suas formas tetraméricas já foram descritas na literatura em pesos moleculares que variam de 150.000 a 330.000 Da.

Ensaio realizados com a fração mais ativa levaram a uma estimativa da atividade enzimática da PAL. Foi possível verificar que a reação segue o modelo da cinética de Michaelis-Menten, uma vez que foi verificado o efeito da variação da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática quando a concentração de enzima foi mantida constante. Com os dados obtidos no estudo da cinética utilizando a fração enriquecida com a enzima de interesse, foi possível estimar valores para a velocidade máxima ($V_{\max}$) e constante de Michaelis-Menten (K_m) da reação, iguais a $0,469 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ e $253 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente. Sendo assim, este trabalho contribui também com a ampliação dos conhecimentos sobre esta enzima, fundamental na via de formação de compostos fenilpropanoídicos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, p. 389, 1985.
- AGRAWALL, P. K.; BANSAL, M. C. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
- AIRES, D. C.; LOIKE, J. D. **Chemistry and pharmacology of natural products-Lignans: chemistry, biological and clinical properties**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 637-639, 1998.
- AQUIL, M.; KAHAN, I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 213-215, 1993.
- ARIAS, T.; CALLEJAS, R.; BORNSTEIN, A. New Combinations in Manekia, an earlier name for *Sarcorhachis* (Piperaceae). **Novon**, v. 16, n. 2, p. 205-208, 2006.
- ARRIGON-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, p. 215-218, 2004.
- BADHEKA, L. P.; PRABHU, B. R.; MULCHANDANI, N. B. Lignans from *Piper cubeba*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2033-2036, 1986.
- BAIROCH, A. The enzyme data bank in 1999. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 310-311, 1999.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.
- BAYMA, J. C.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; CANTO, W. C. A dimeric ArC_2 compound from *Peperomia pellucid*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 779-782, 2000.
- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.
- BERNACCHI, A. S.; FRANKE DE CAZZULO, B.; CASTRO, J. A.; CAZZULO, J. J. Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. **Zhōngguó Yàoli Xuébào**, v. 23, n. 5, p. 399-404, 2002.

- BERNARD, A. Preparation of mitochondria from plants. In: COLOWUCK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in enzymology**: preparation and assay of enzymes. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p. 19-29.
- BIFTU, T.; STEVENSON, R. Natural 2,5-bisaryltetrahydrofuran lignans: platelet-activating factor antagonists. **Phytoterapy Research**, v. 1, n. 3, p. 97-106, 1987.
- BLANCHARD, J. S. Buffers for enzymes. In: JAKOBY, W. B. (Ed.). **Methods in enzymology**: enzyme purification and related techniques. San Diego: Academic Press, 1984. v. 104, p. 404-421.
- BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 Nmr Spectroscopy**. 3rd ed. New York: VHC, 1990. p. 192.
- BURKE, B.; NAIR, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1427-1430, 1986.
- CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.
- CAMPBELL, M. M.; ELLIS, B. E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell-cultures. 3. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p. 62-70, 1992.
- CHANG, M. N.; HAN, G. Q.; ARISON, B. H.; SPRINGER, J. P.; HWANG, S. B.; SHEN, Y. T. Neolignans from *Piper futokadsura*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2074-2082, 1985.
- 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, C-M.; JAN, F-Y.; CHEN, M-T; LEE, T-J. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**, v. 29, n. 3, p. 411-414, 1989.
- CHENG, M-J.; LEE, S-J.; CHANG, Y-Y.; WU, S-H.; TSAI, I-L.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I-S. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, 2003.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 915-916, 2002.
- CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer agents from natural products**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- D'CUNHA, G. B.; ATYANARAYAN, V.; NAIR, P. M. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 17-20, 1996.
- DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, p. 555-559, 2003.

DATA Index 4: alphabetical listing of industrial enzymes and source. 2nd ed. New York: Stockton Press, 1996. p. 583-588.

DEBONSI, H. M.; MIRANDA, J. E.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: Potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Pest Management Science**, v. 63, p. 399-403, 2007.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Product Reports**, v. 15, p. 17-58, 1998.

DIAS, J. C. P.; BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48.

DIAZ, P. P.; RAMOS, B. C.; MATTA, G. E. New C₆-C₃ and C₆-C₁ compounds from *Piper lenticelloseum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 690-691, 1986.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1964.

DUBERY, I. A.; SMIT, F. Phenylalanine ammonia-lyase from cotton (*Gossypium hirsutum*) Hypocotyls – properties of the enzyme induced by a *Verticillium dahliae* phytotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1207, n. 1, p. 24–30, 1994.

EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. **Enzyme assays: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 259-268.

EL-SHEMY, H. A.; ABOUL-ENEIN, A. M.; ABOUL-ENEIN, K. M.; FUJITA, K. Willow leaves' extracts contain anti-tumor agents effective against three cell types. **PLoS ONE**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2007.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, n. 1, p. 1-7, 2002.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. 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.; BERGAMO, D. C. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445-450, 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.

FUSS, E. Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, p. 307-320, 2003.

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.

- GHISALBERTI, E. L. Cardiovascular activity of natural occurring lignans. **Phytomedicon**, v. 4, p. 151-166, 1997.
- GIESBRECH, A. M.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. (2E, 4E)-N-Isobutyl-9-piperonyl-nona-2,4-dienoic amide from *Ottonia anisum*. **Planta Medica**, v. 43, p. 375-377, 1981.
- GOTTLIEB O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1537-1570, 1972.
- GOTTLIEB, O. R. Neolignans. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 35, p. 1-72, 1978.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v. 89, p. 51-55, 1993.
- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química da neolignanas. **Química Nova**, v. 7, p. 250-273, 1984.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.
- GURIB-FAKIM, A. Constituents of the essential oils from *Piper sylvestre* growing in Mauritius. **Planta Medica**, v. 60, p. 376-377, 1994.
- GUNSTONE, F. D.; POLLARD, M. R.; SCRIMGEOUR, C. M.; VEDANAYAGAM, H. S. Fatty acids. Part 50. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of olefinic fatty acids and esters. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 18, p. 115-129, 1977.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347-369, 1989.
- 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.
- HAWORTH, R. D. Natural resins. **Annual Reports on the Progress of Chemistry**, v. 33, p. 266-279, 1936.
- HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages as trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 244, n. 1, p. 69-74, 1966.
- HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. **Protein electrophoresis: applications guide**. San Francisco, 1994.
- HRANUELI, D.; PERI, N.; BOROVI, B.; BOGDAN, S.; CULLUM, J.; WATERMAN, P. G.; HUNTER, I. S. Molecular biology of polyketide biosynthesis: polyketide biosynthesis. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 203-213, 2001.
- 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 perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 403-416, 2004.

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.

JONES, H. D. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

KIM, S. H.; KRONSTAD, J. W.; ELLIS, B. E. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 351-357, 1996.

KNAGGS, A. R. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 334-355, 2001.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Defense responses of plants to pathogens. **Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology**, v. 21, p. 1-34, 1995.

KOUKOL, J.; CONN, E. E. Metabolism of aromatic compounds in higher plants. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 236, n. 10, p. 2692-2698, 1961.

KUO, Y-H.; LIN, S-T. Studies on chromium trioxide-based oxidative coupling reagents and synthesis of lignan-cagayonone. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 9, p. 1507-1512, 1993.

LAGO, J. G. L.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. M. C.; KATO, M. J. Benzoic Acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

LEE, K-H.; XIAO, Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, p. 341-362, 2003.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial biotransformation**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. Cap. 1, p. 11-32.

LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. *In vitro* activity of tetrahydrofuran neolignans against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, n. 3, p. 667-669, 1998.

MacRAE, W. D.; TOEERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1207-1220, 1984.

- MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, v. 10, p. 200-204, 1987.
- MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.
- MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of arabidopsis to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, v. 8, n. 2, p. 203-212, 1996.
- 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.
- McCREDIE, R. S.; RITCHIE, E.; TAYLOR, W. C. Constituents of *Eupomatia* species. The structure and synthesis of eupomatene, a lignan of novel type from *Eupomatia laurina* R. Br. Aust. **Journal of Chemistry**, v. 22, p. 1011-1032, 1969.
- MERRIL, C. R.; GOLDMAN, D.; KEUREN, M. L. Gel protein stains: silver stain. In: JAKOBY, W. B. (Ed.). **Methods in enzymology**: enzyme purification and related techniques. San Diego: Academic Press, 1984. v. 104, p. 441-451.
- MONACHE, F. D.; COMPAGNONE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1097-1098, 1996.
- MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 282-286, 2005.
- MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans: IUPAC recommendations 2000. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1493-1523, 2000.
- MUSTARD, M. J. Comparison of stem structure in Florida grown *Peperomia*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 99, p. 234-237, 1986.
- NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.
- NAVICKIENE, H. M. D. **Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper tuberculatum***. 2002. 233 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2002.
- NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, p. 409-415, 2003.
- NEISH, A. C. Coumarins, phenylpropanes, and lignin. In: BONNER, J.; VARNER, J. E. (Ed.). **Plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1965. Cap. 23, p. 581-617.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

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

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal Biogeography**, v. 33, p. 1266-1278, 2006.

RAVINDRAN, P. N. **Black pepper: *Piper nigrum***. Delhi: CRC Press, 2000. p. 1.

RETTIG, M.; SIGRIST, A.; RÉTEY, J. Mimicking the reaction of phenylalanine ammonia-lyase by a synthetic model. **Helvetica Chimica Acta**, v. 83, n. 9, p. 2246-2265, 2000.

ROBINSON, J. A. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 332, p. 107-114, 1991.

ROYER, G. P. **Fundamentals of enzymology**: rate enhancement, specificity, control and applications. New York: John Wiley and Sons, 1982. Cap. 1, p. 1.

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

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins**: occurrence, formation, structure and reactions. New York: Willey-Interscience, 1972.

SARMA, A. D.; SHARMA, R. Purification and characterization of UV-B induced phenylalanine ammonia-lyase from rice seedlings. **Phytochemistry**, v. 50, p. 729-737, 1999.

SCOPES, R. K. **Protein purification**: principles and practice. New York: Springer-Verlag, 1987.

SEERAM, N. P.; JACOBS, H.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1389-1391, 1998.

SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; McLEN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1-3-dione derivatives from *Peperomia proctoi*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 399-402, 2000.

SHAW, N. M.; BOLWELL, G. P.; SMITH, C. Wound-induced phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs. Significance of glycosylation and immunolocalization of enzyme subunits. **Biochemical Journal**, v. 267, p. 163-170, 1990.

SIBI, M. P.; JOHNSON, M. D.; PUNNIYAMURTHY, T. Enantioselective synthesis of peperomins A, C, D, and analogs – Examination of diastereoselective cuprate conjugate additions to *N*-enoyl-4-diphenylmethyl-2-oxazolidinones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 79, p. 1545-1555, 2001.

SILVA FILHO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. E.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; BASTOS, J. K. Tetrahydrofuran Lignans from *Nectandra megapota* with Trypanocidal Activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 42-45, 2004.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDIA, C. I.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 4th ed. New York : John Wiley, 1981. p. 205.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRG, 1999.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, 2004.

STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant cell and tissue culture**. New York: Open University Press, 1991. p. 122.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. Buffers: principles and practice. In: DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, p. 21-38.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. In: DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, p. 50-68.

TAKEMORI, N. K.; BONA, C.; ALQUINI, Y. Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) – I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 387-394, 2003.

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

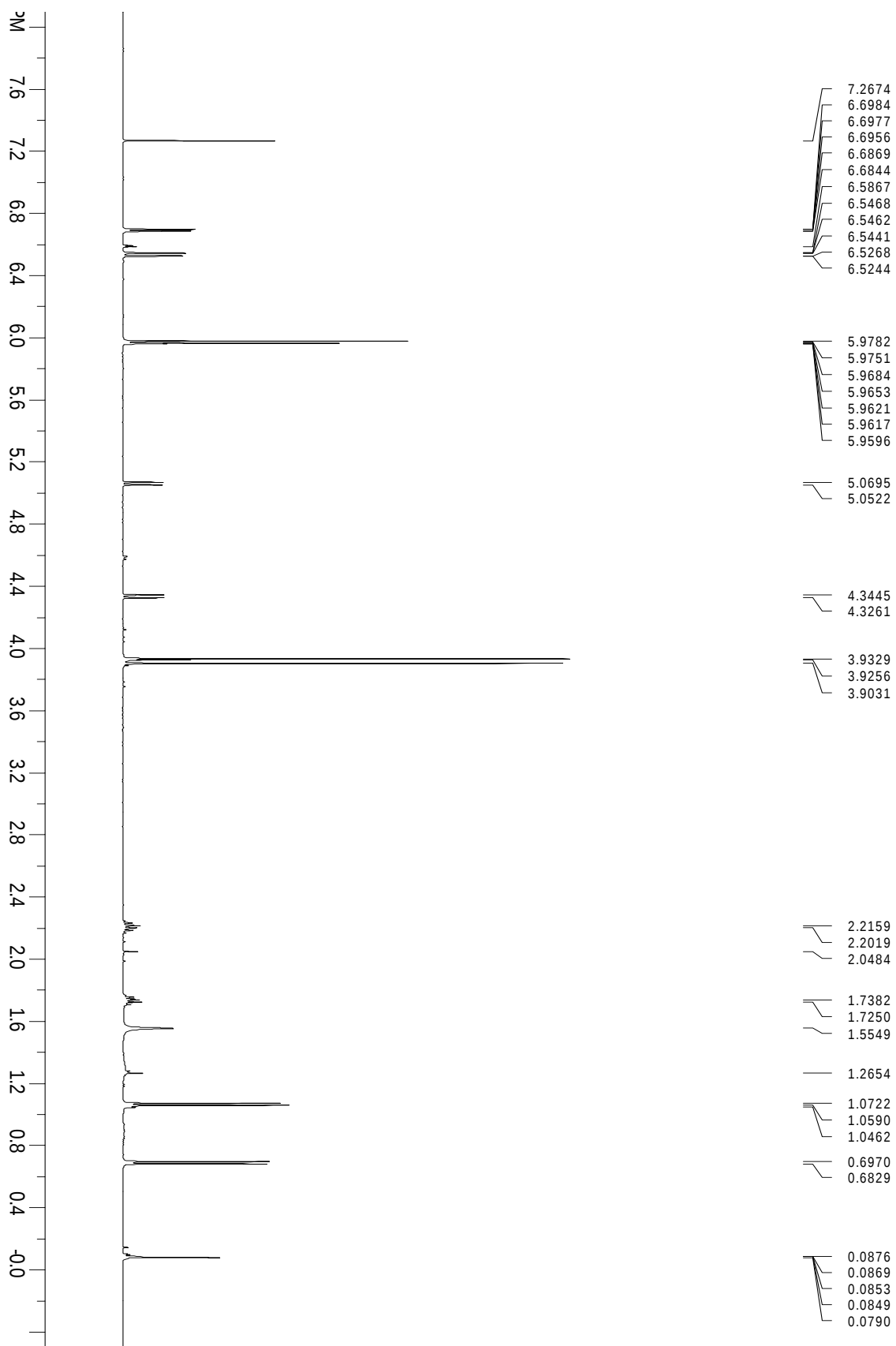
- TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Atheneu, 2007.
- TIRILLINI, B.; VELASQUEZ, E. R.; PELEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Planta Medica**, v. 62, p. 372-373, 1996.
- TYAGI, O. D.; JENSEN, S.; BOLL, P. M.; SHARMA, N. K.; BISHT, K. S.; PARMAR, V. S. Lignans and neolignans from *Piper schmidii*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 445-448, 1993.
- UMEZAWA, T. Biological activity and biosynthesis of lignans. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 42, n. 10, p. 911-915, 1996.
- UMEZAWA, T. Diversity in lignan biosynthesis. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 371-390, 2003.
- VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 492-496, 2006.
- 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.
- WARD, R. S. Lignans, neolignans and related compounds. **Natural Product Reports**, v. 6, p. 1207-1220, 1984.
- WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R. Phenylalanine ammonia-lyase from *Loblolly pine* – Purification of the enzyme and isolation of complementary-DNA Clones. **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p. 380-386, 1992.
- WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1656-1660, 2005.
- WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M.; TANG, W.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 790-794, 2006.

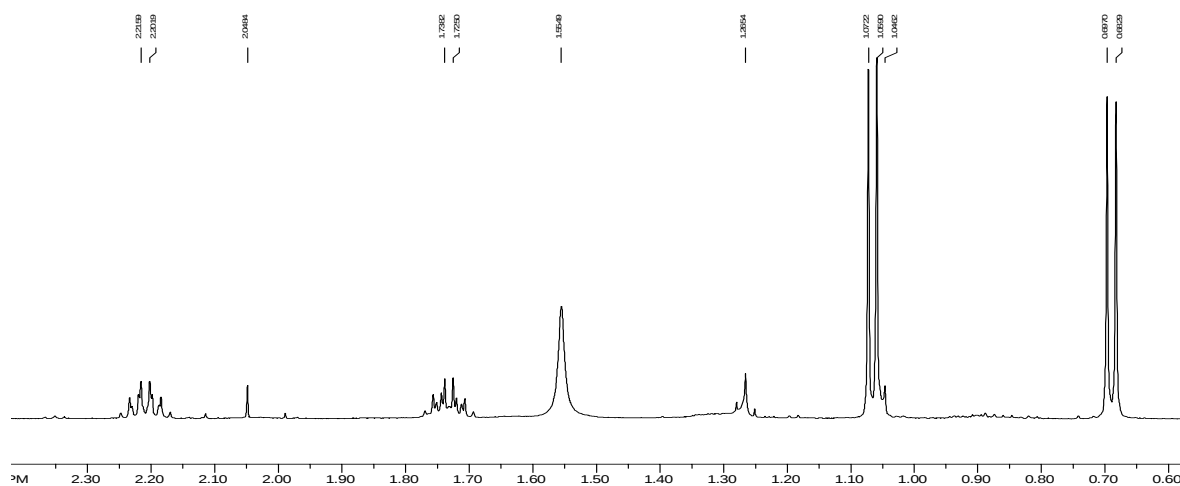
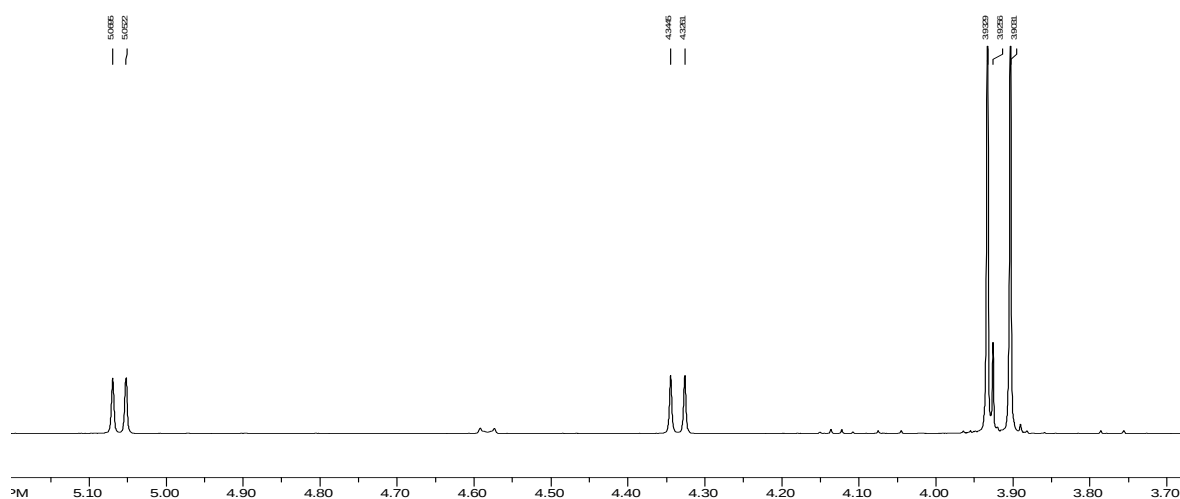
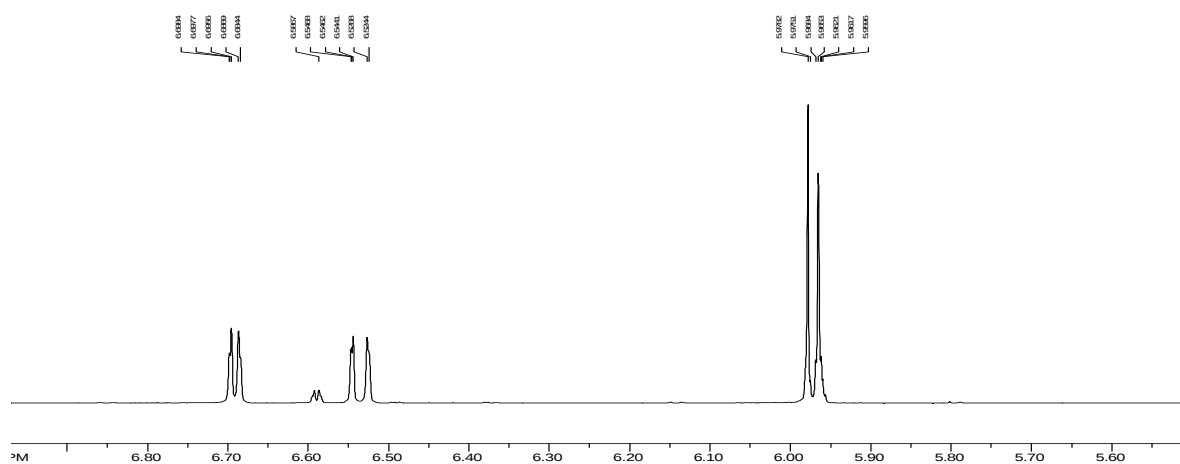
RESSALVA

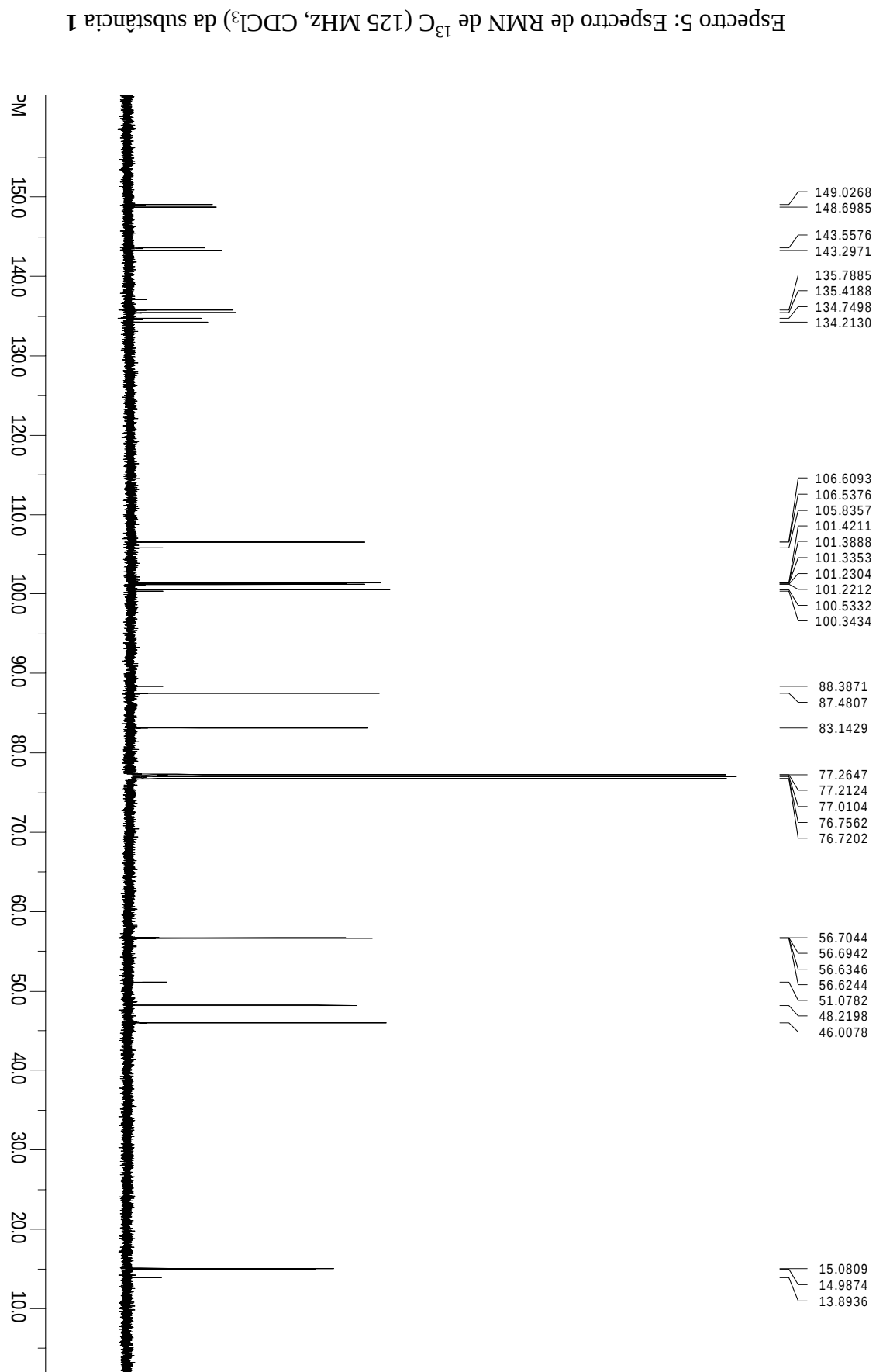
Devido ao tamanho do arquivo "Anexo" e das dificuldades decorrentes para exibição do mesmo na web, não pudemos inserí-lo e, aos interessados, favor entrar em contato com a autora, através do e-mail:
lidiane_ig@yahoo.com.br

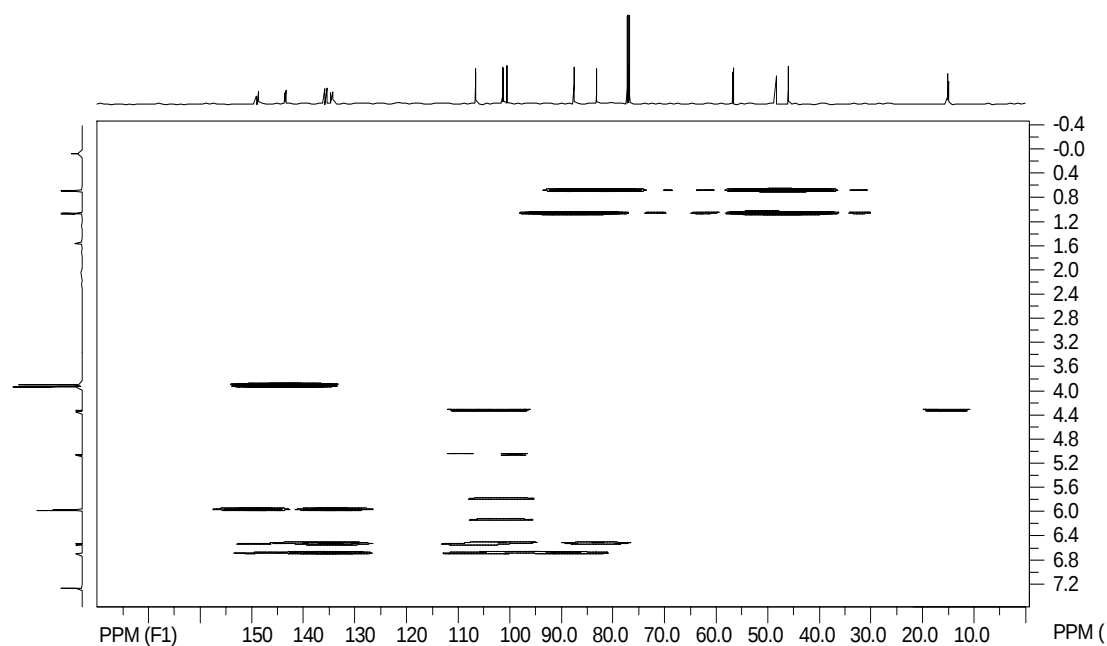
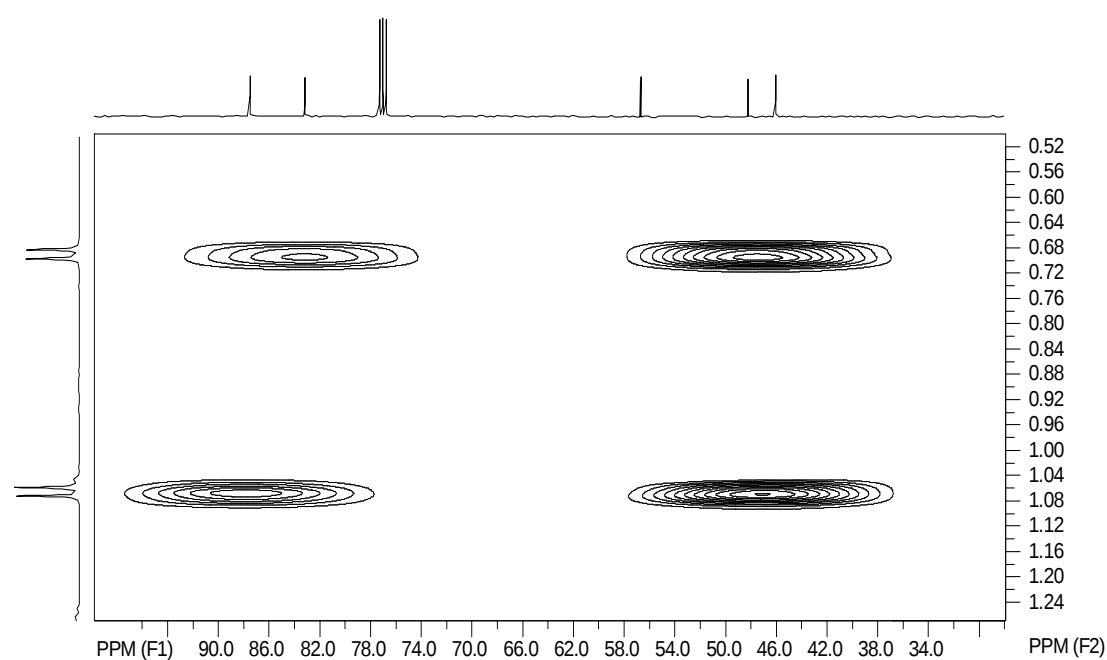
Equipe da C@thedra

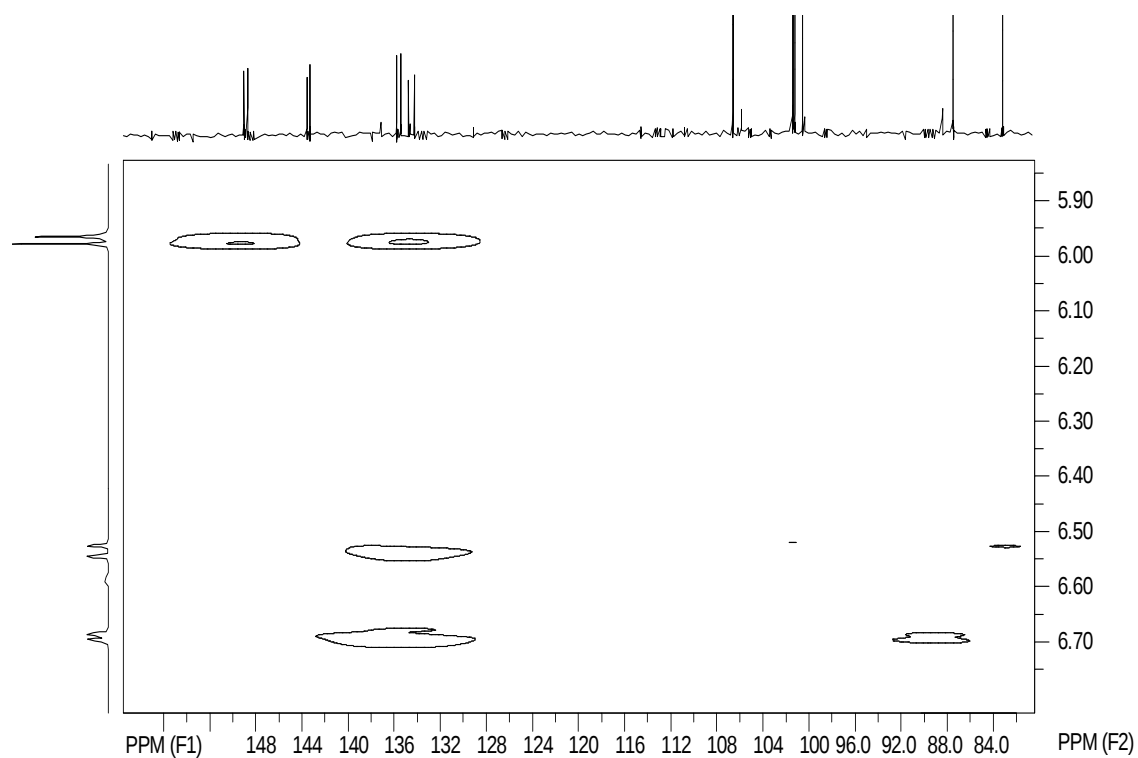
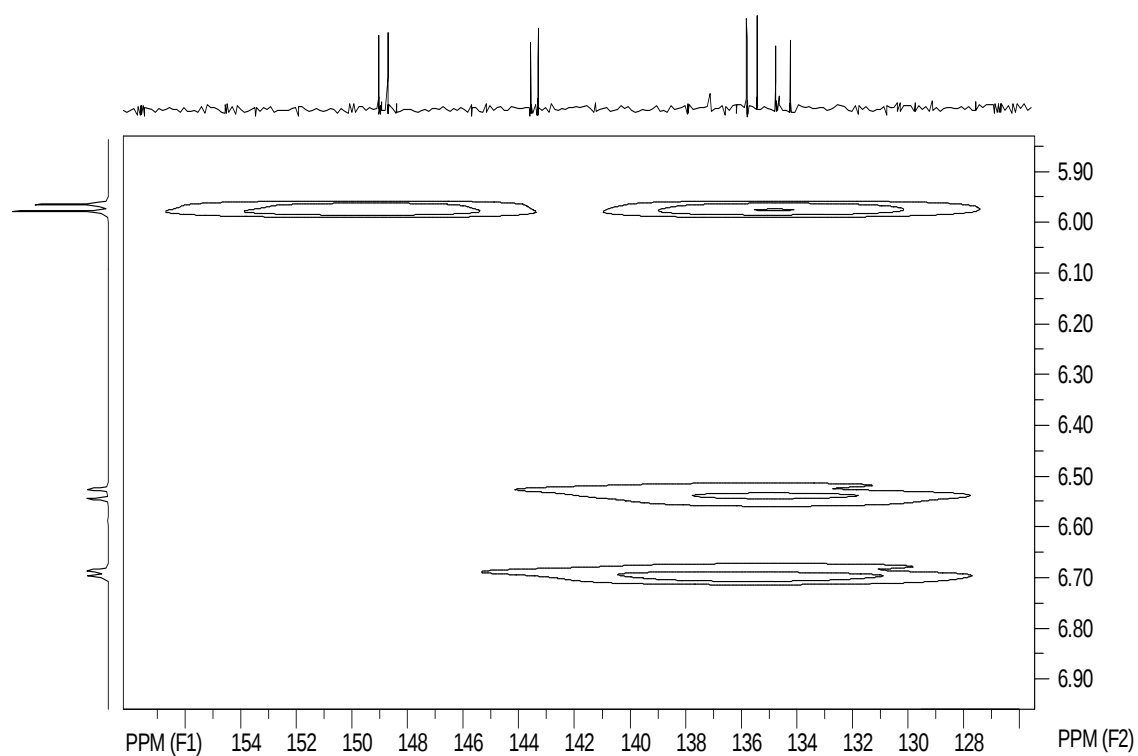
ANEXO I - ESPECTROS

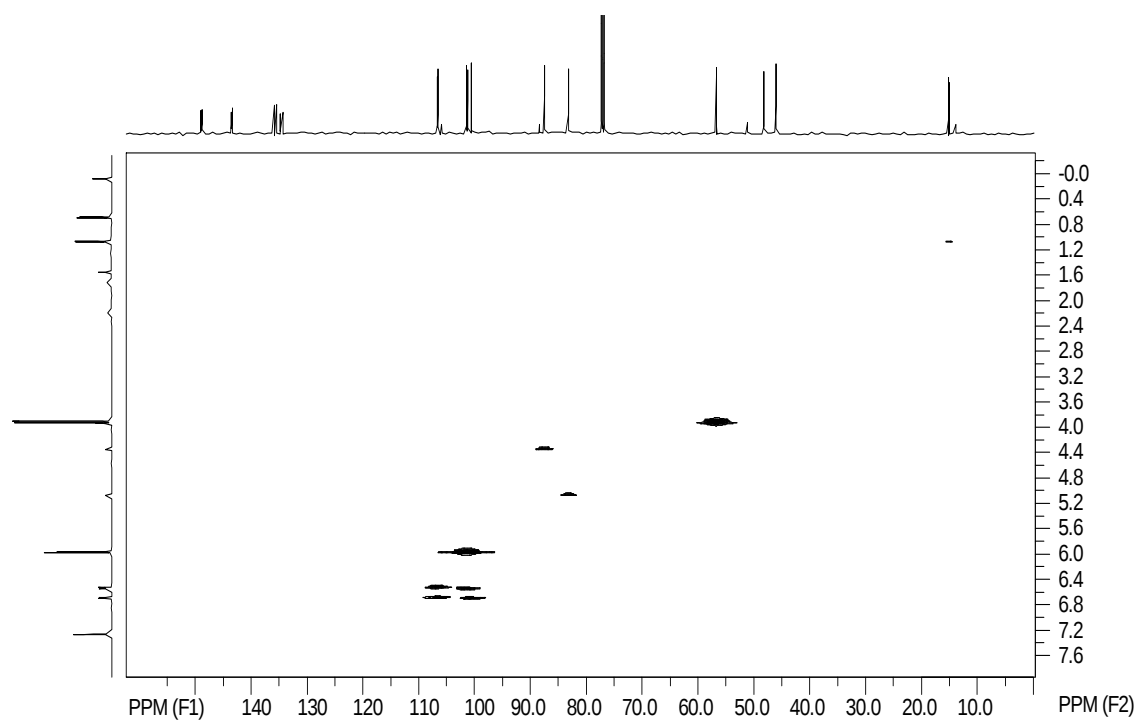
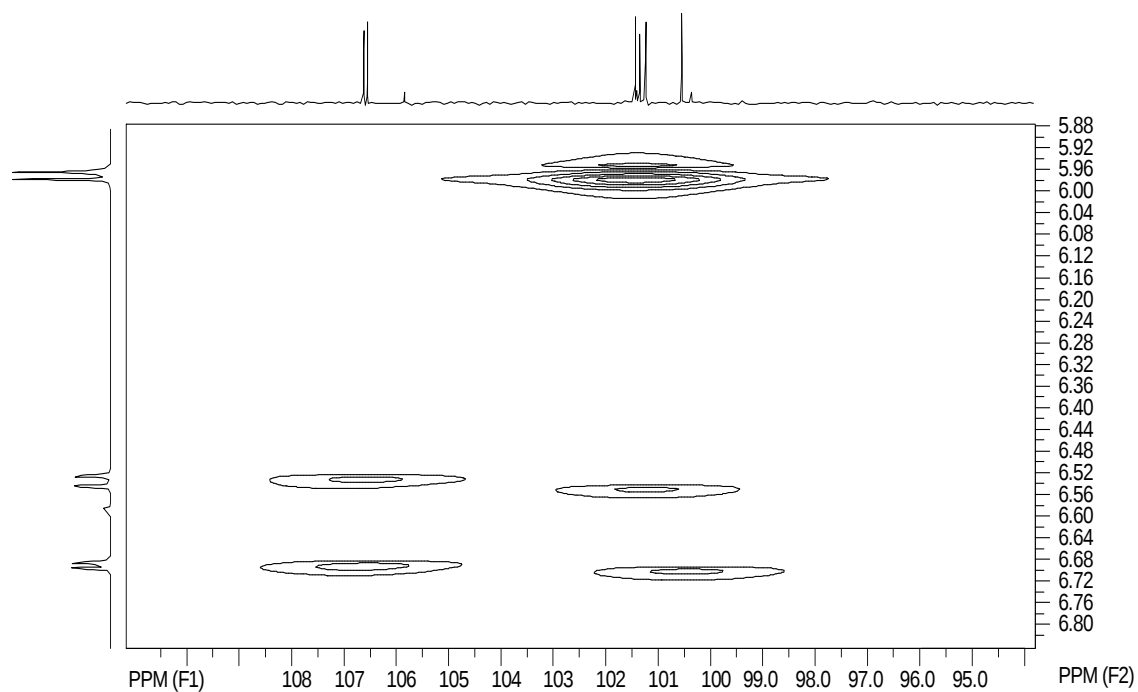


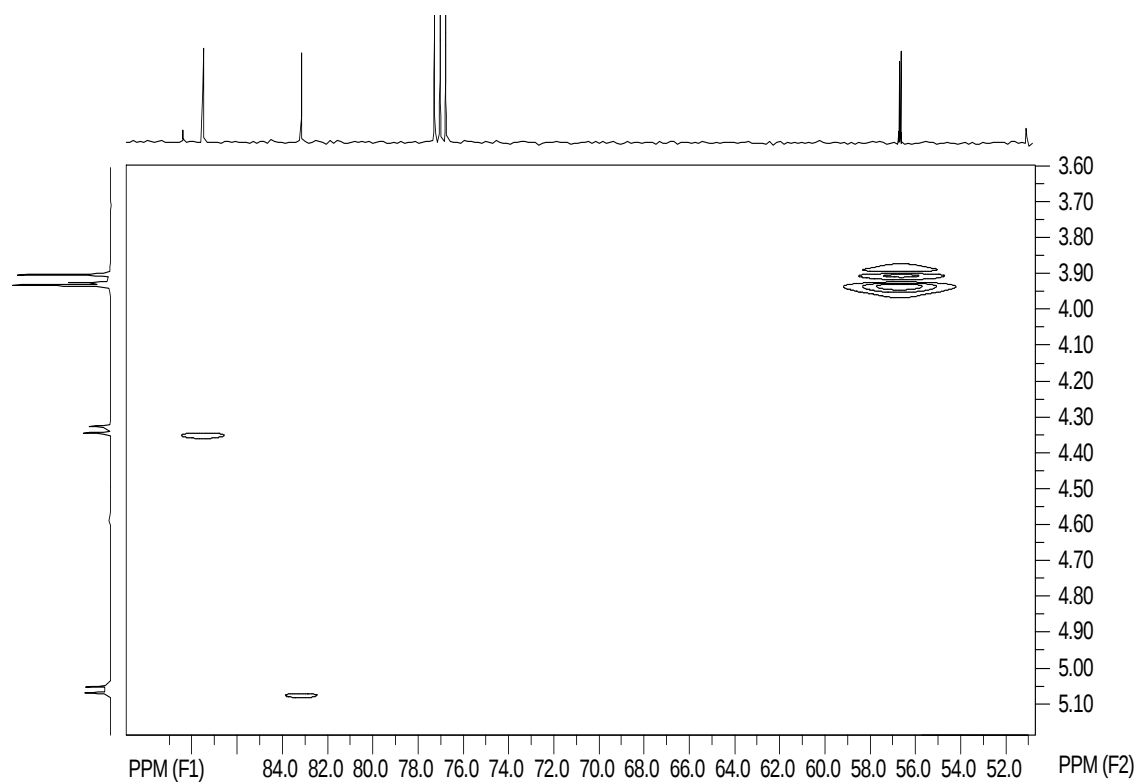
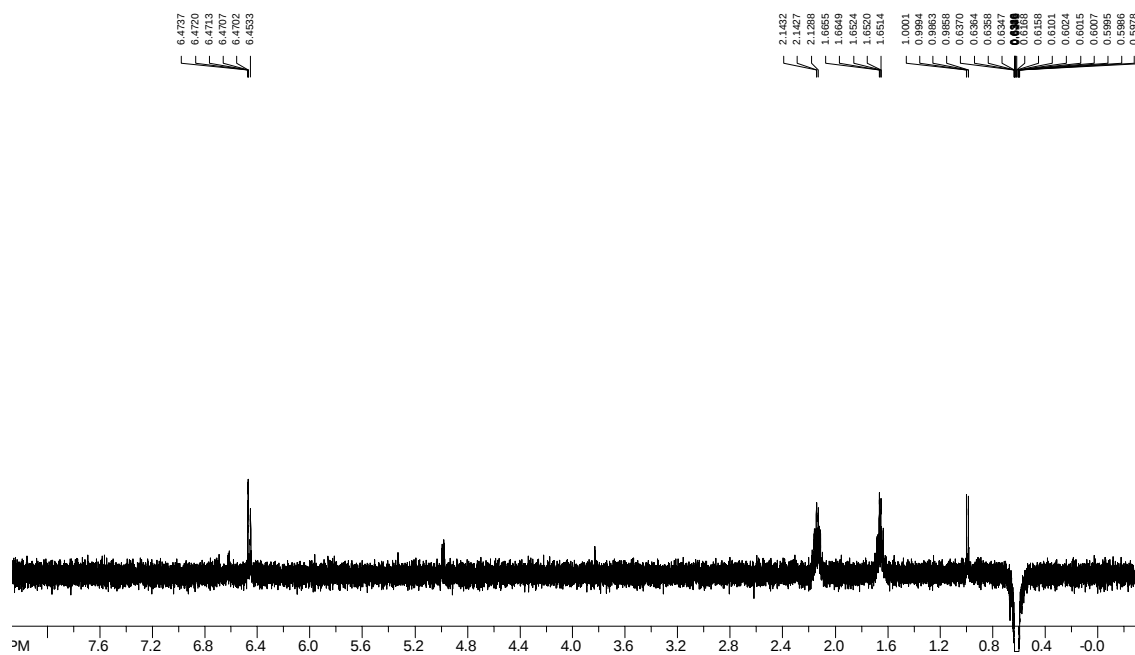
Espectro 2: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl₃) da substância **1** - expansãoEspectro 3: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl₃) da substância **1** – expansãoEspectro 4: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl₃) da substância **1** – expansão



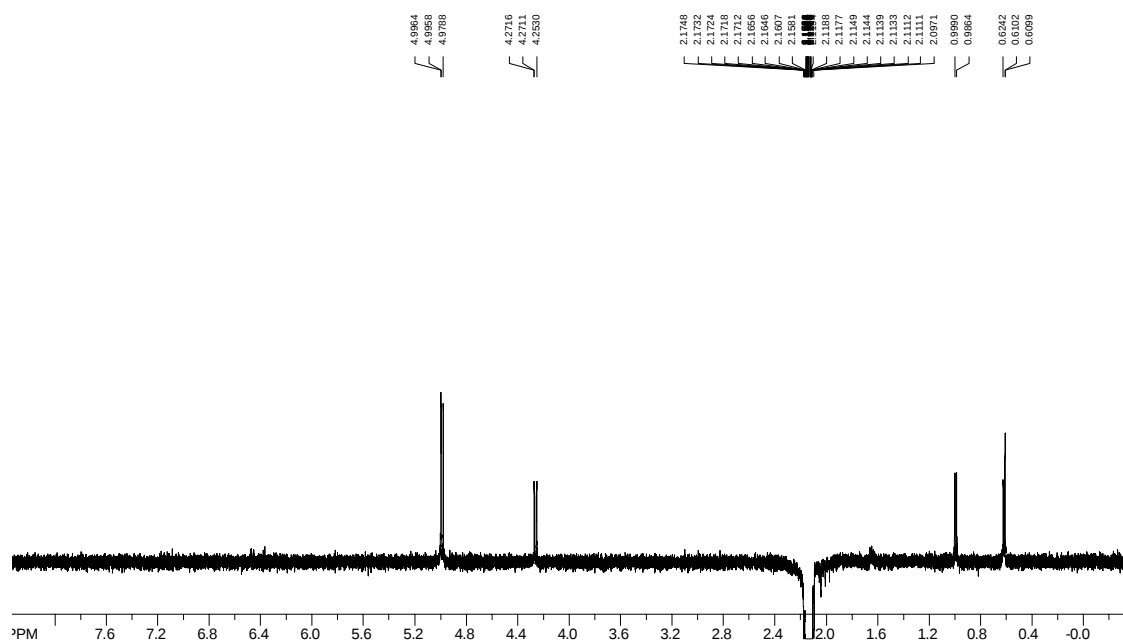
Espectro 6: Mapa de contorno gHMBC da substância **1**Espectro 7: Mapa de contorno gHMBC da substância **1** – expansão.

Espectro 8: Mapa de contorno gHMBC da substância **1** – expansão.Espectro 9: Mapa de contorno gHMBC da substância **1** – expansão.

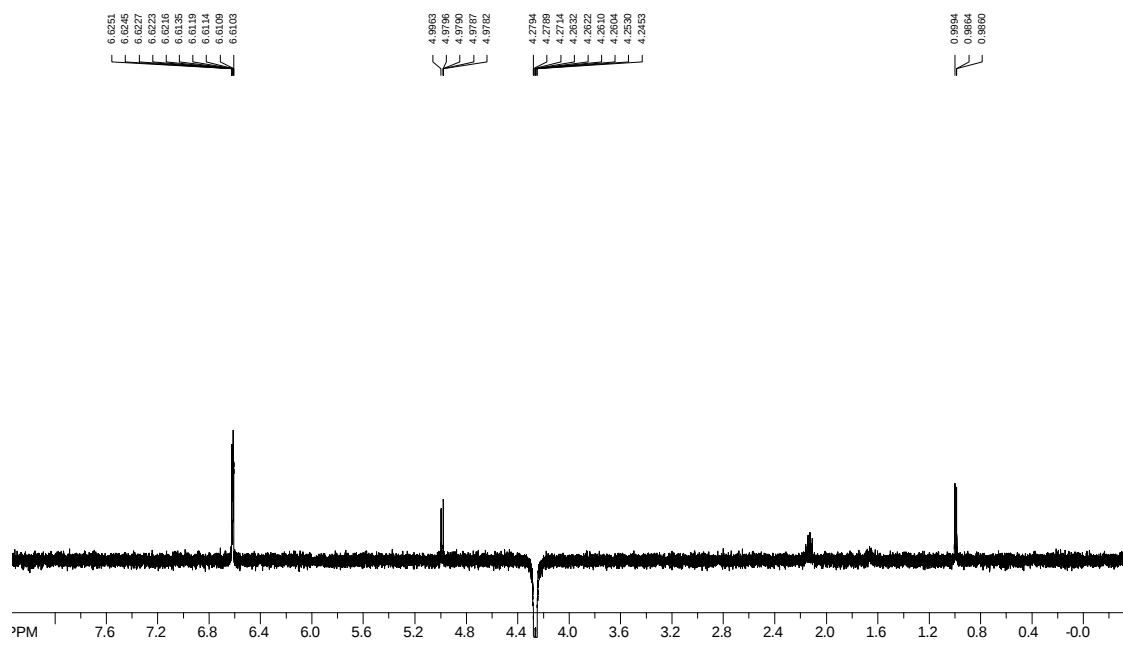
Espectro 10: Mapa de contorno gHMQC da substância **1**Espectro 11: Mapa de contorno gHMQC da substância **1** – expansão.

Espectro 12: Mapa de contorno gHMQC da substância **1** – expansão.Espectro 13: Experimento de NOESY 1D da substância **1**

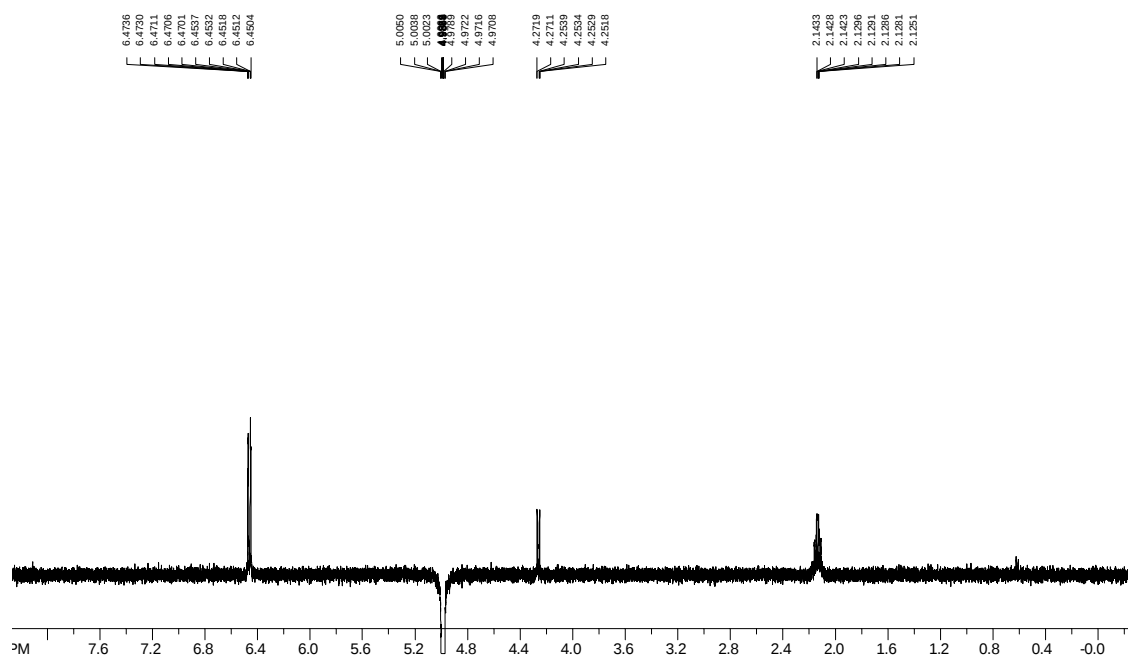




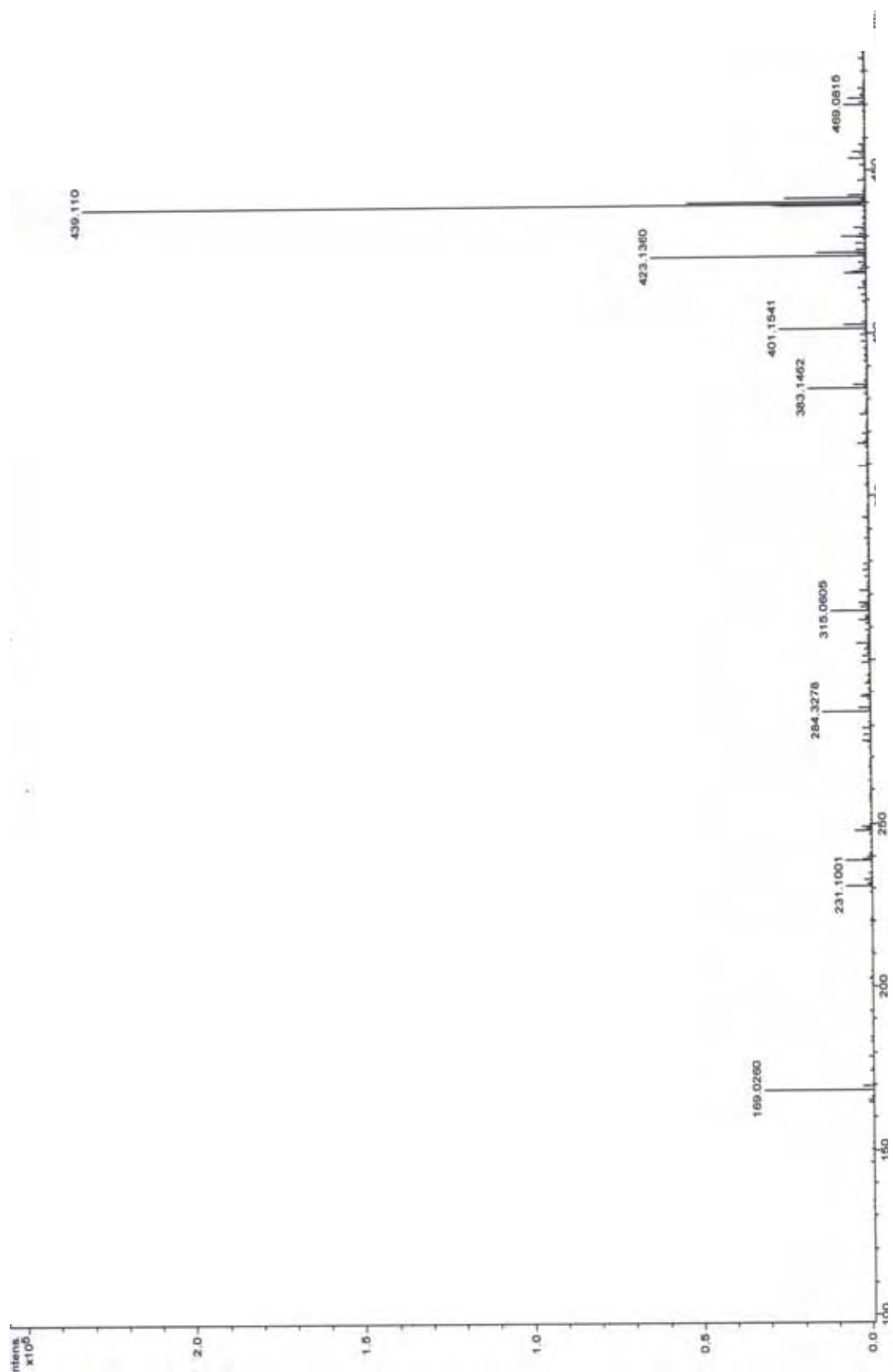
Espectro 16: Experimento de NOESY 1D da substância 1.



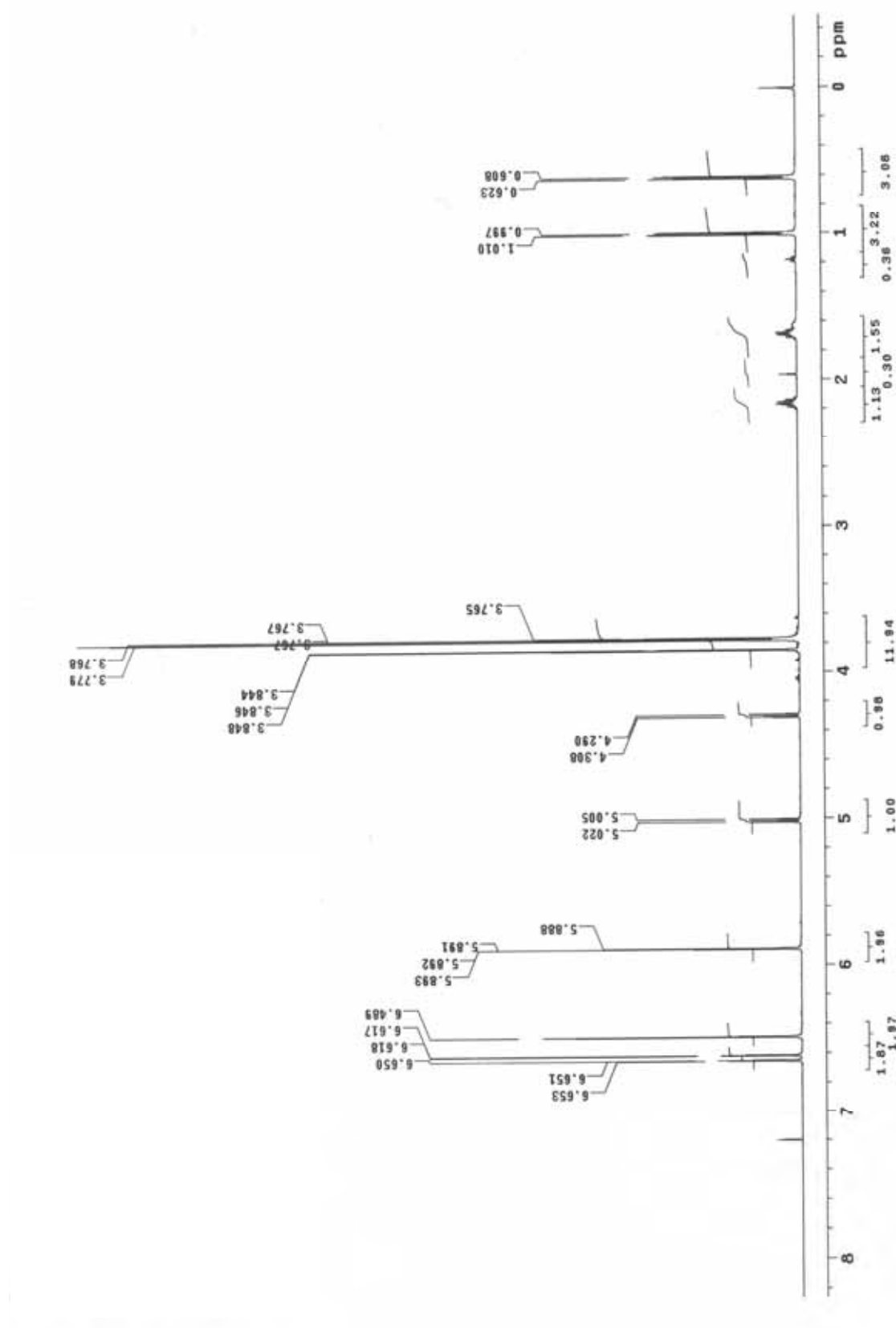
Espectro 17: Experimento de NOESY 1D da substância 1.

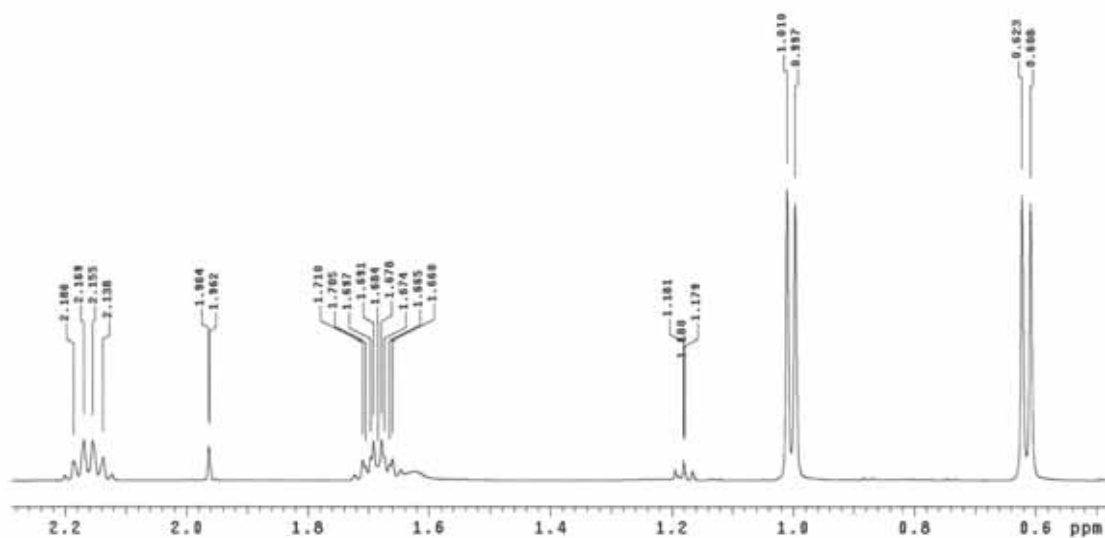


Espectro 18: Experimento de NOESY 1D da substância **1**.

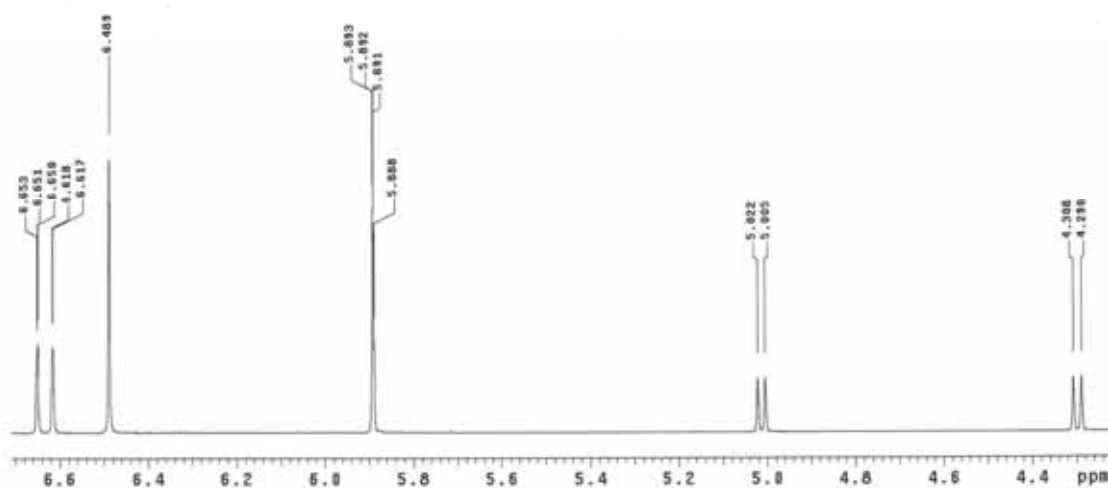


Espectro 19: Espectro de massas de alta resolução da substância 1

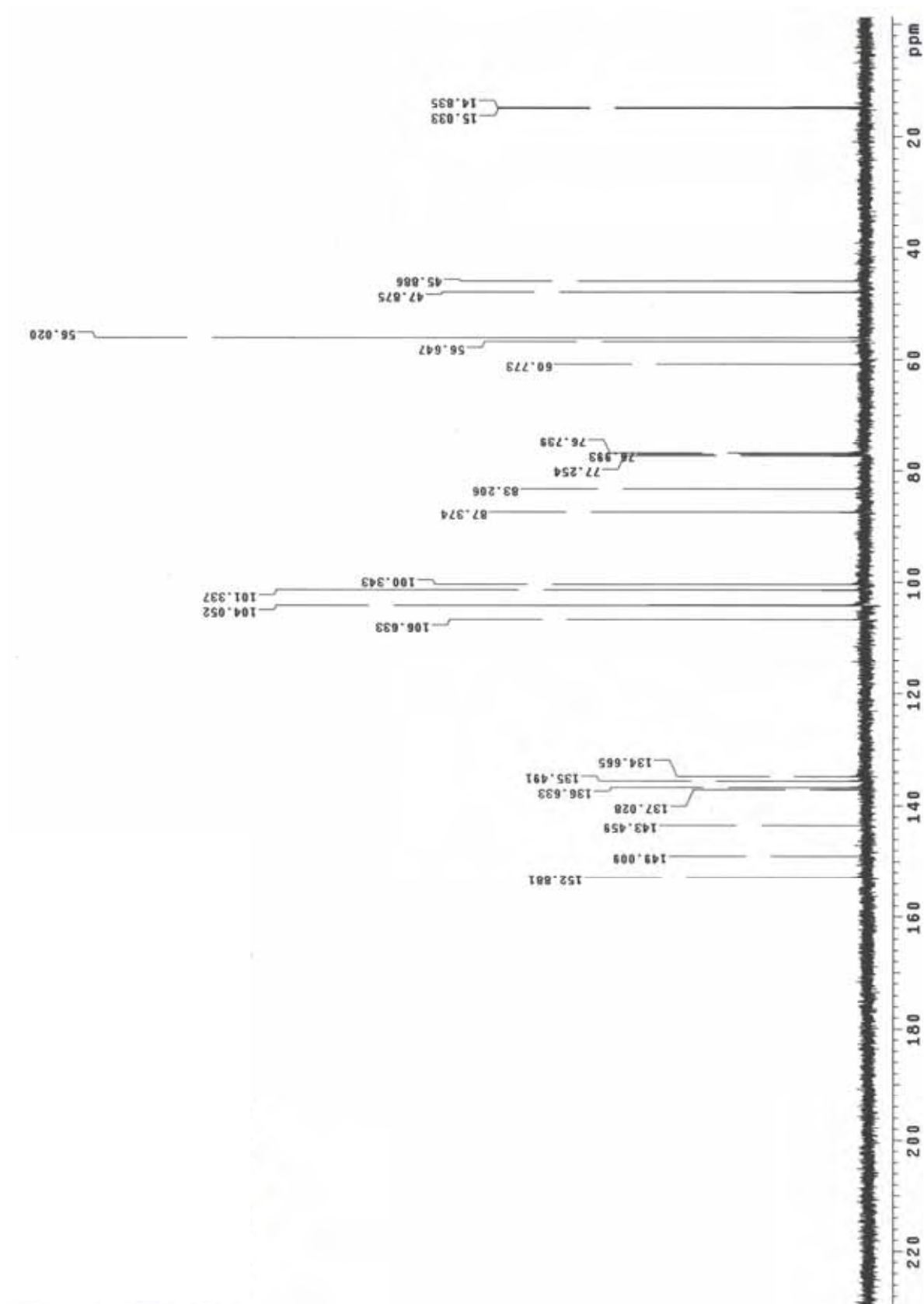
Espectro 20: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 2

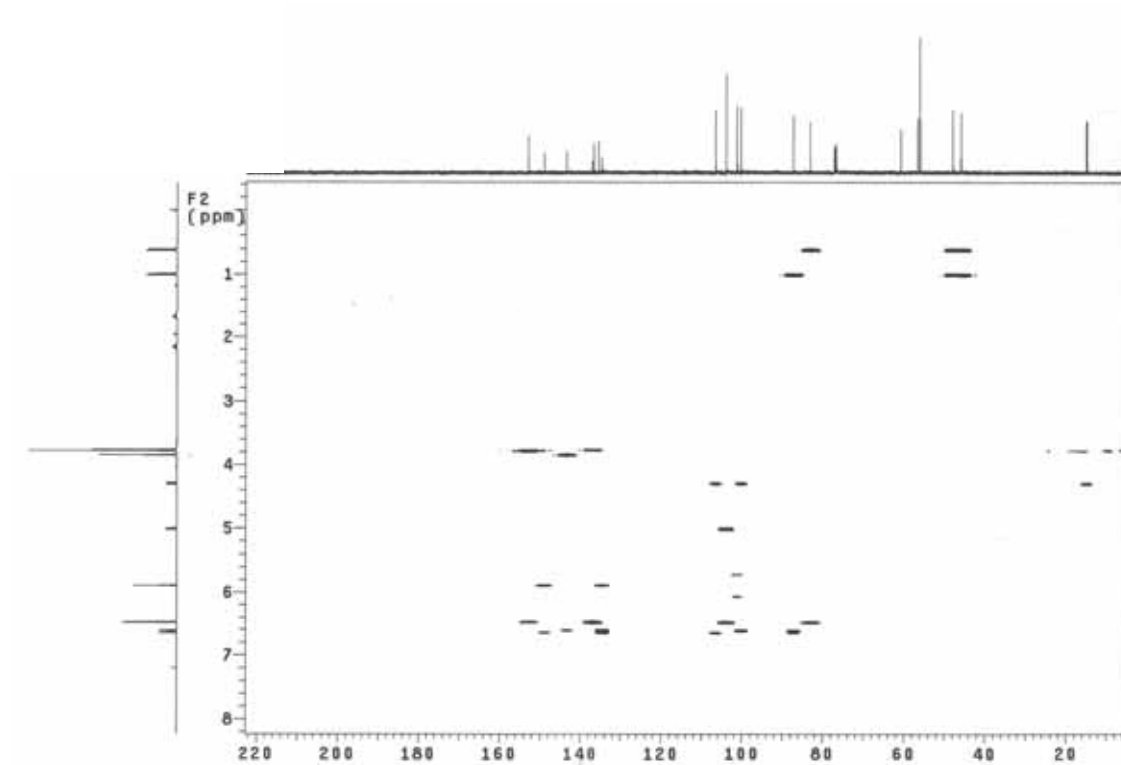


Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2** – expansão.

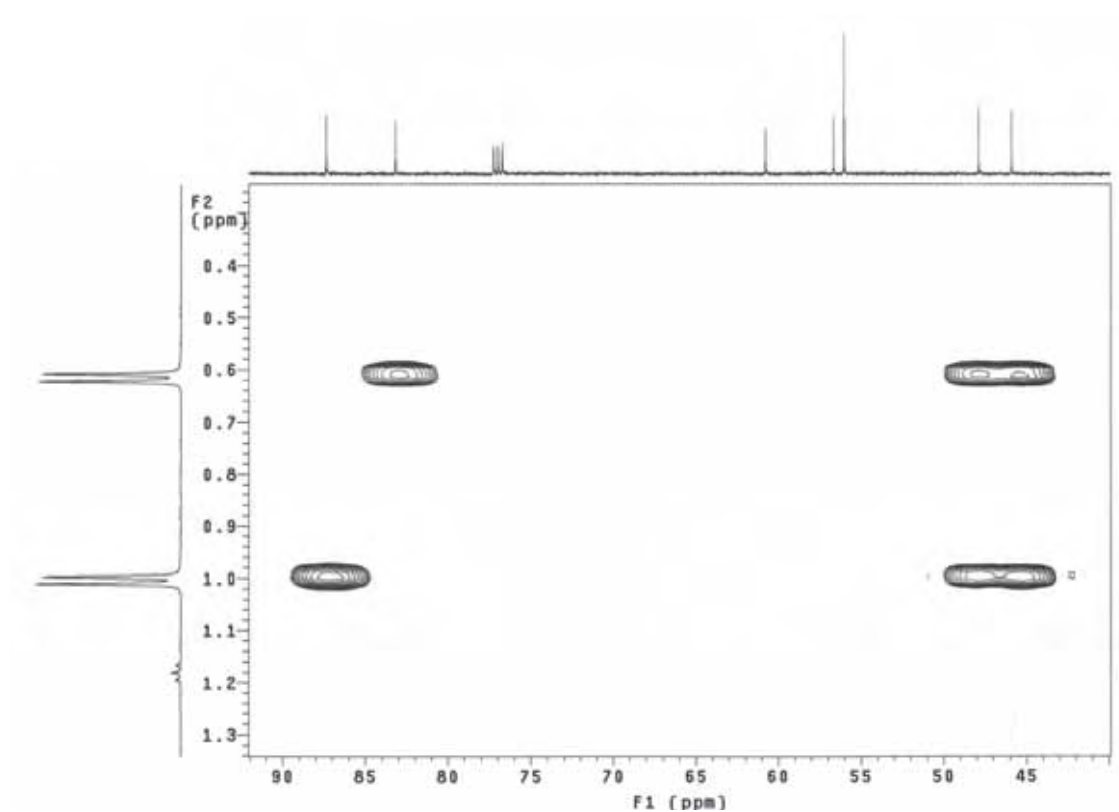


Espectro 22: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2** – expansão.

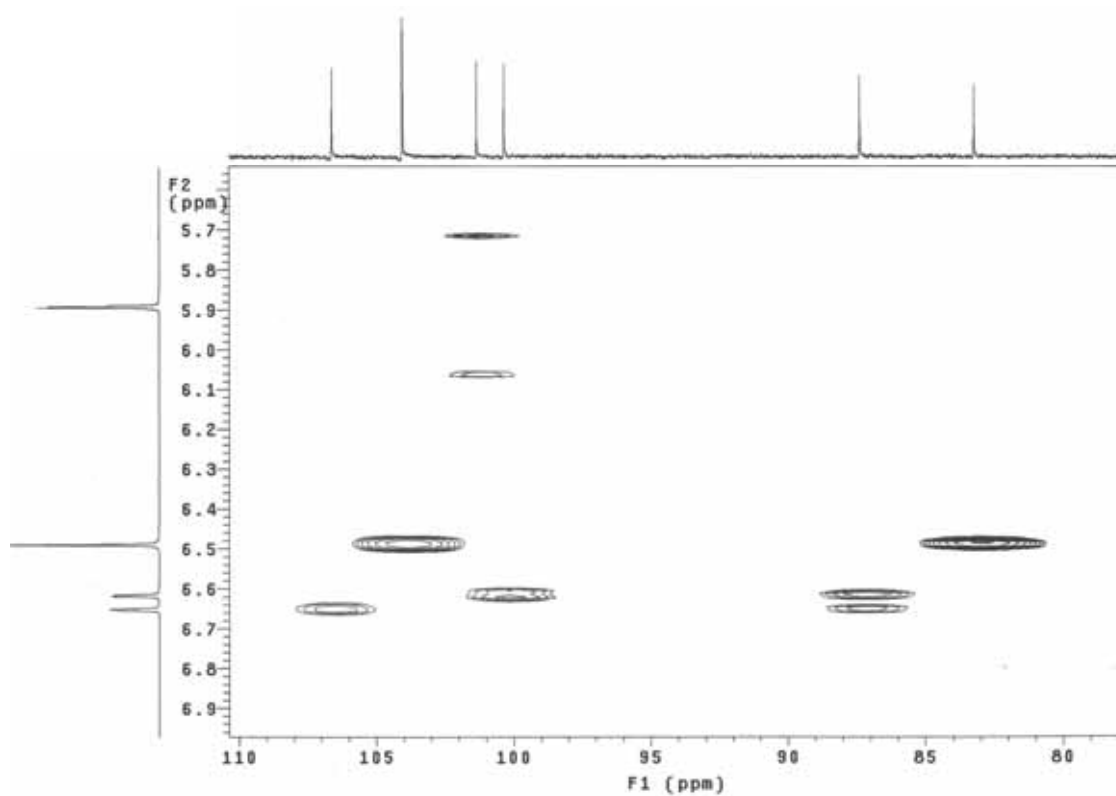
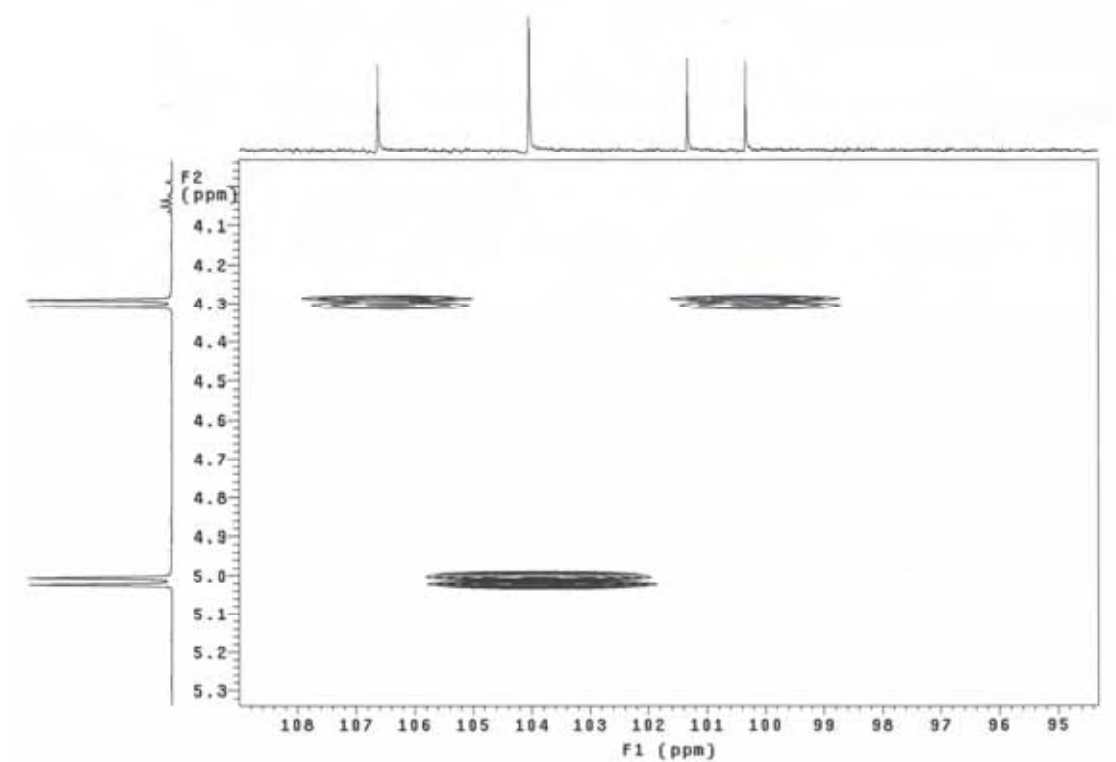
Espectro 23: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 2.

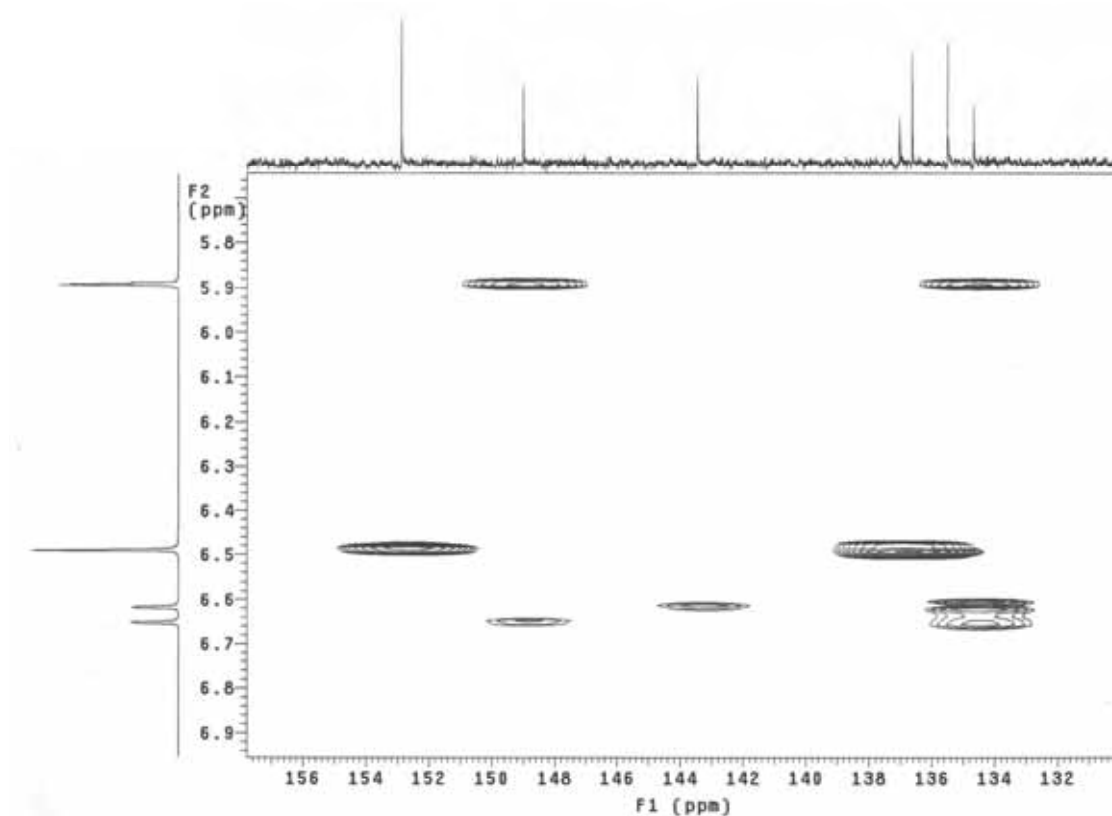
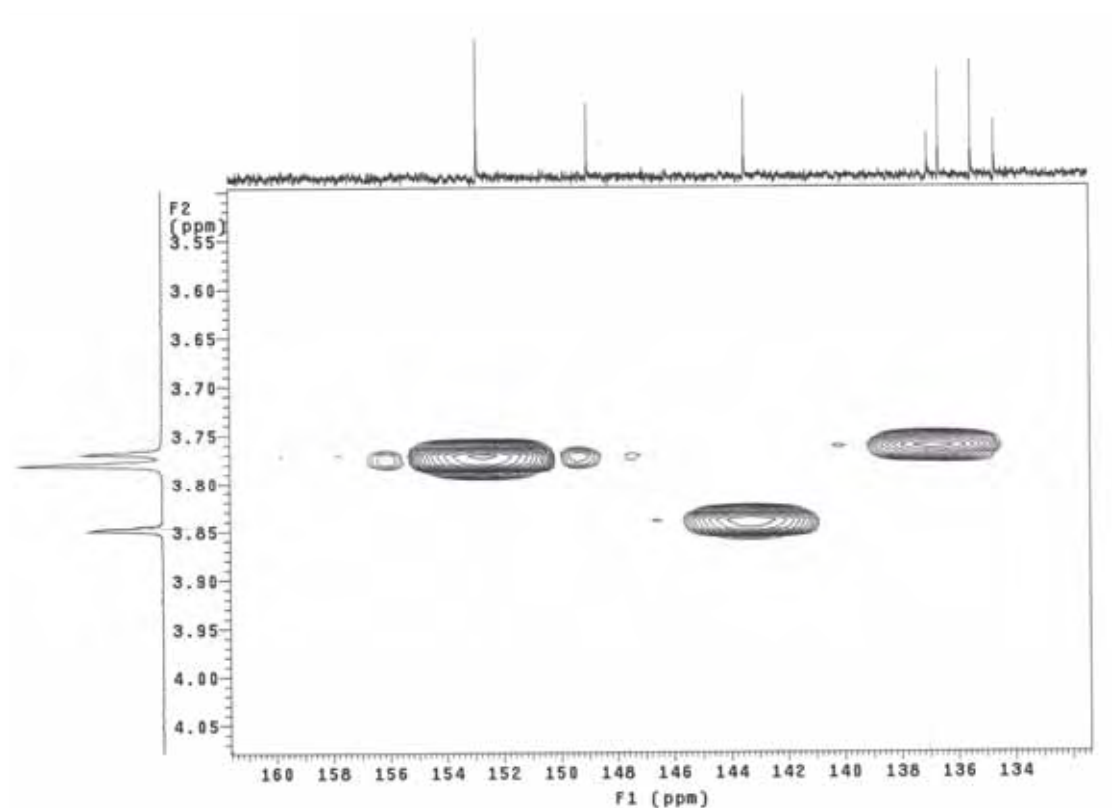


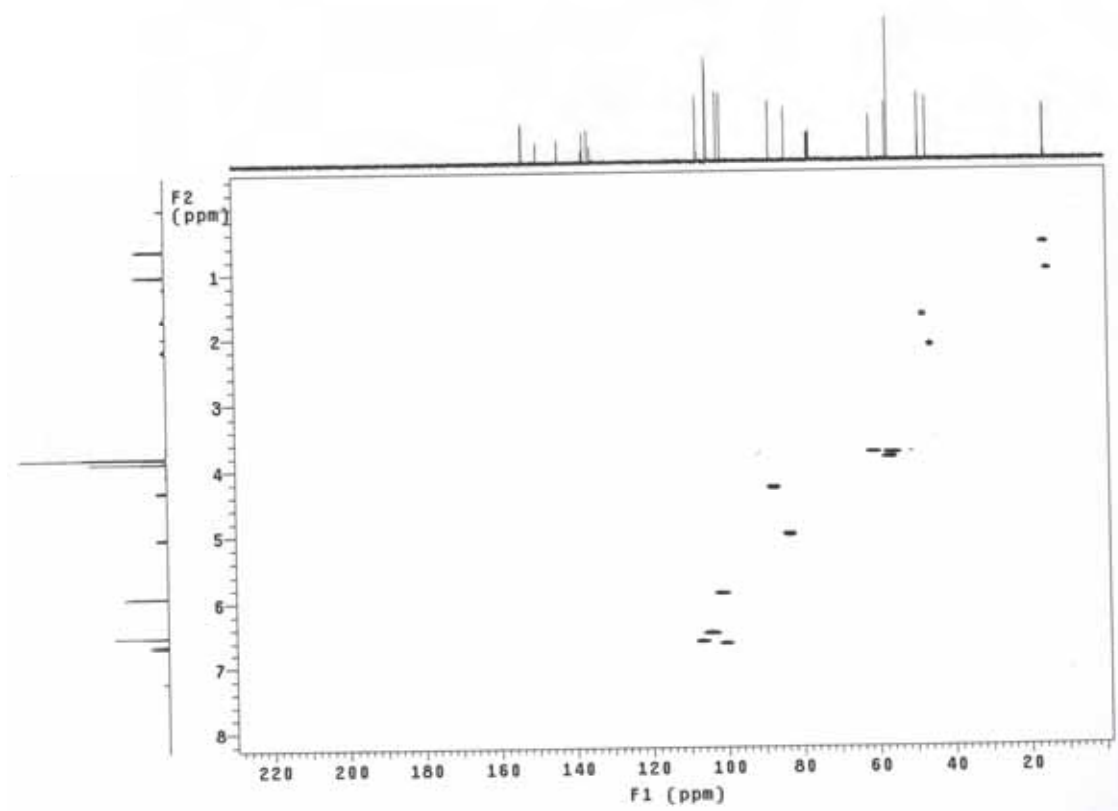
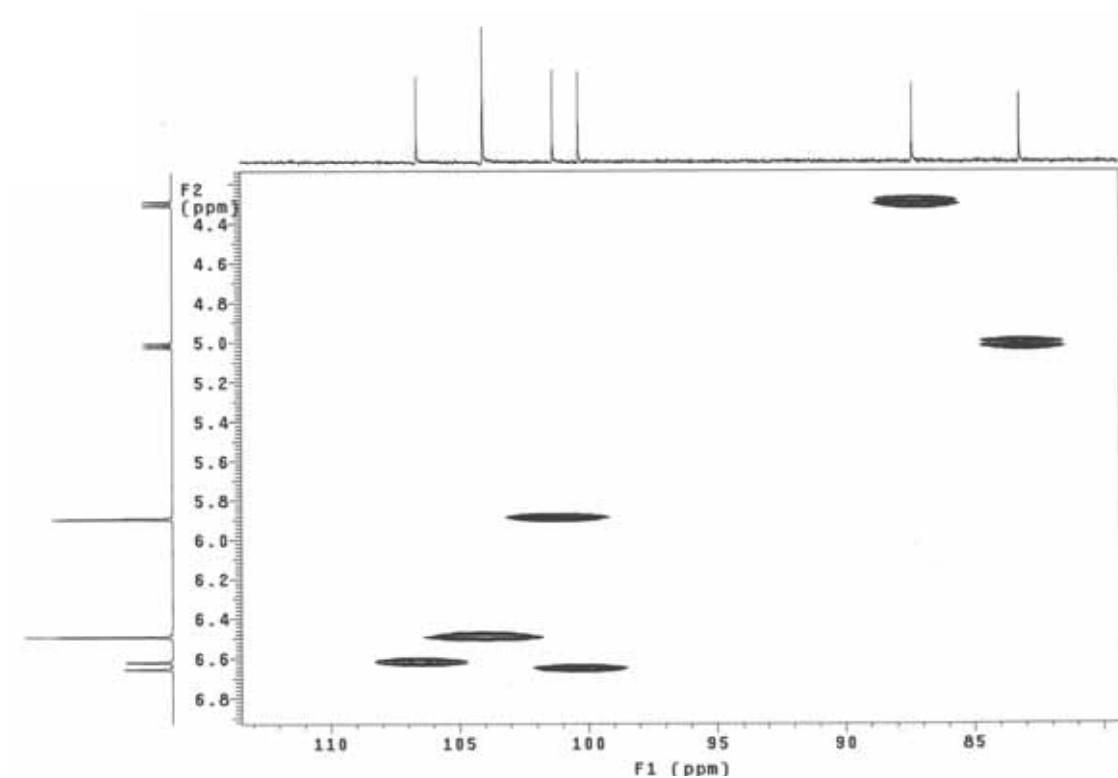
Espectro 24: Mapa de contorno gHMBC da substância 2.

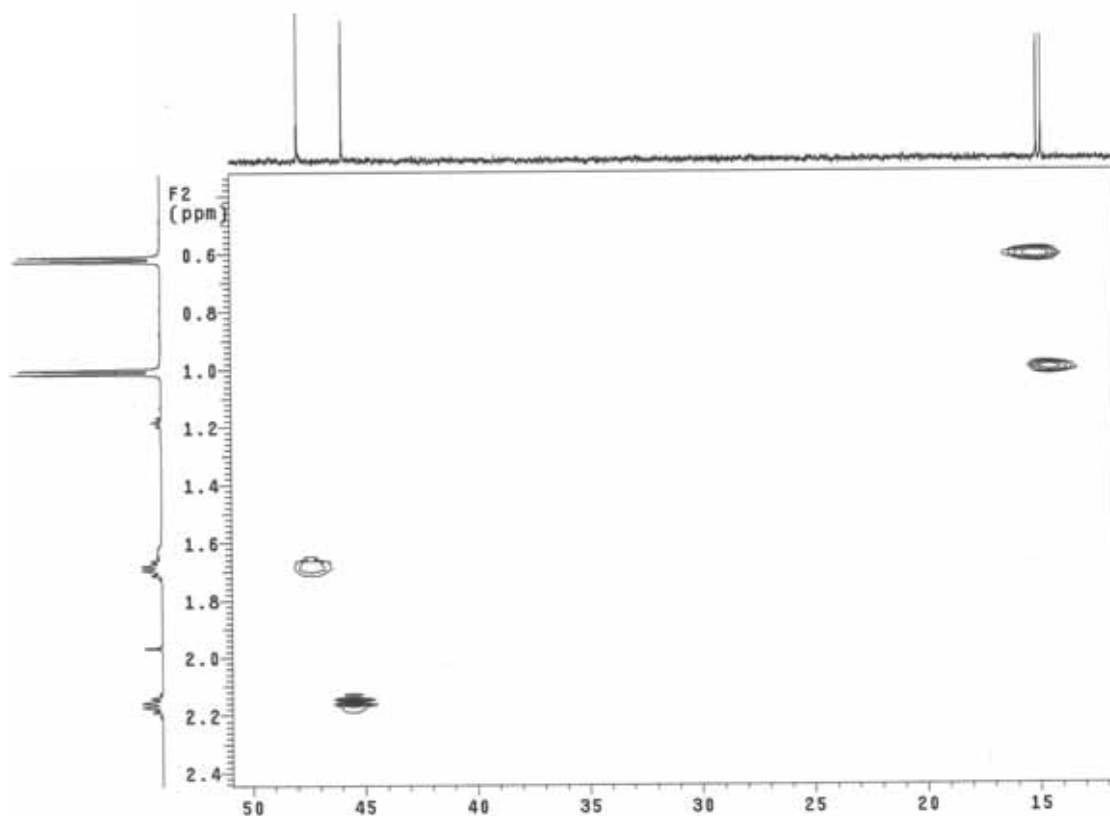


Espectro 25: Mapa de contorno gHMBC da substância 2 – expansão.

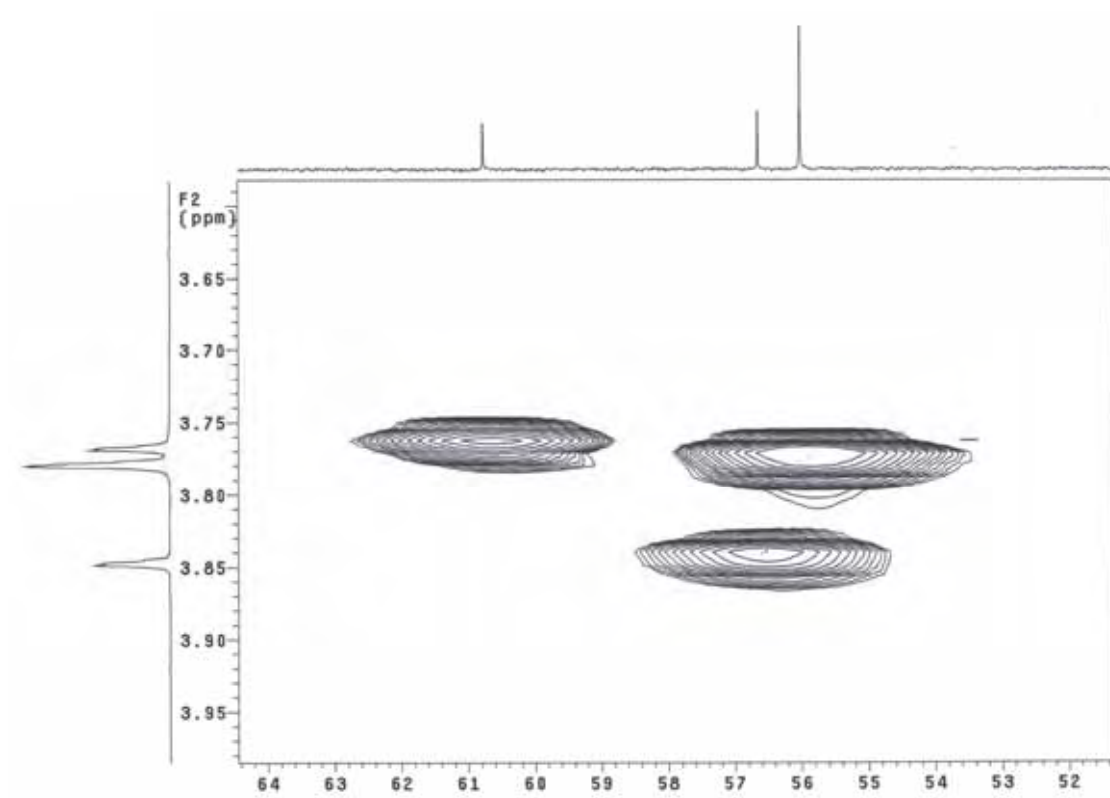
Espectro 26: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 2 – expansão.Espectro 27: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 2 – expansão.

Espectro 28: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 2 – expansão.Espectro 29: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 2 – expansão.

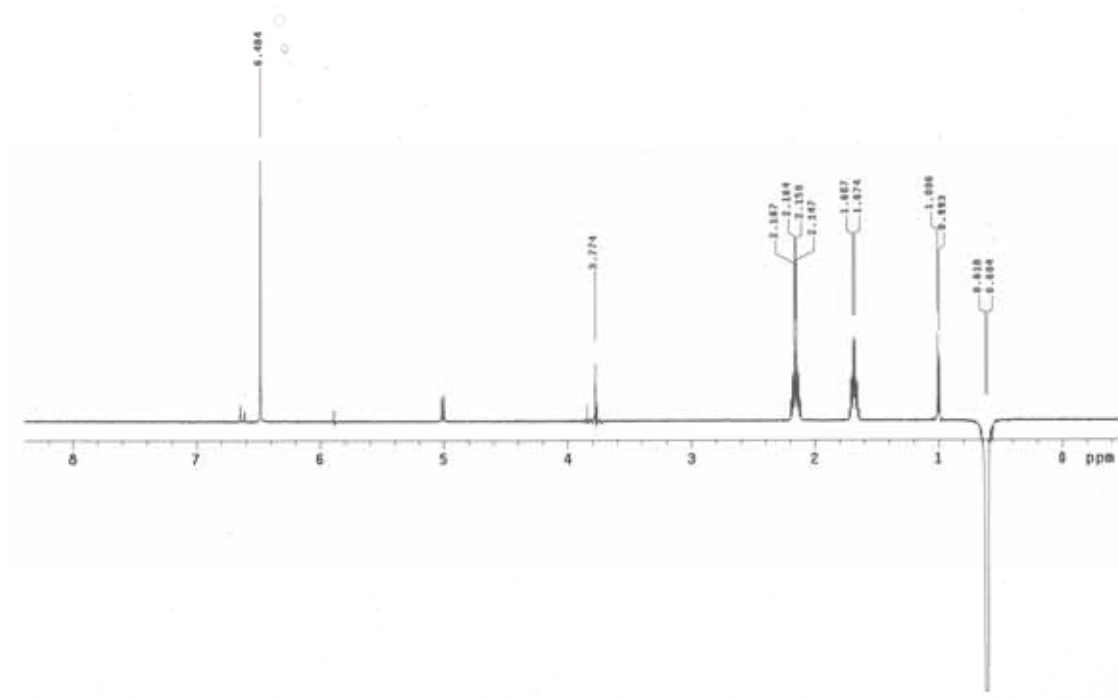
Espectro 30: Mapa de contorno *g*HMQC da substância 2.Espectro 31: Mapa de contorno *g*HMQC da substância 2 – expansão.



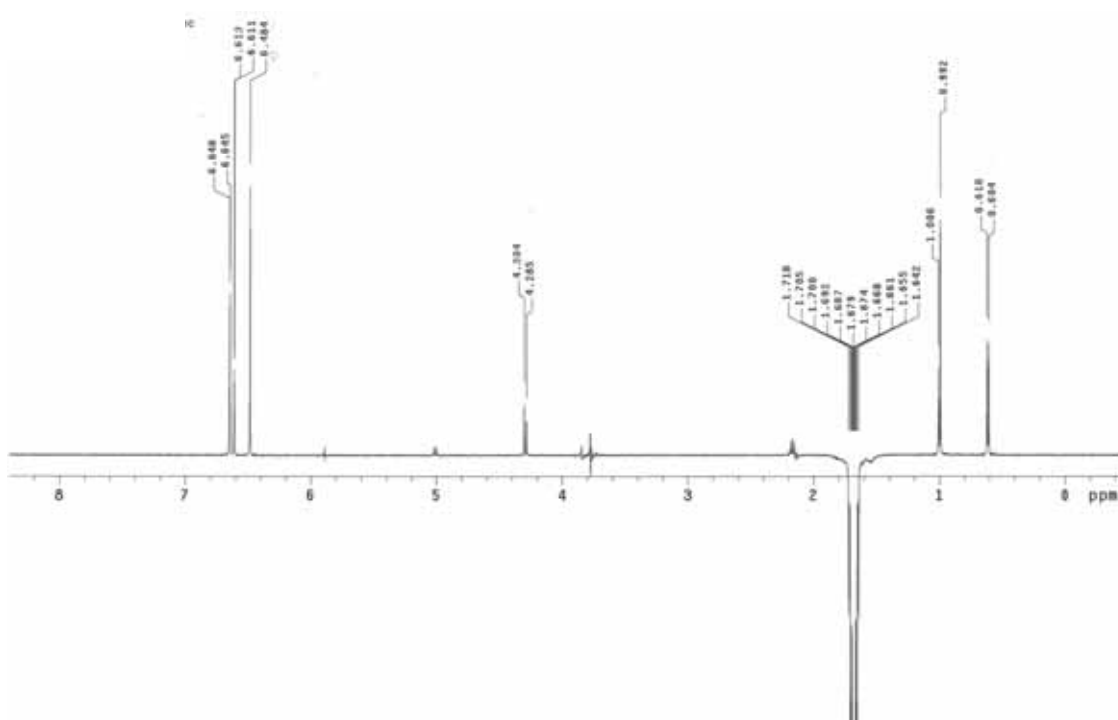
Espectro 32: Mapa de contorno gHMQC da substância 2 – expansão.



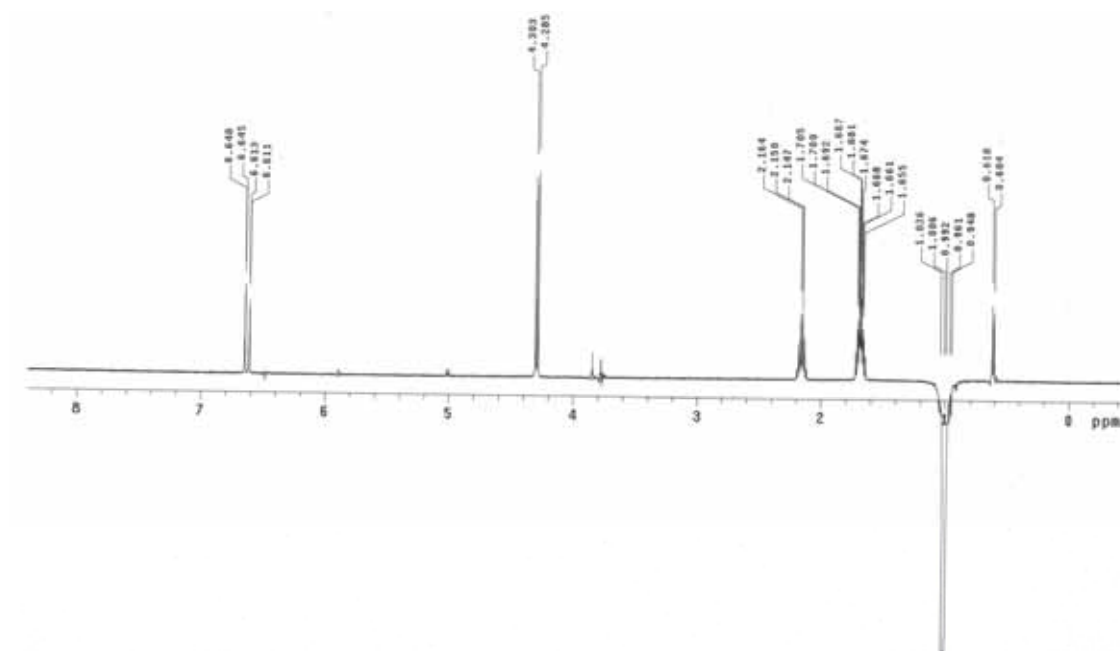
Espectro 33: Mapa de contorno gHMQC da substância 2 – expansão.



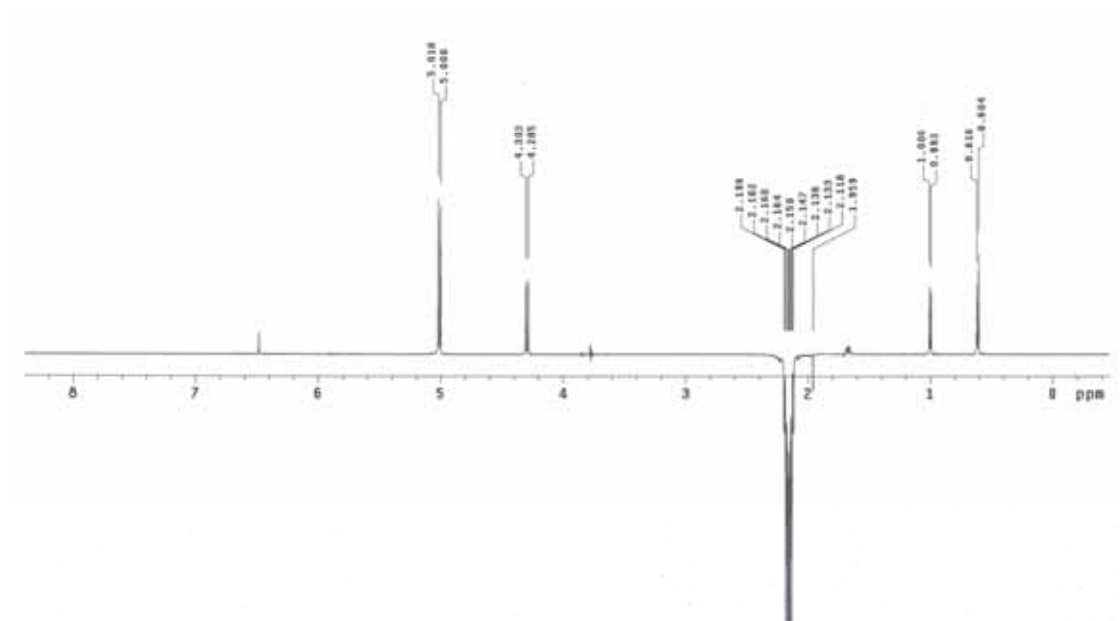
Espectro 34: Experimento de NOESY 1D da substância 2



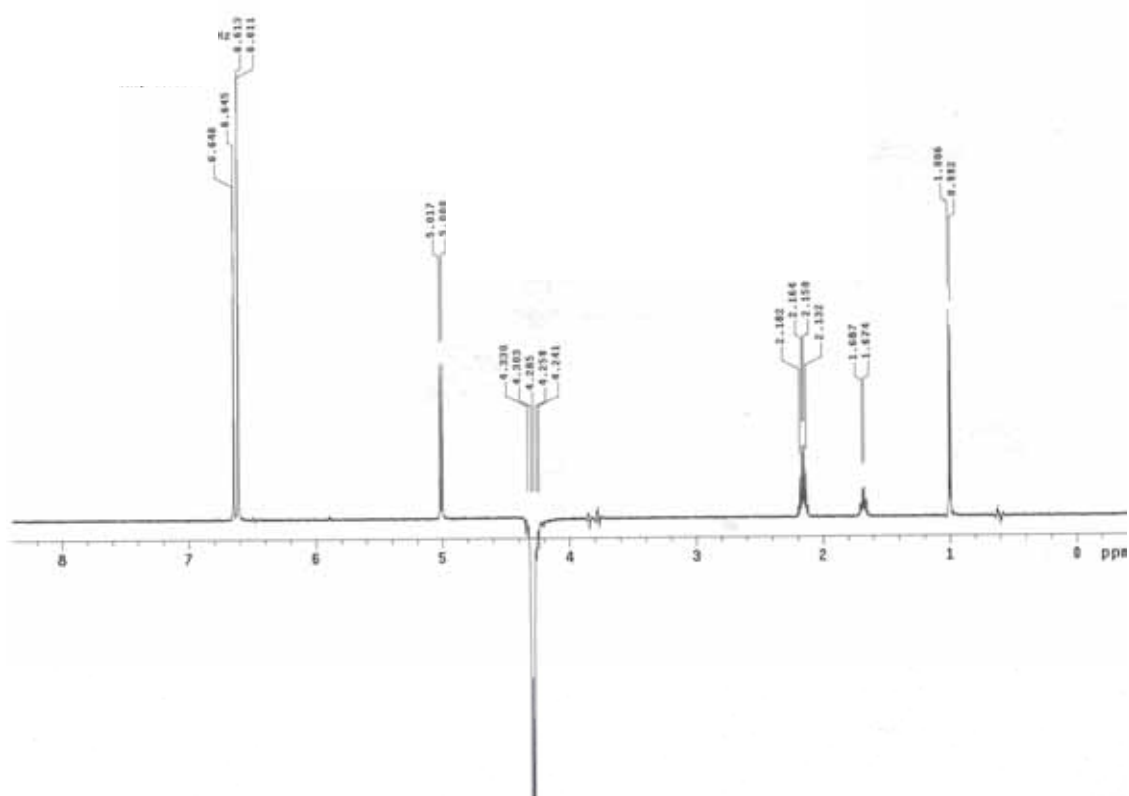
Espectro 35: Experimento de NOESY 1D da substância 2



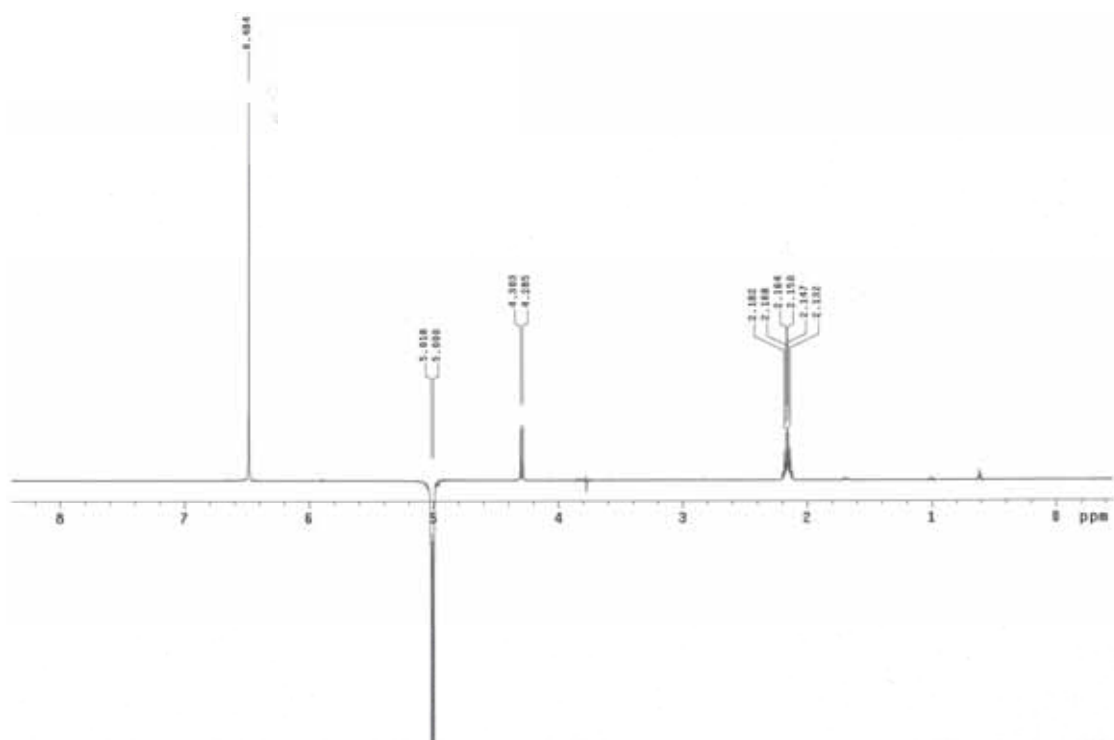
Espectro 36: Experimento de NOESY 1D da substância 2



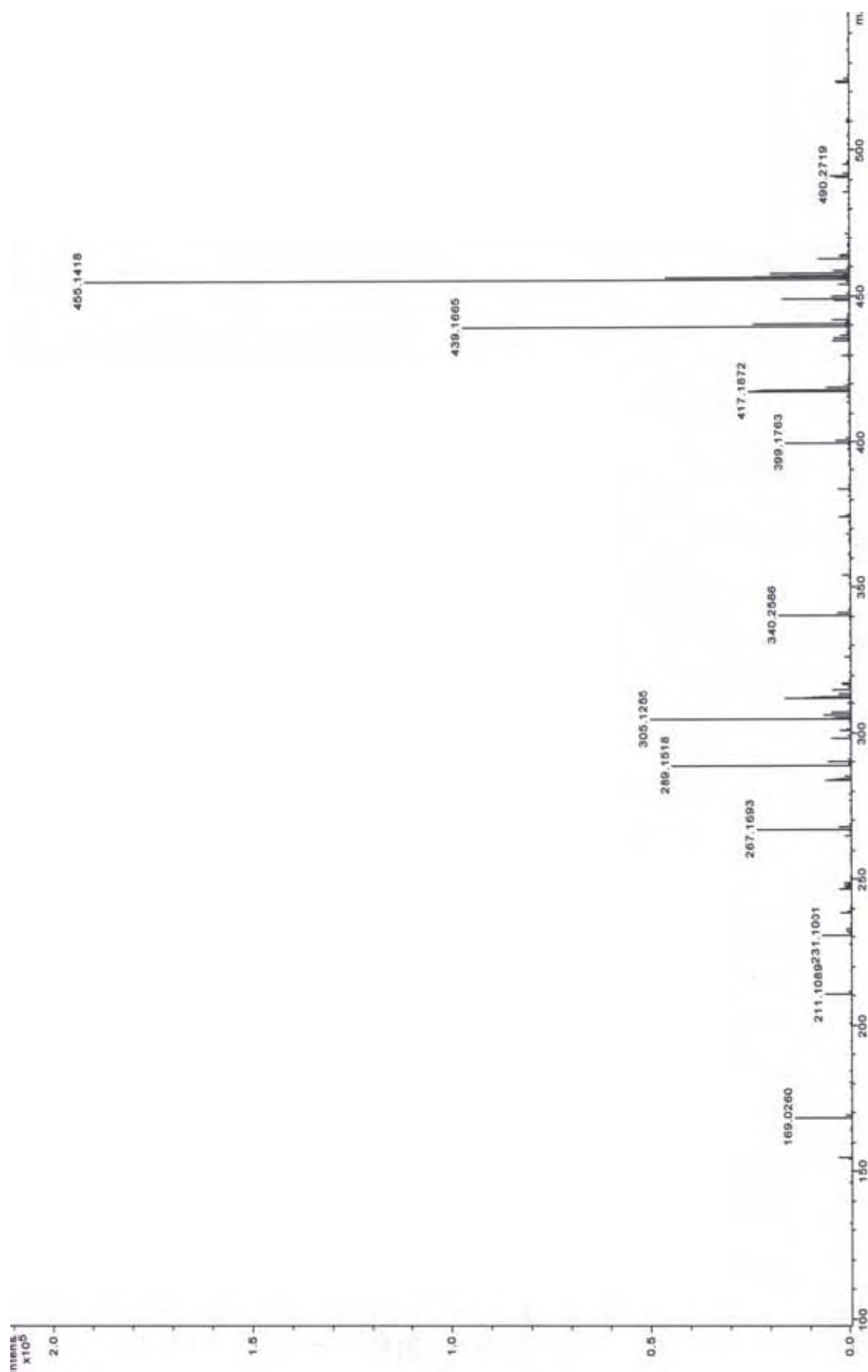
Espectro 37: Experimento de NOESY 1D da substância 2



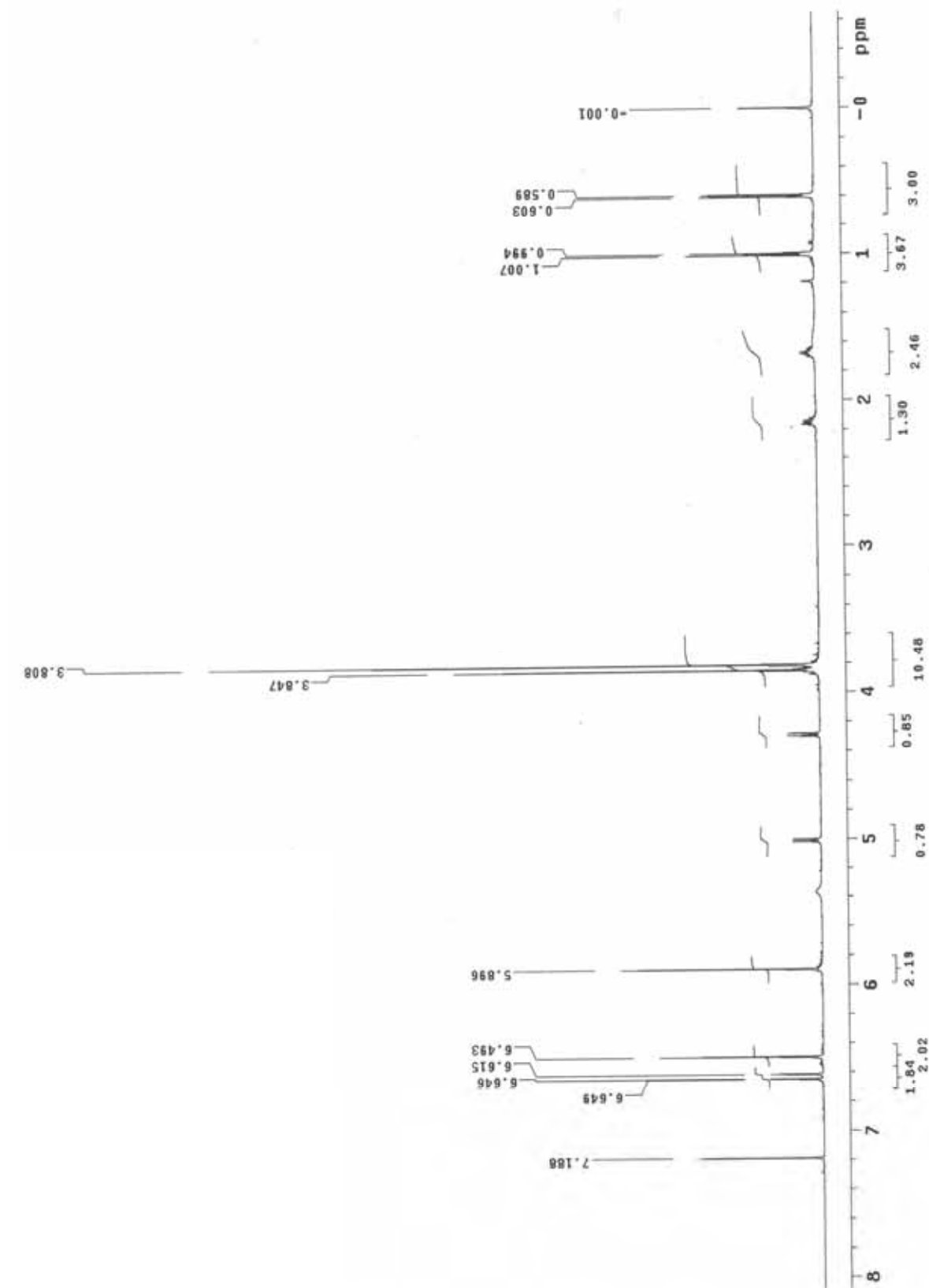
Espectro 38: Experimento de NOESY 1D da substância 2

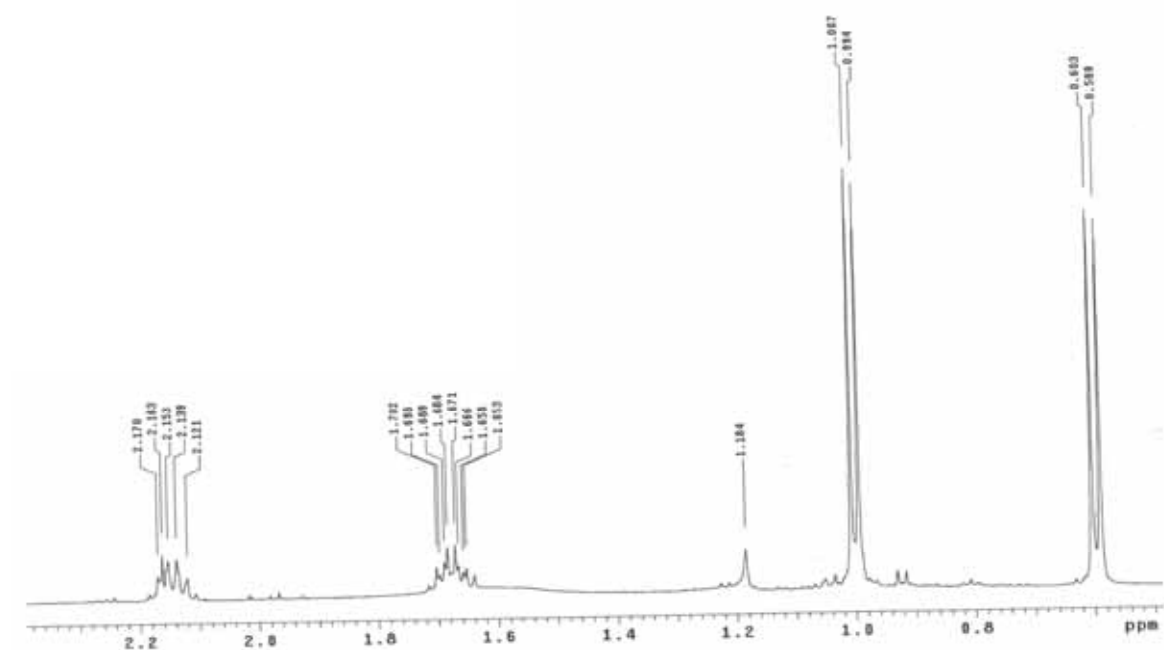


Espectro 39: Experimento de NOESY 1D da substância 2

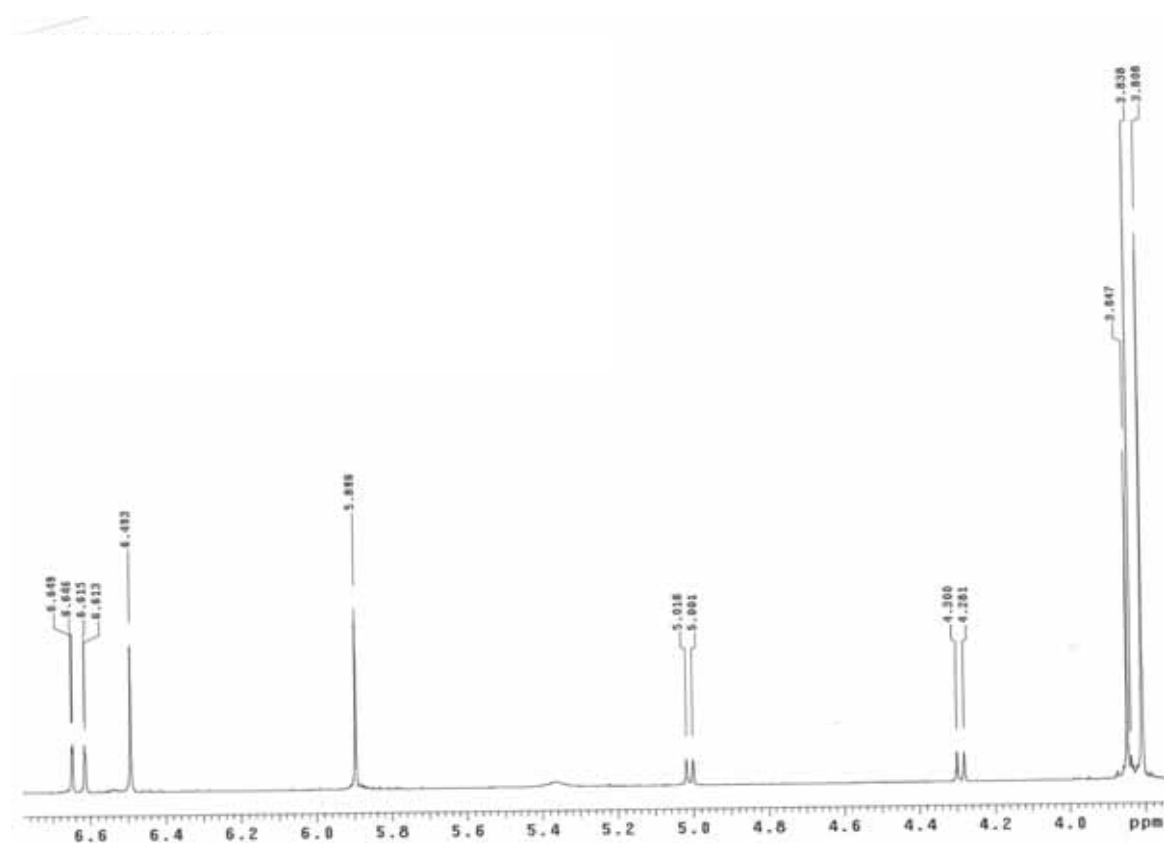


Espectro 40: Espectro de massas de alta resolução da substância 2

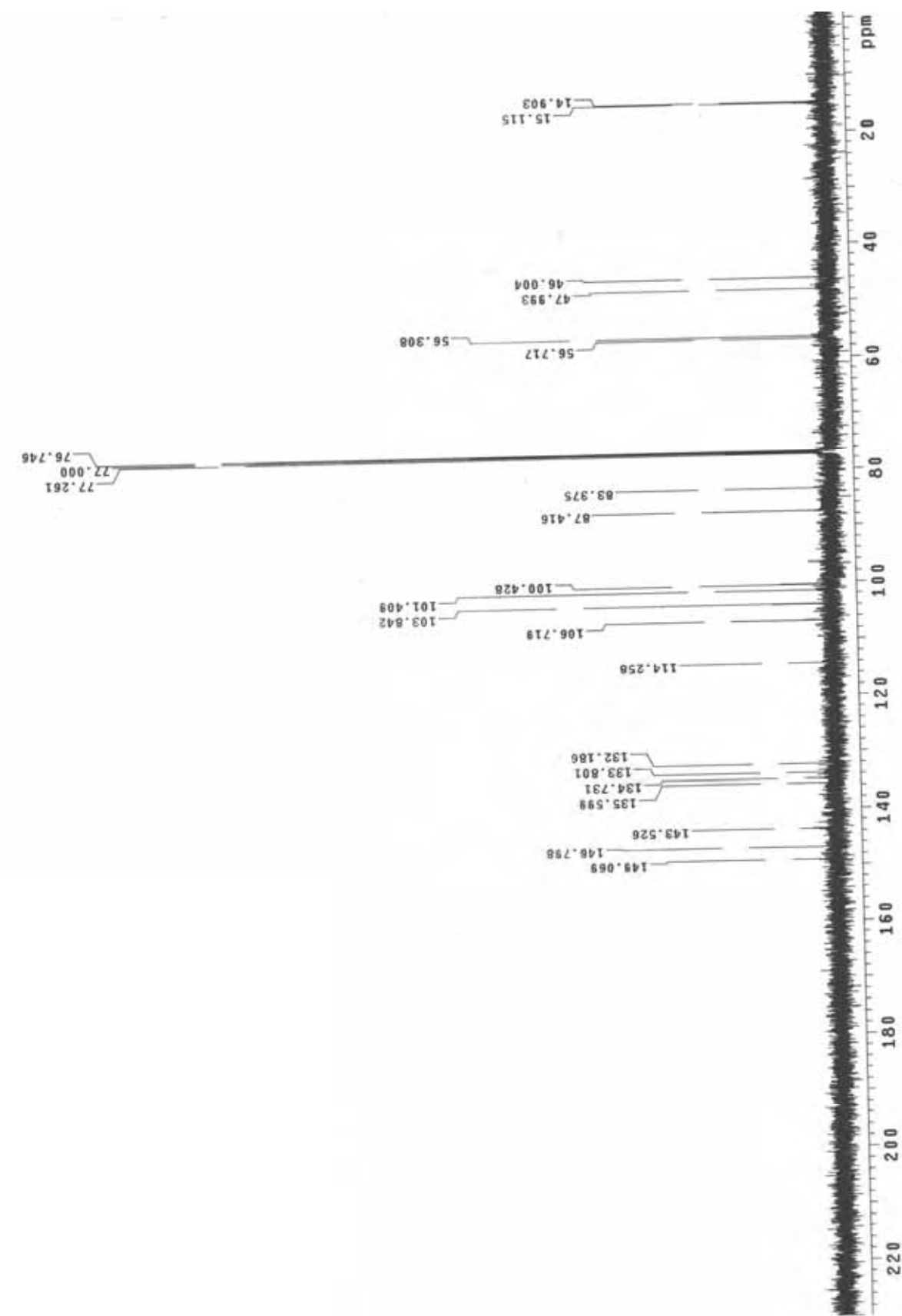
Espectro 41: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3

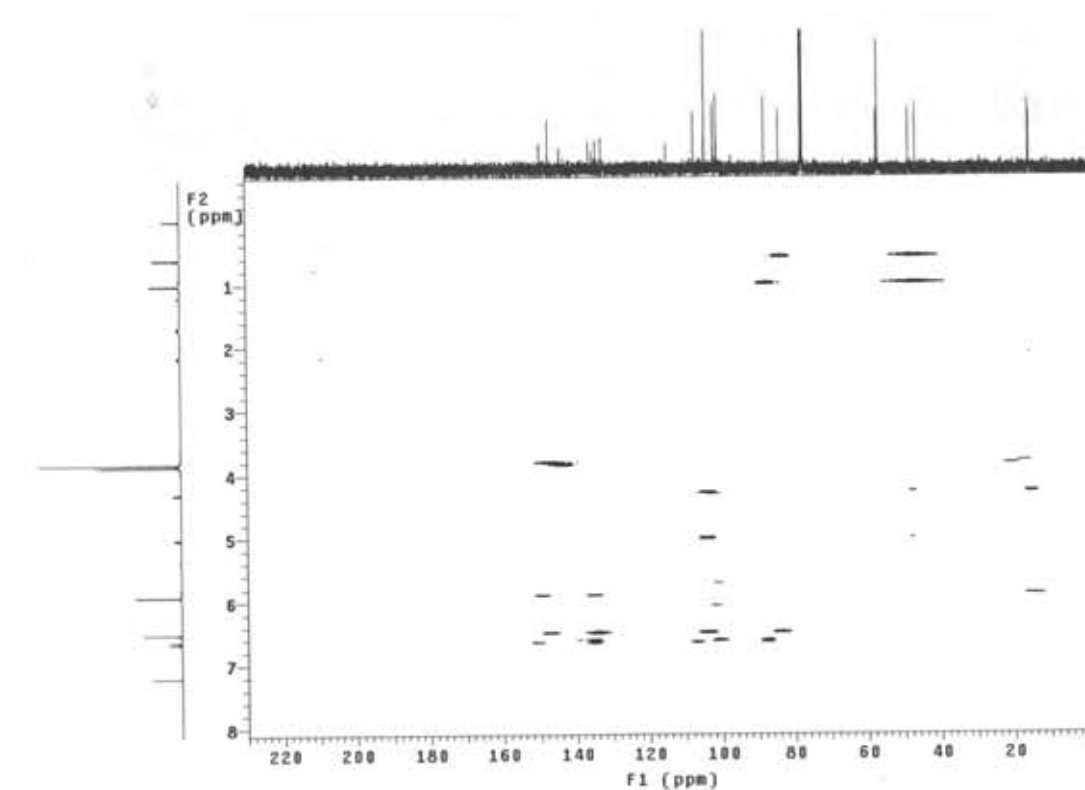
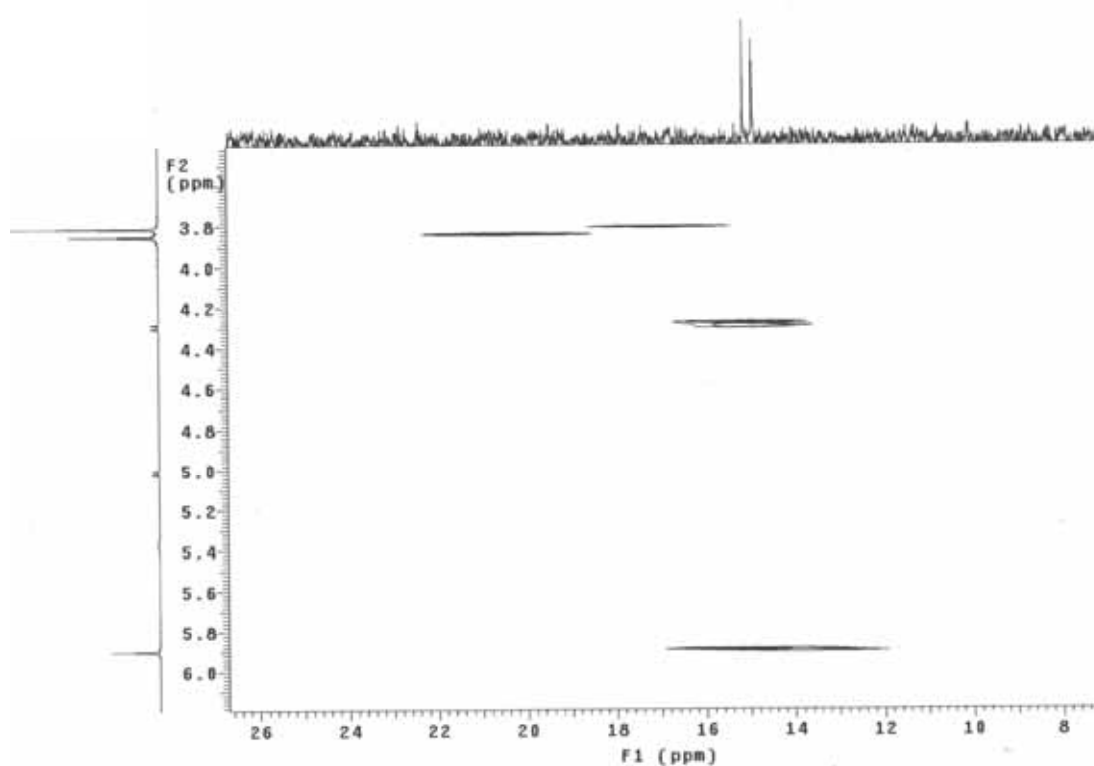


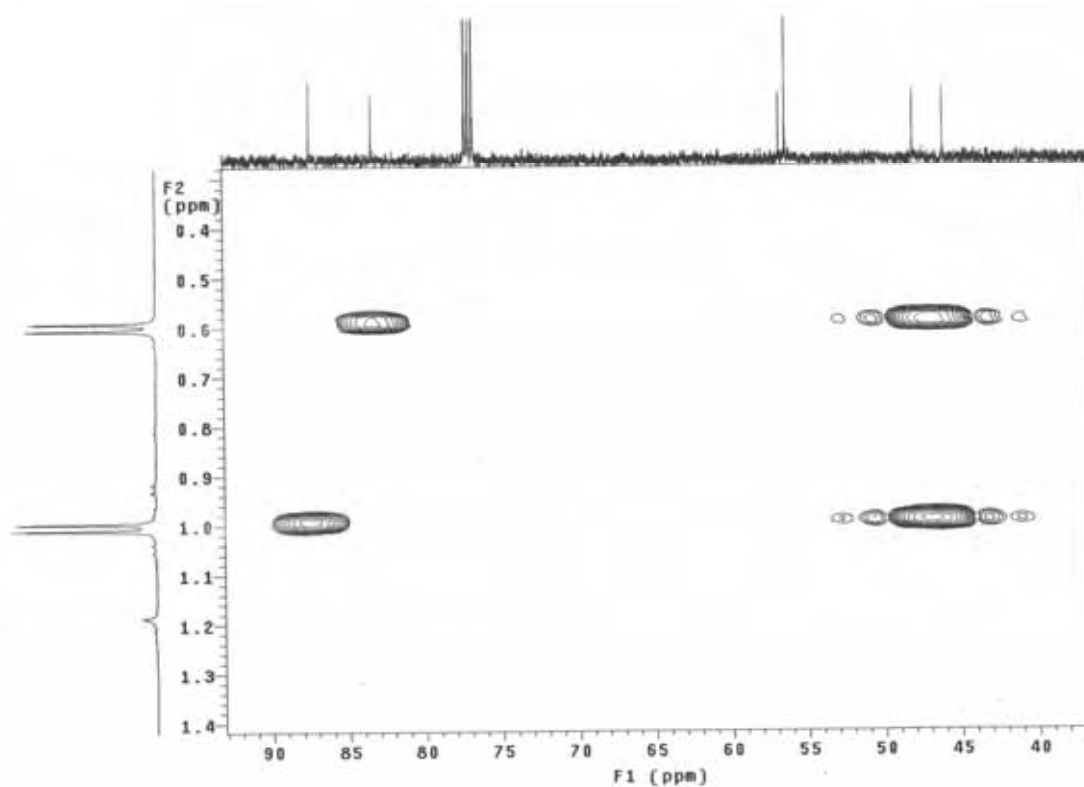
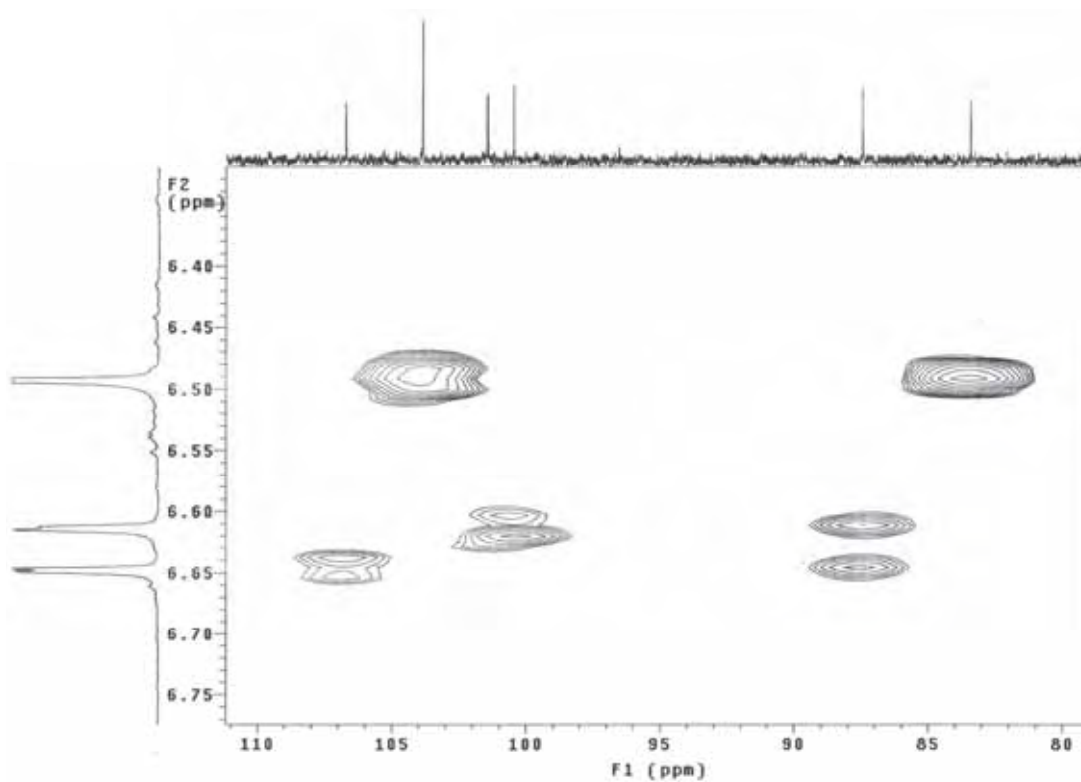
Espectro 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **3** – expansão.

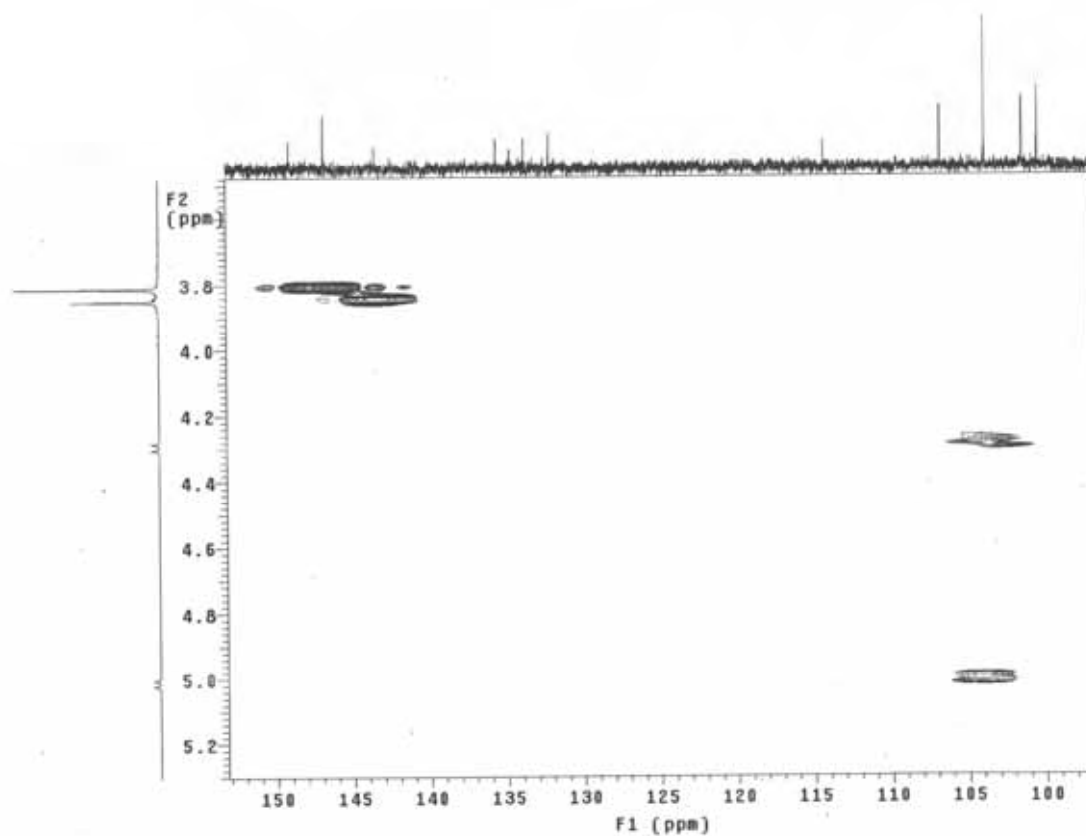
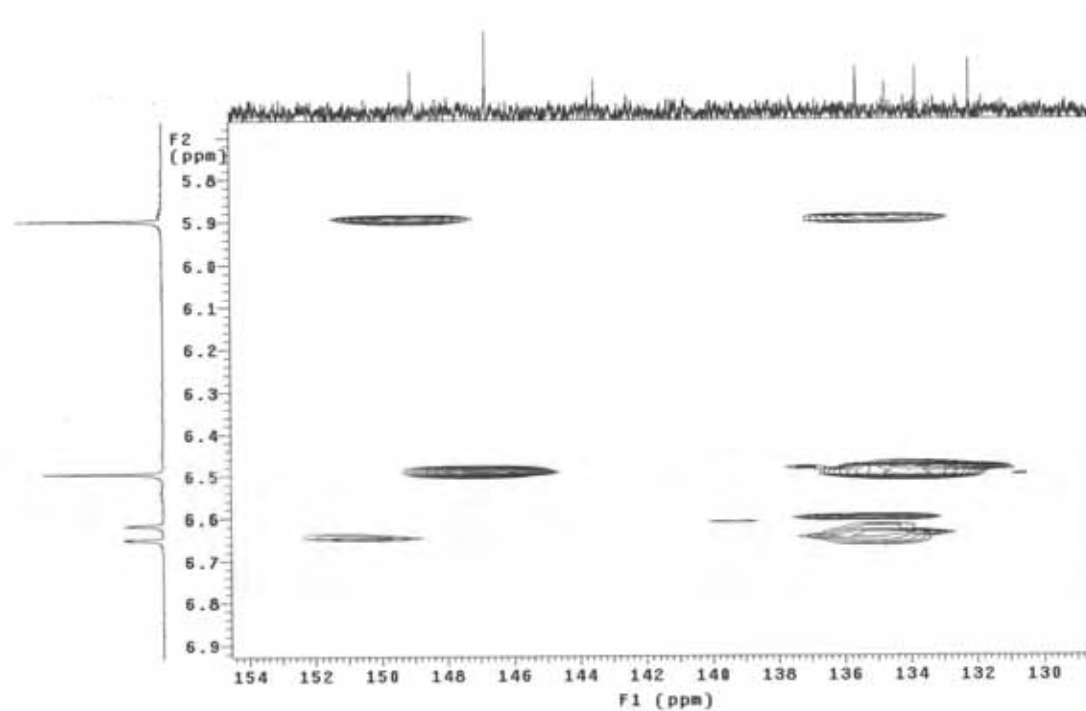


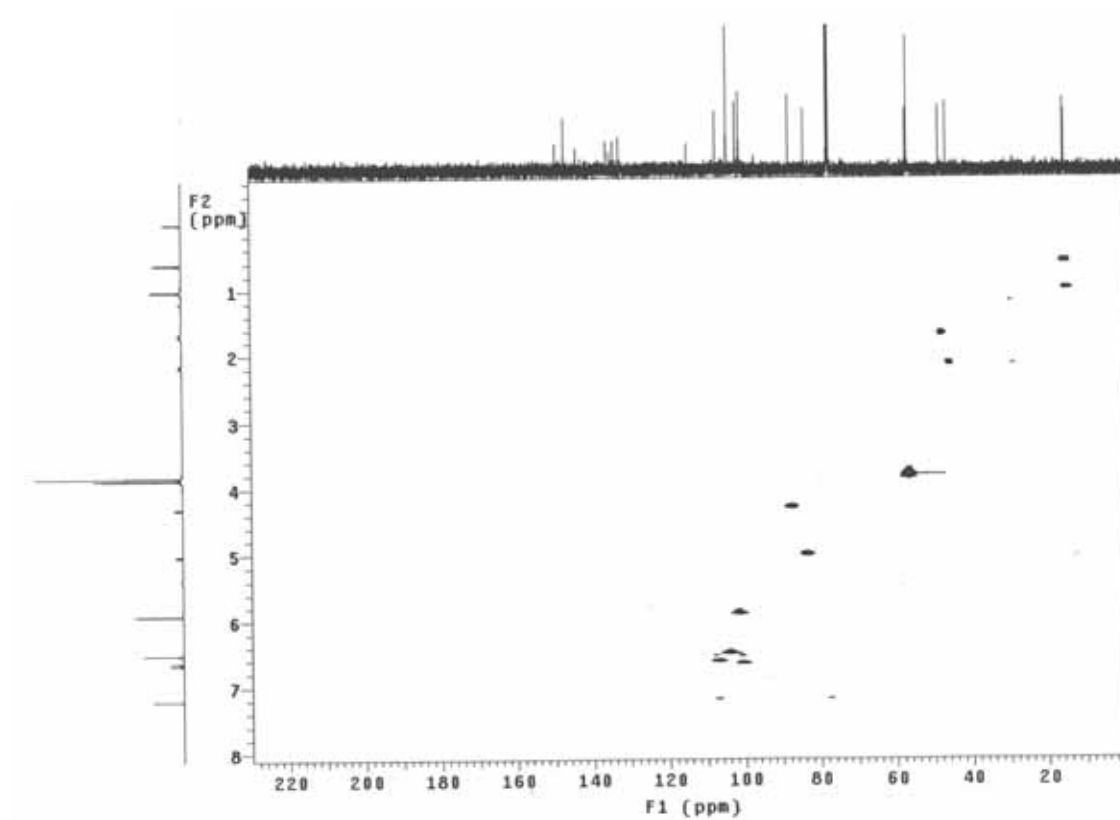
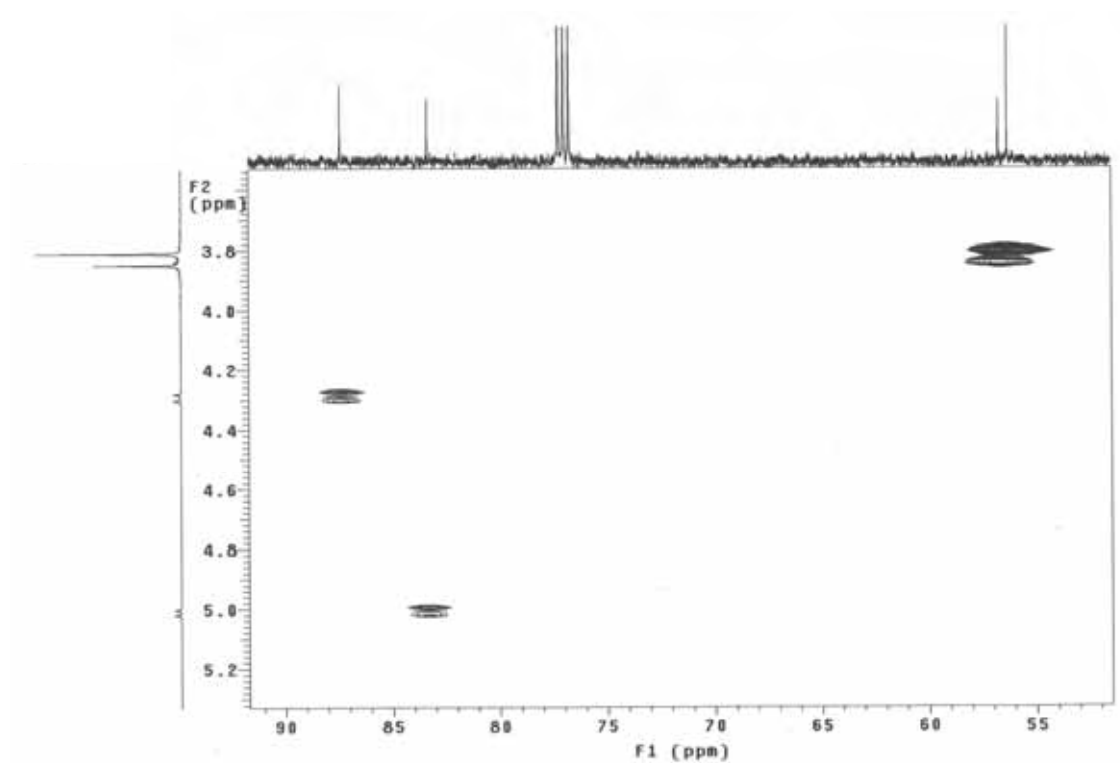
Espectro 43: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **3** – expansão.

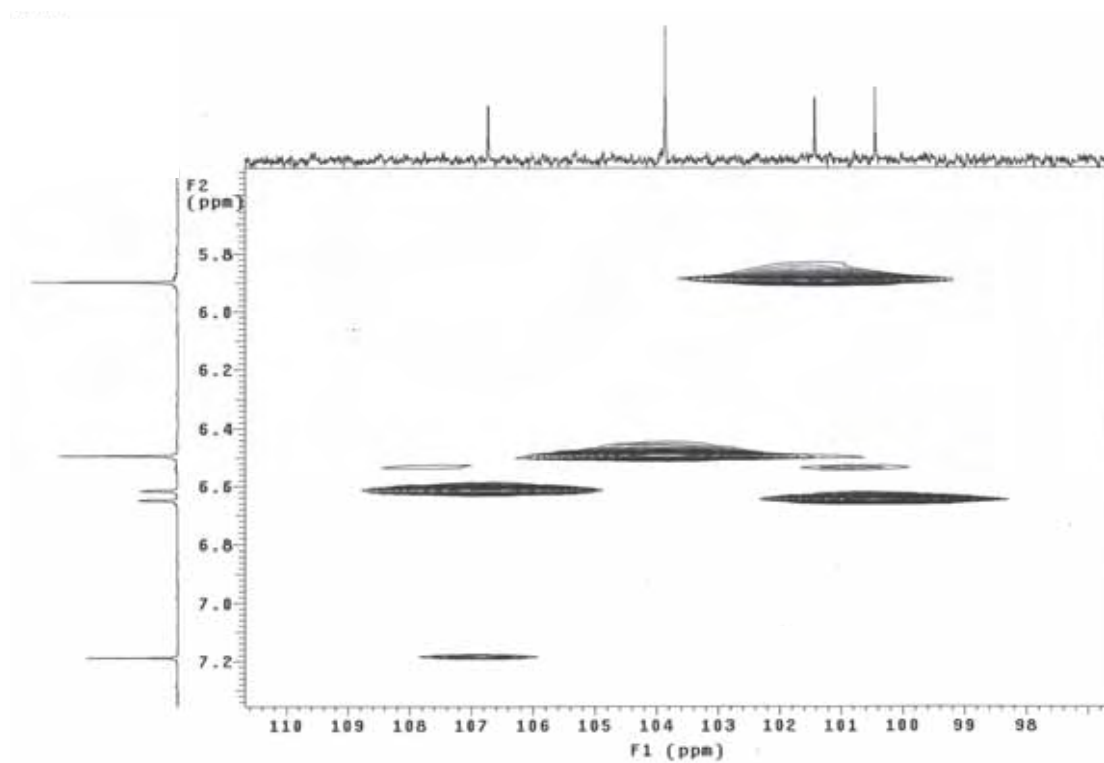
Espectro 44: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 3.

Espectro 45: Mapa de contorno gHMBC da substância **3**.Espectro 46: Mapa de contorno gHMBC da substância **3** – expansão.

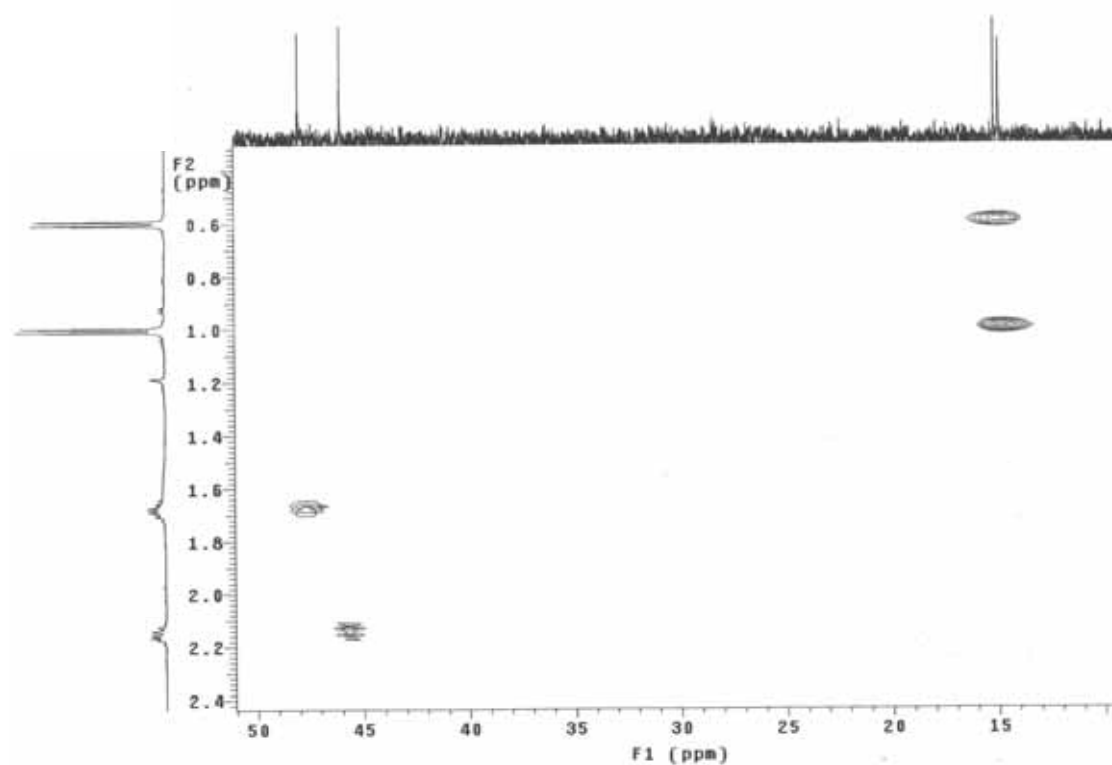
Espectro 47: Mapa de contorno gHMBC da substância **3** – expansão.Espectro 48: Mapa de contorno gHMBC da substância **3** – expansão.

Espectro 49: Mapa de contorno gHMBC da substância **3** – expansão.Espectro 50: Mapa de contorno gHMBC da substância **3** – expansão.

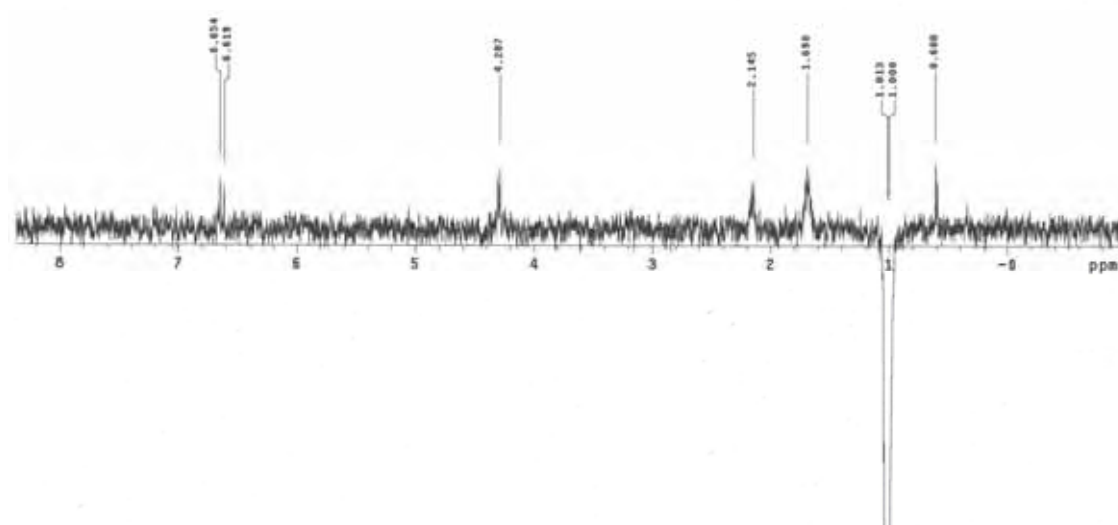
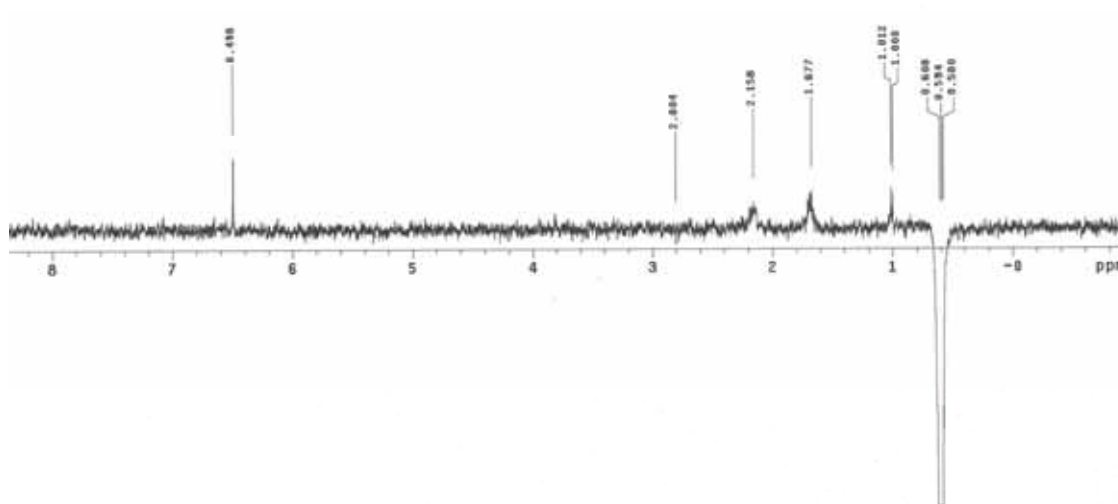
Espectro 51: Mapa de contorno gHMQC da substância **3**.Espectro 52: Mapa de contorno gHMQC da substância **3** – expansão.

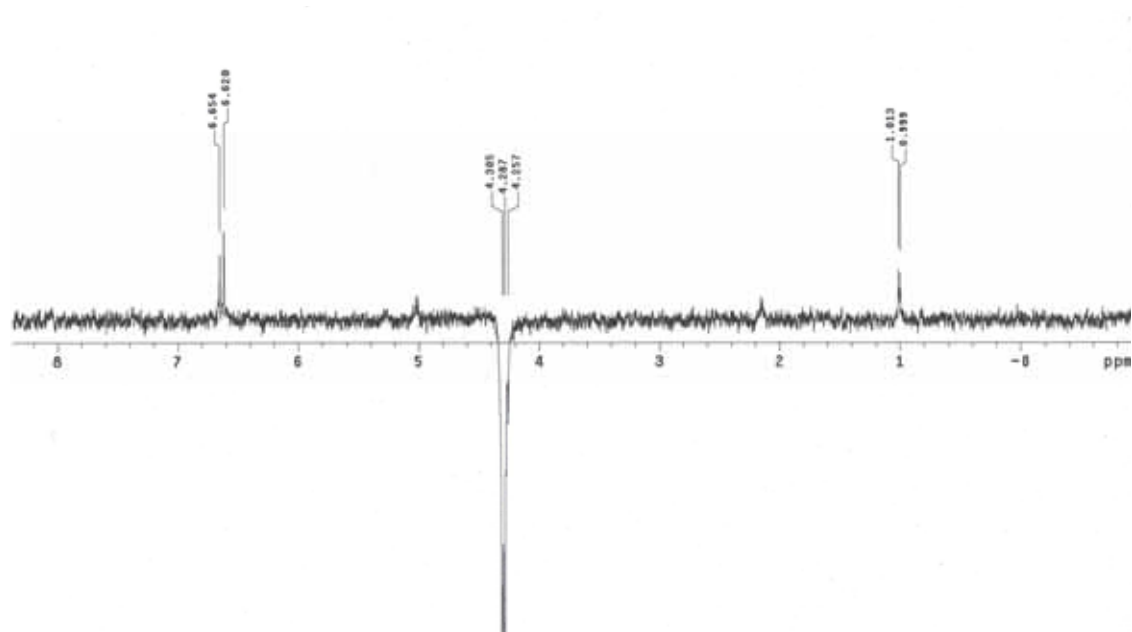


Espectro 53: Mapa de contorno gHMQC da substância **3** – expansão.

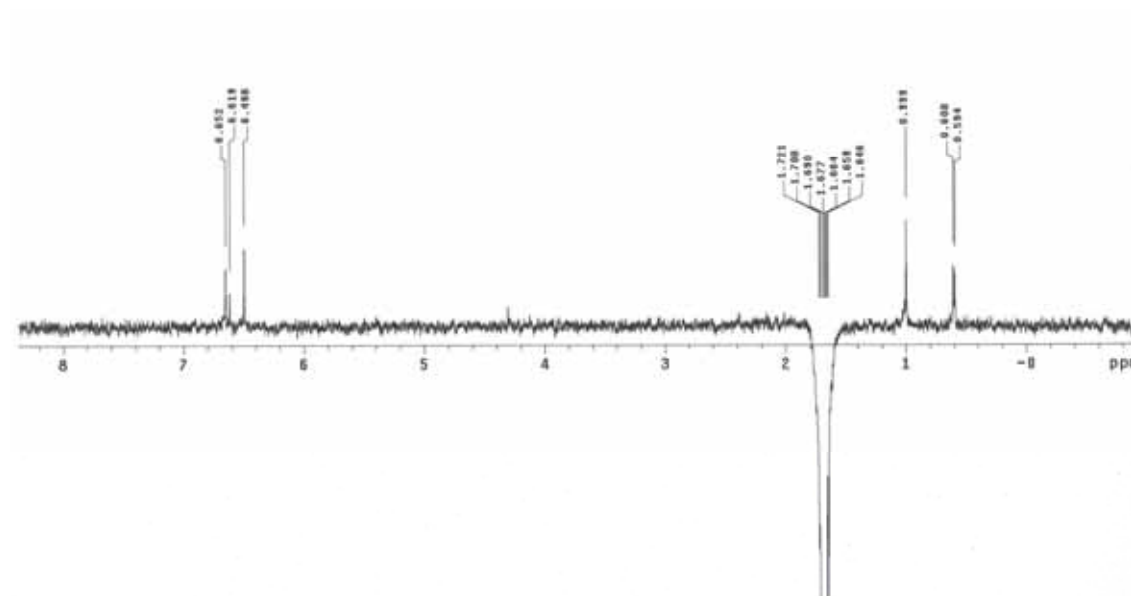


Espectro 54: Mapa de contorno gHMQC da substância **3** – expansão.

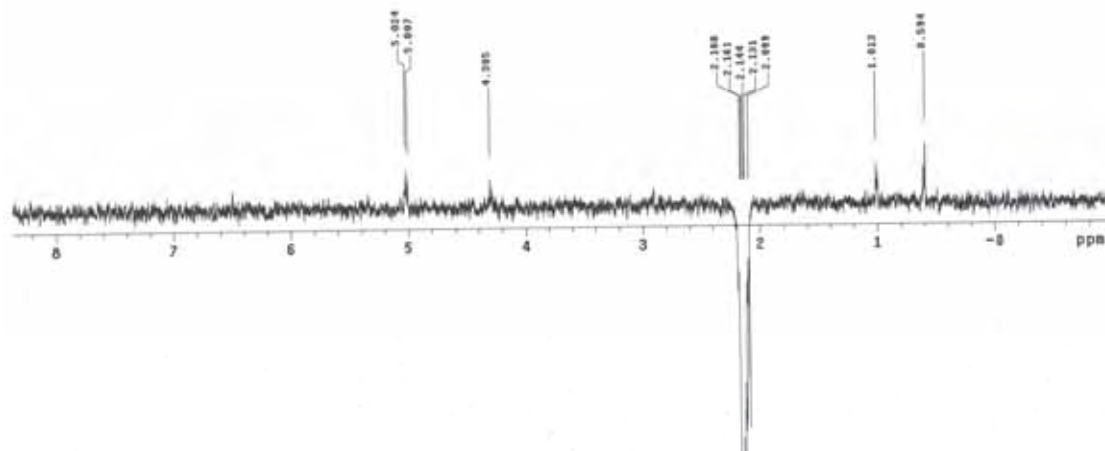
Espectro 55: Experimento de NOESY 1D da substância **3**Espectro 56: Experimento de NOESY 1D da substância **3**



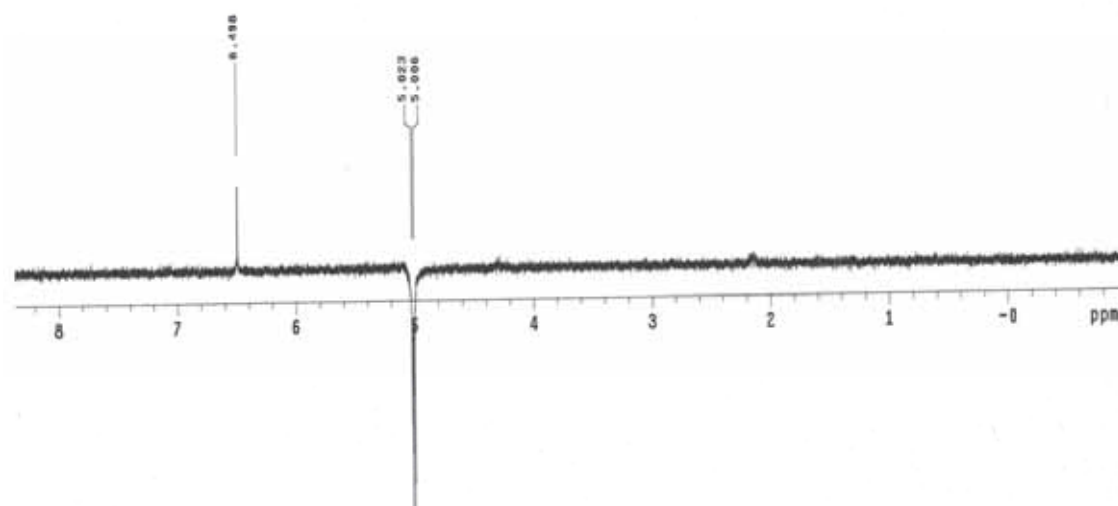
Espectro 57: Experimento de NOESY 1D da substância 3



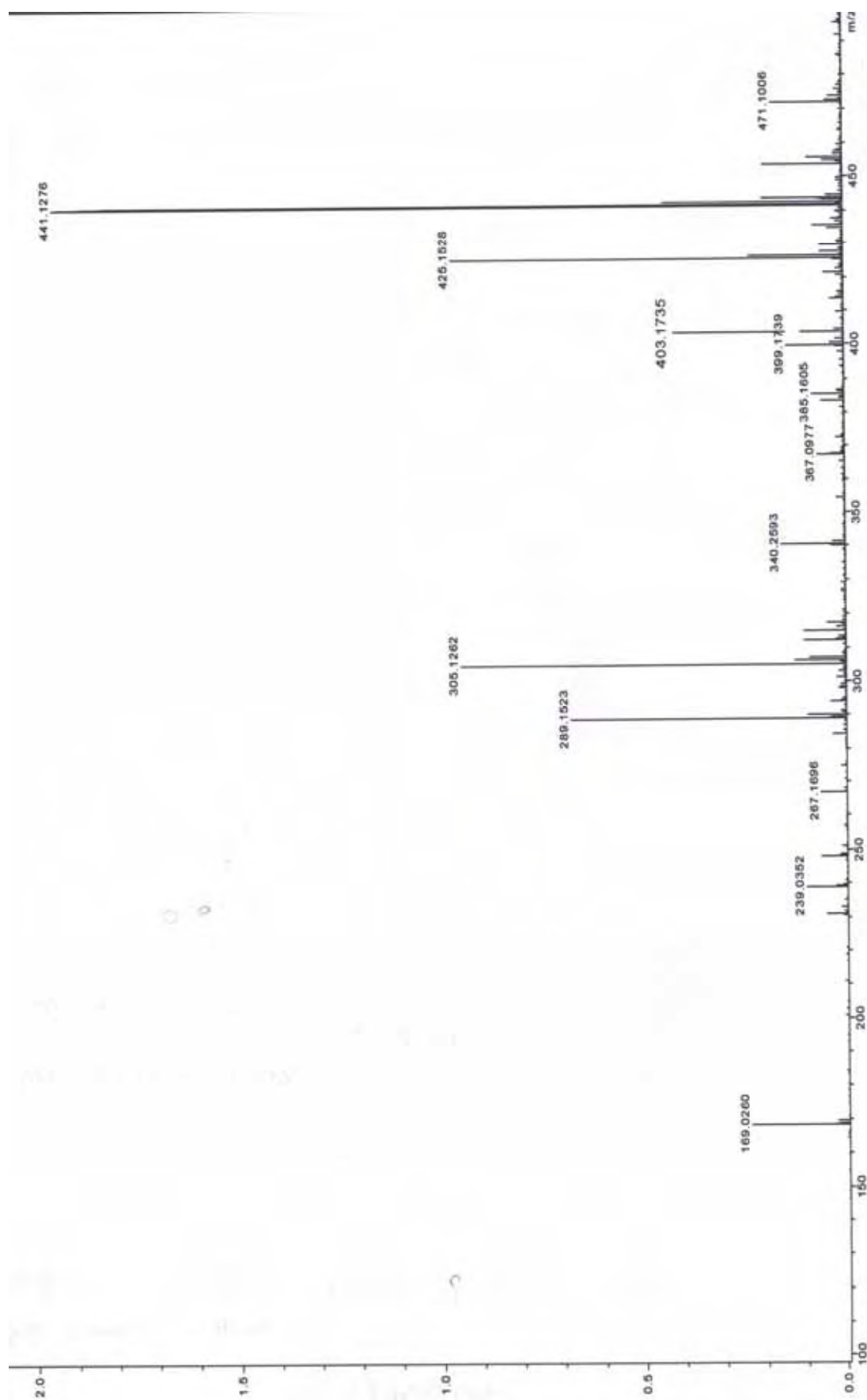
Espectro 58: Experimento de NOESY 1D da substância 3



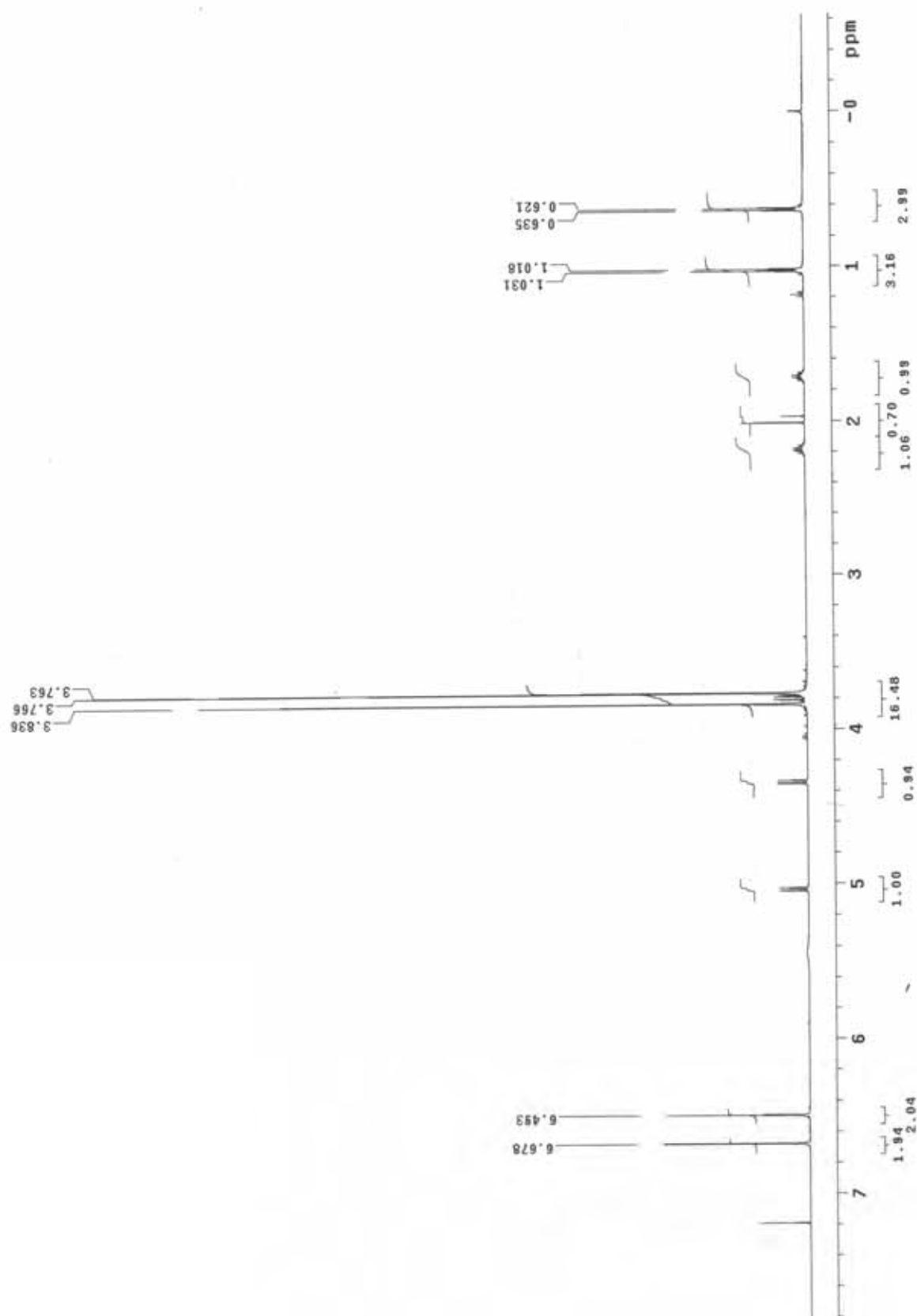
Espectro 59: Experimento de NOESY 1D da substância 3

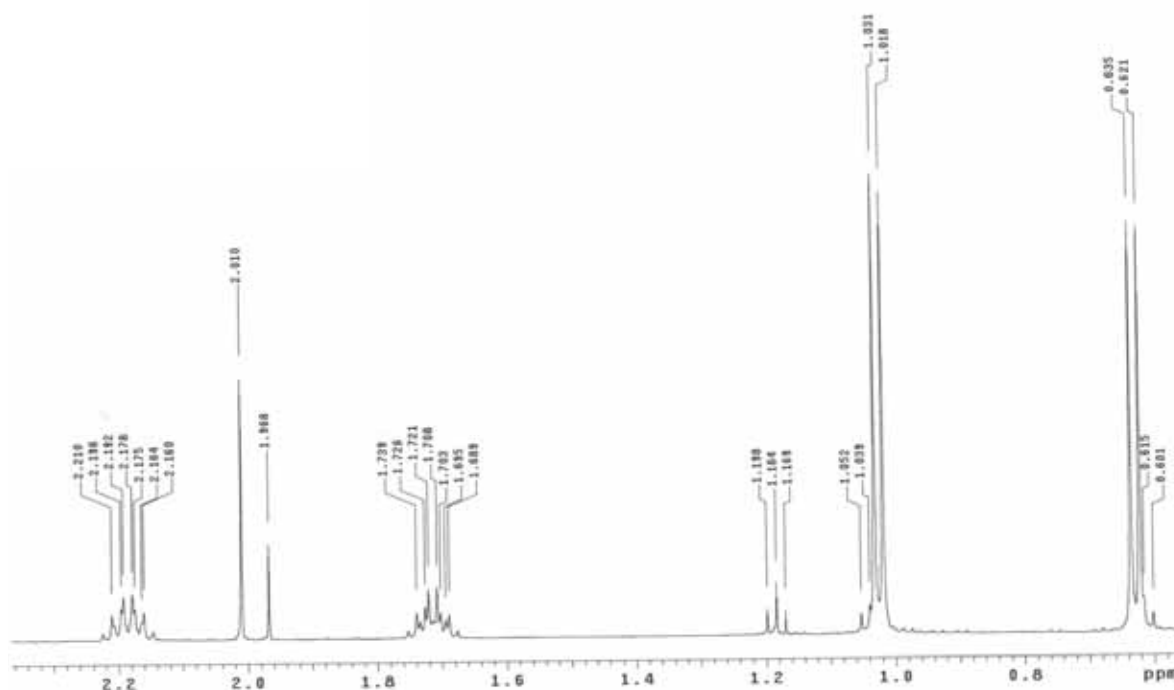


Espectro 60: Experimento de NOESY 1D da substância 3

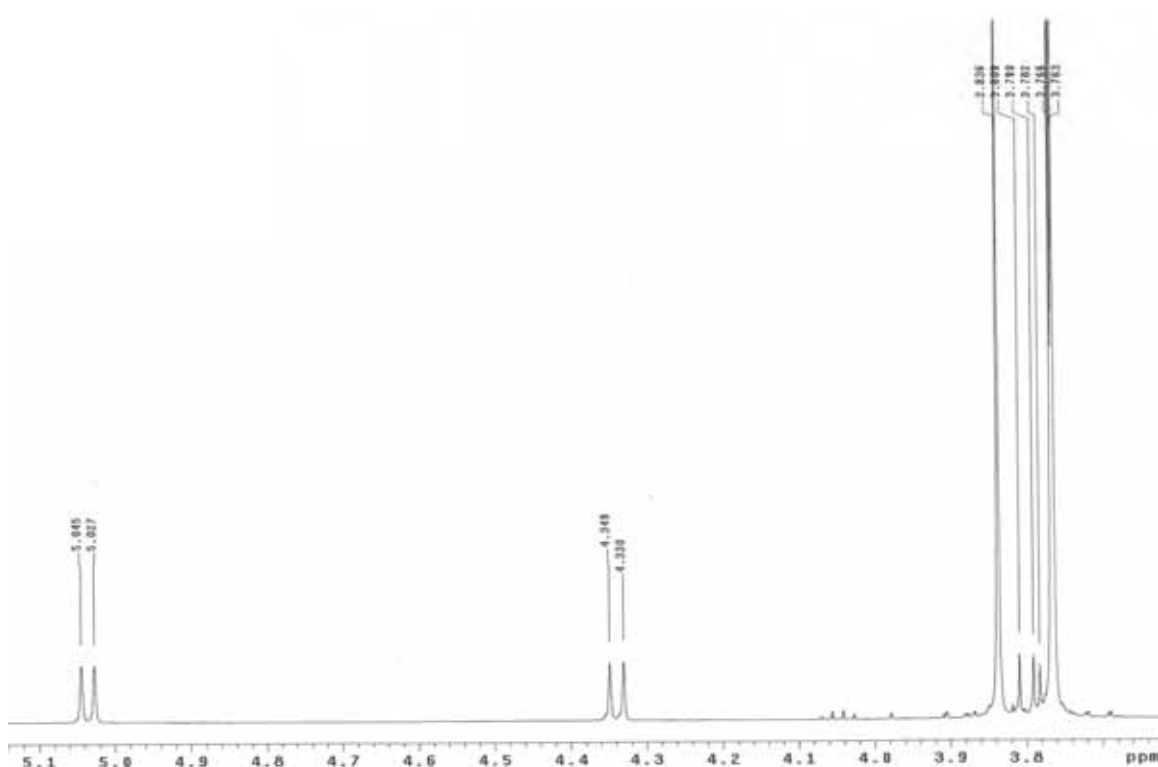


Espectro 61: Espectro de massas de alta resolução da substância 3

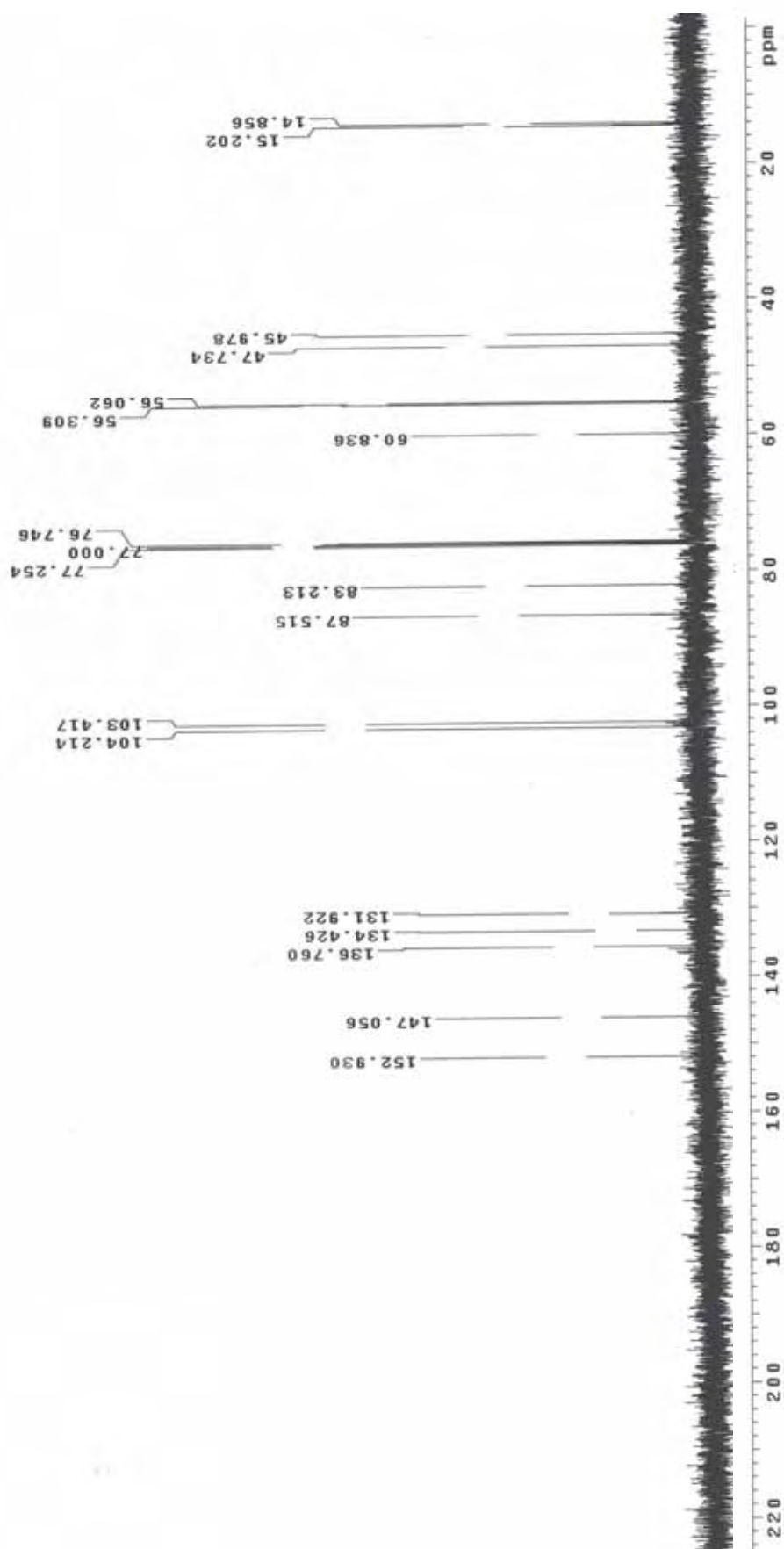
Espectro 62: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 4

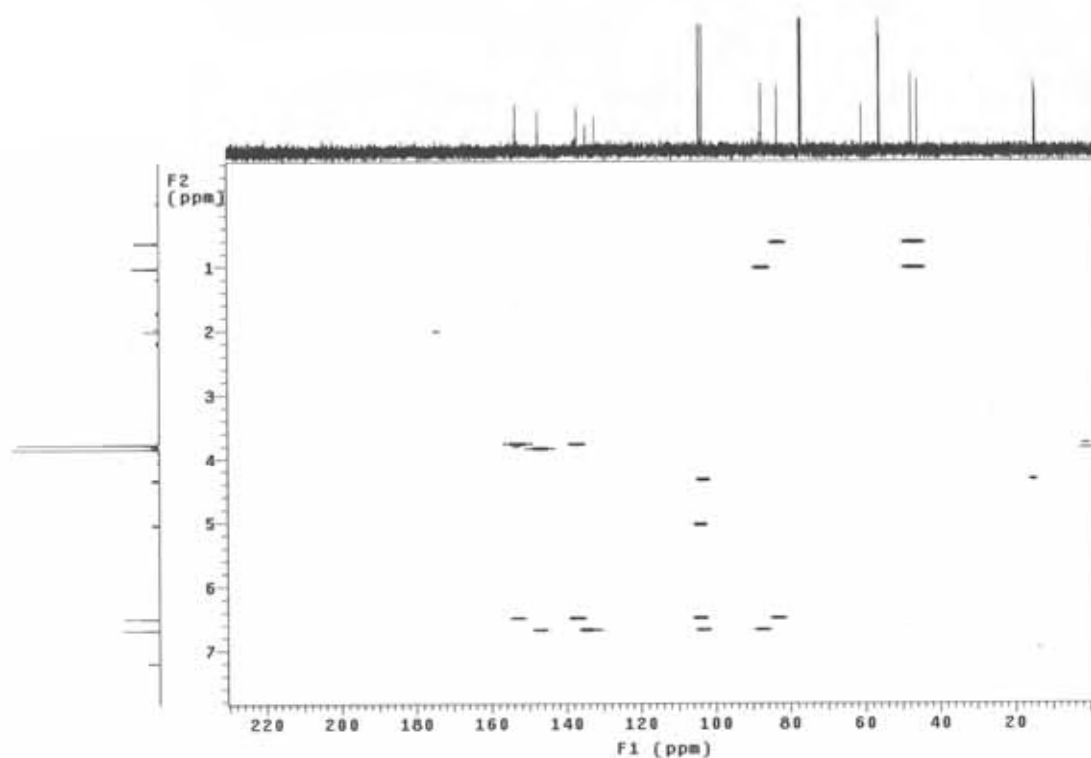
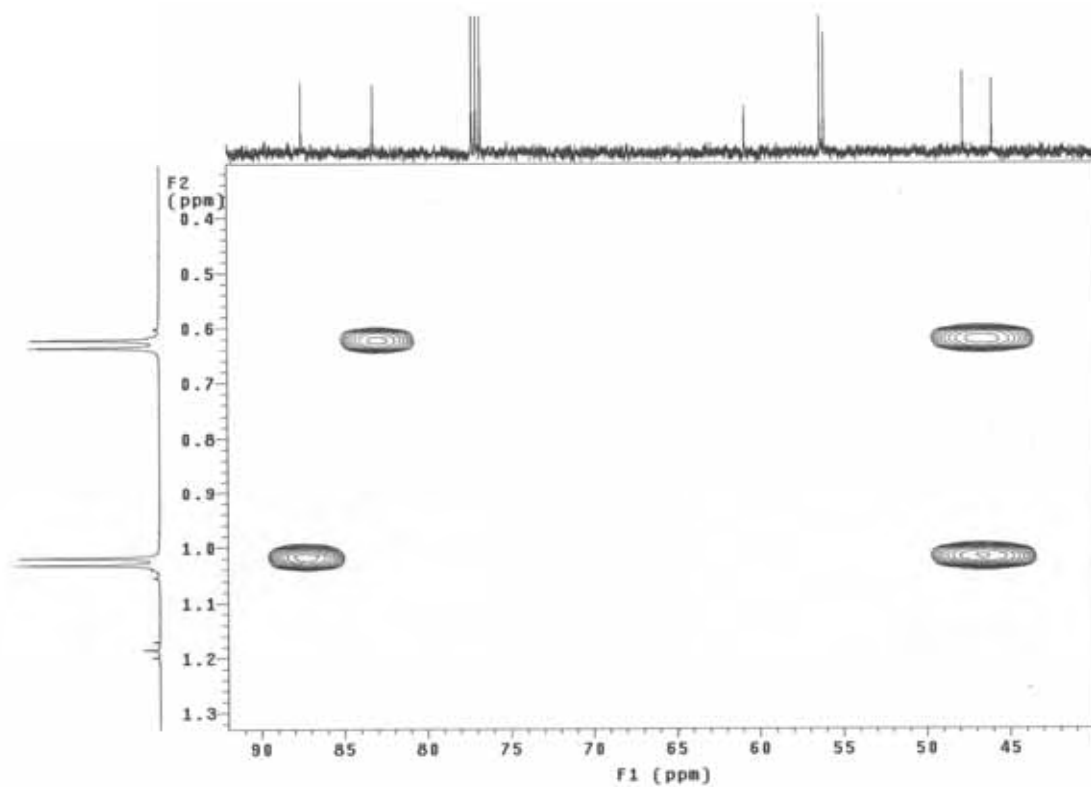


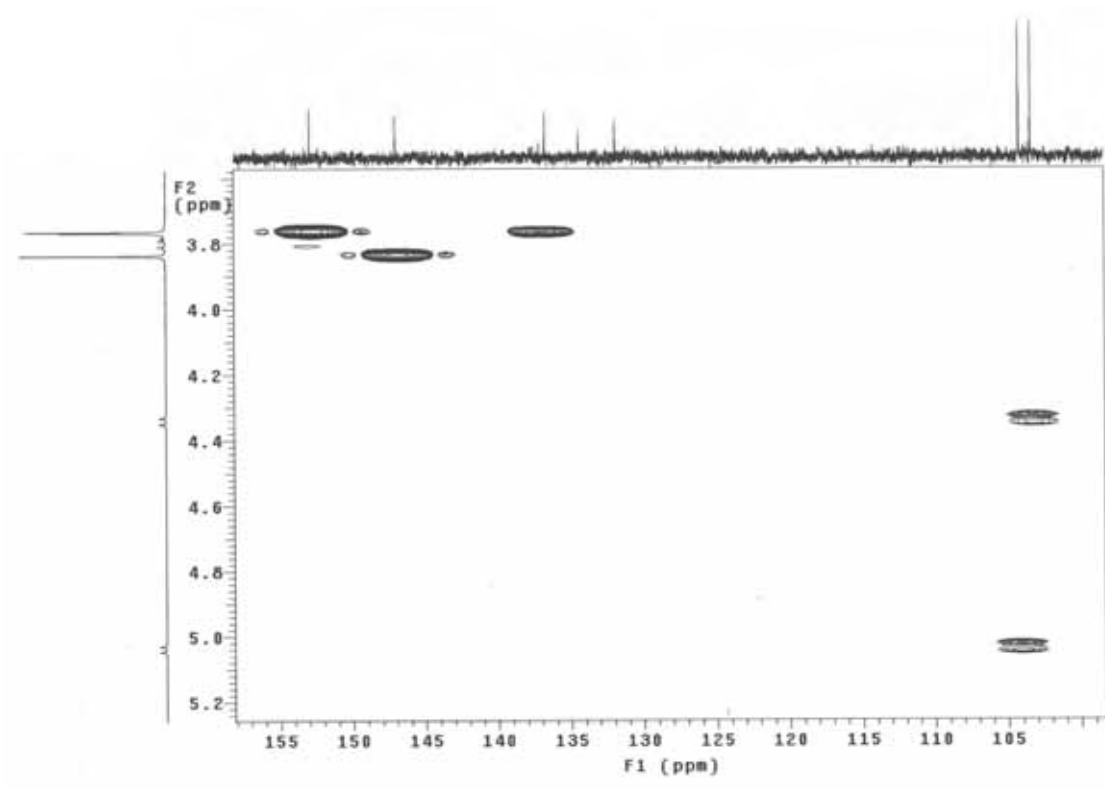
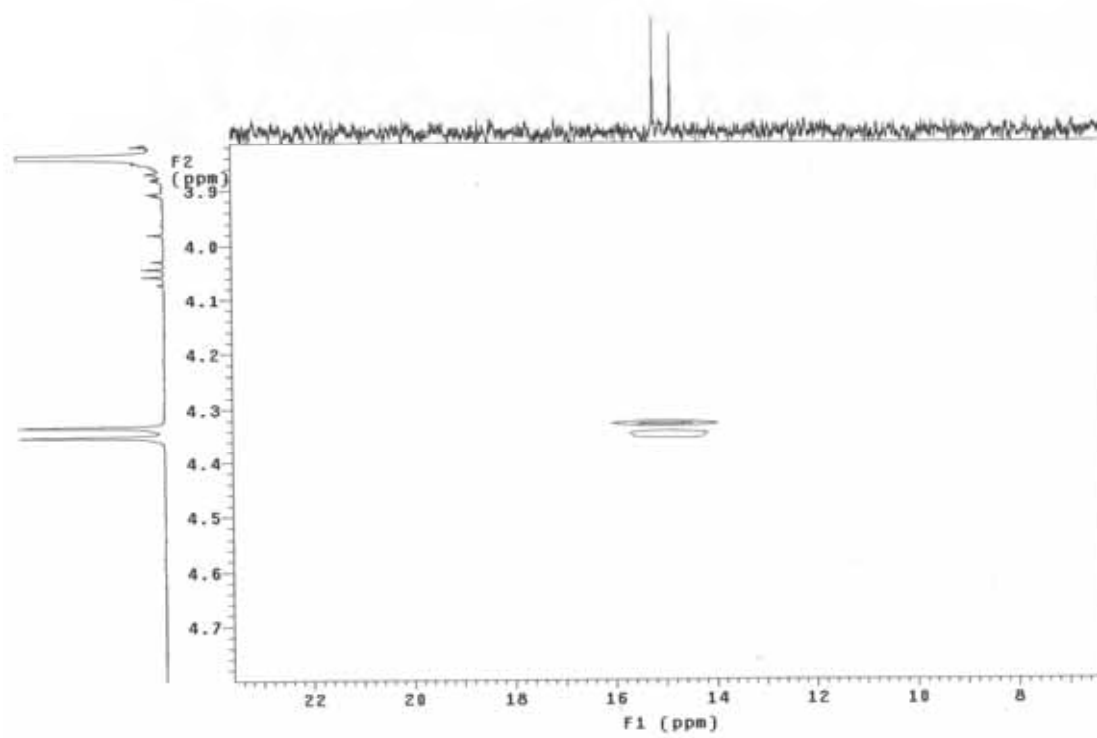
Espectro 63: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **4** – expansão.

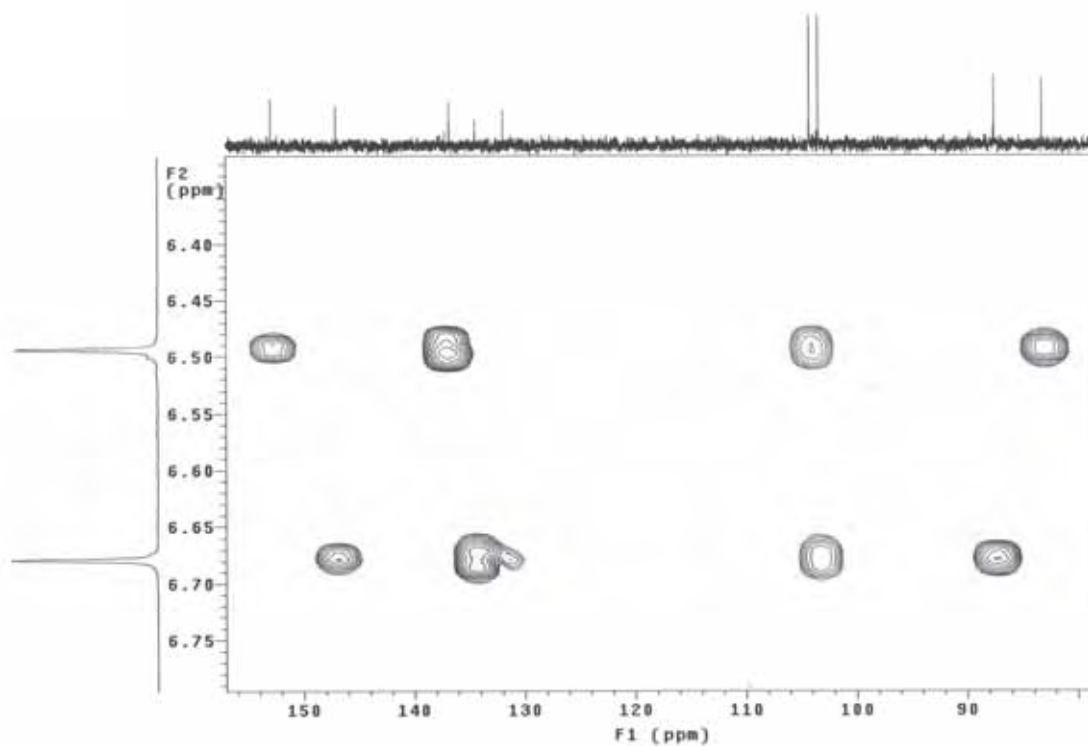


Espectro 64: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **4** – expansão.

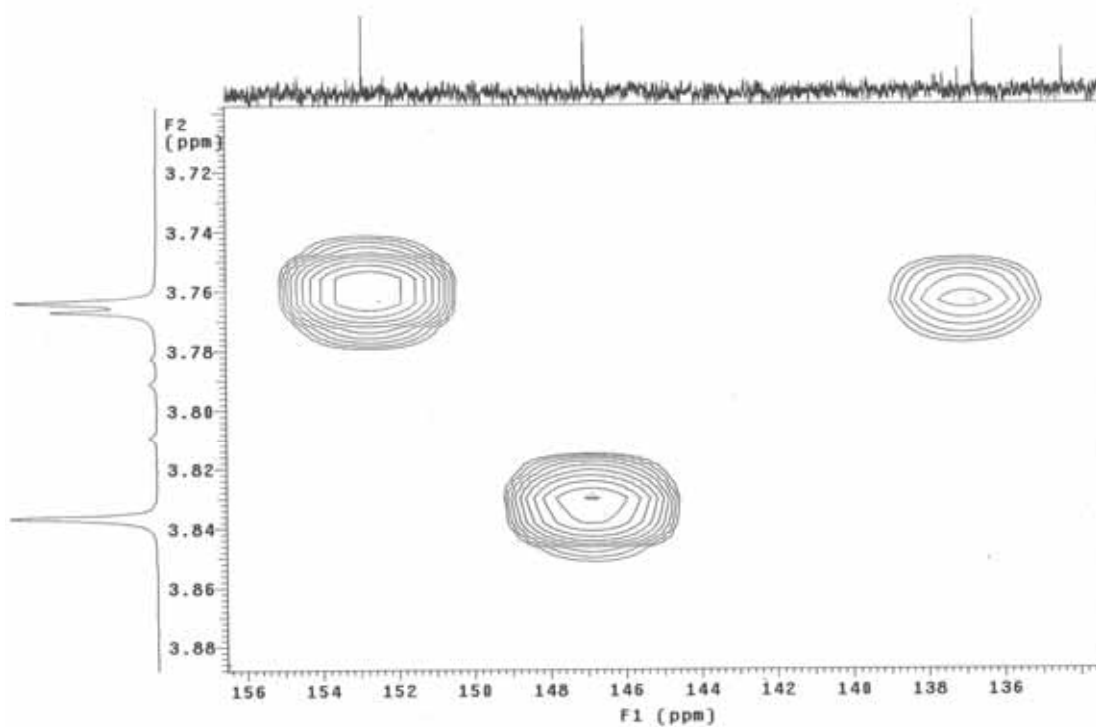
Espectro 65: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 4.

Espectro 66: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 4.Espectro 67: Mapa de contorno *g*HMBC da substância 4 – expansão.

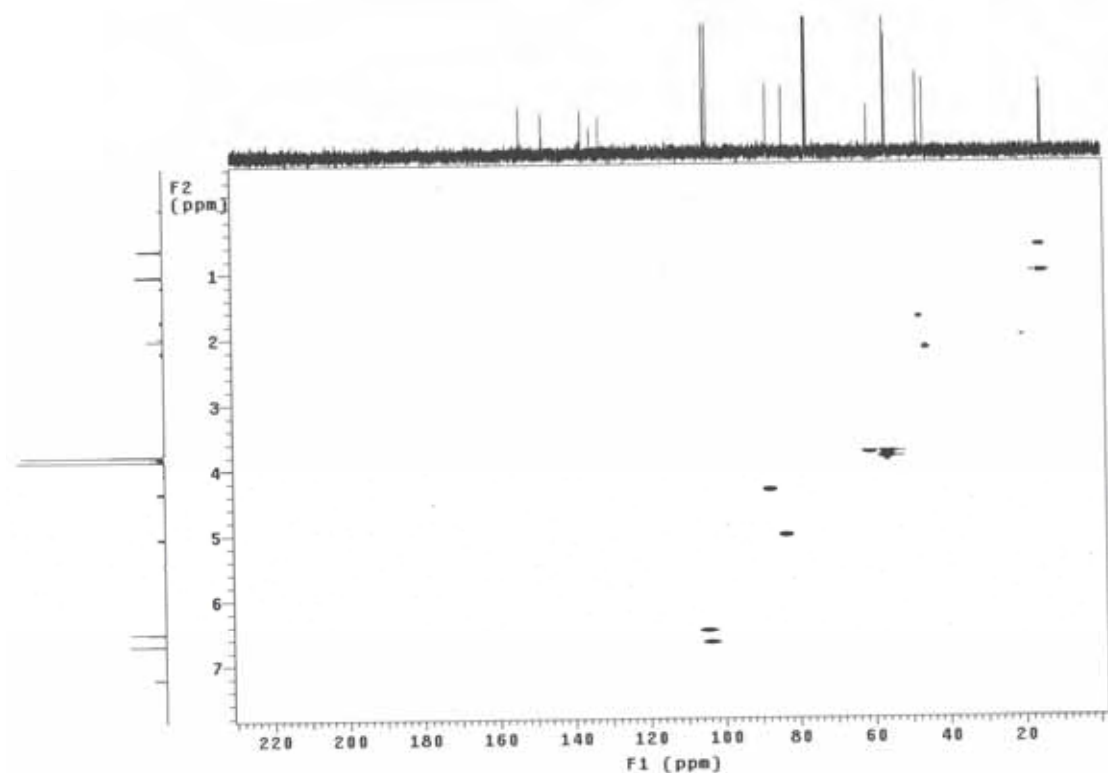
Espectro 68: Mapa de contorno gHMBC da substância **4** – expansão.Espectro 69: Mapa de contorno gHMBC da substância **4** – expansão.



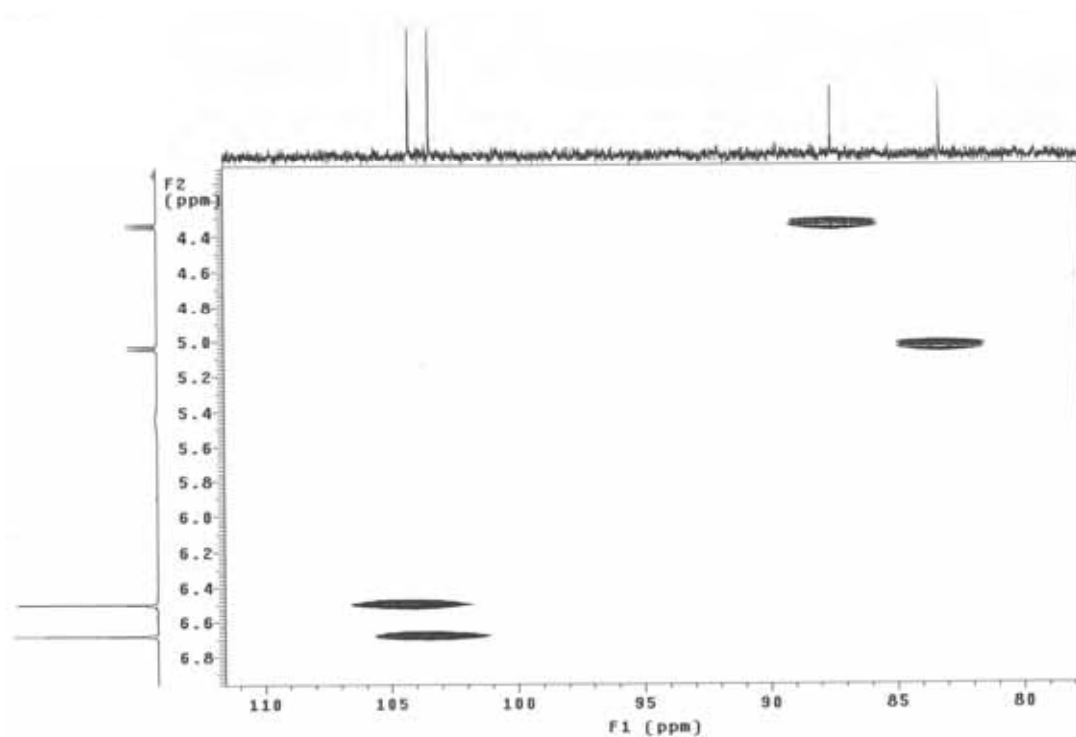
Espectro 70: Mapa de contorno gHMBC da substância **4** – expansão.



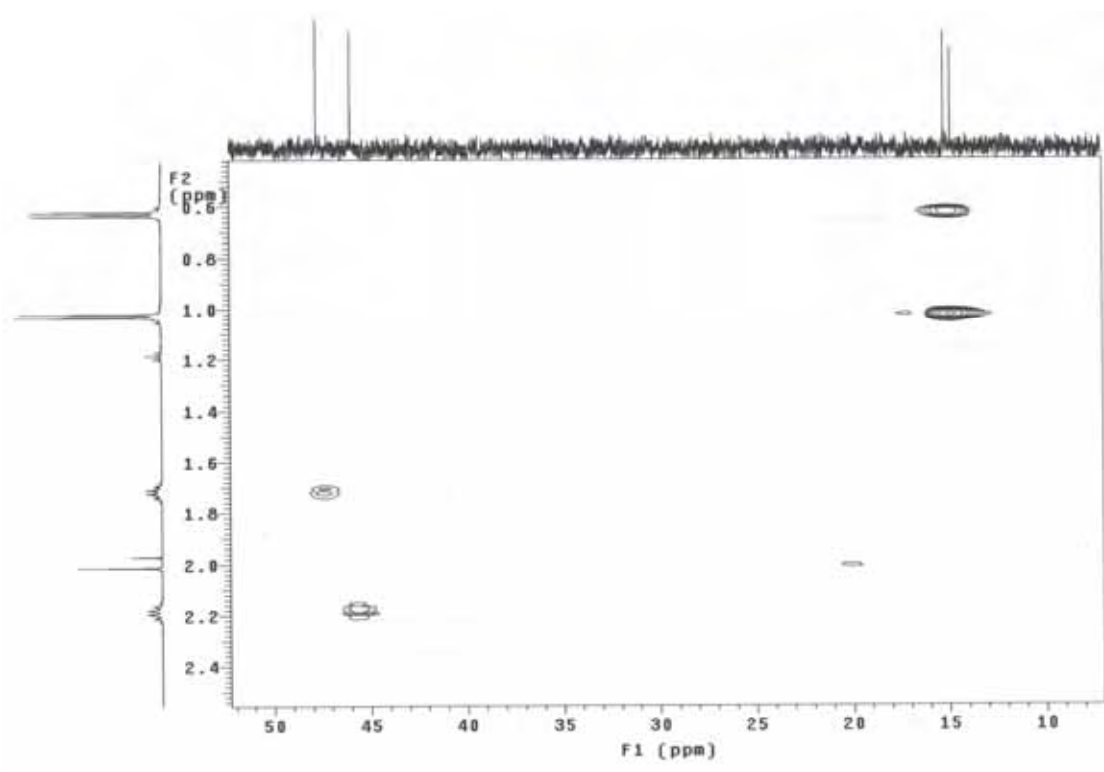
Espectro 71: Mapa de contorno gHMBC da substância **4** – expansão.



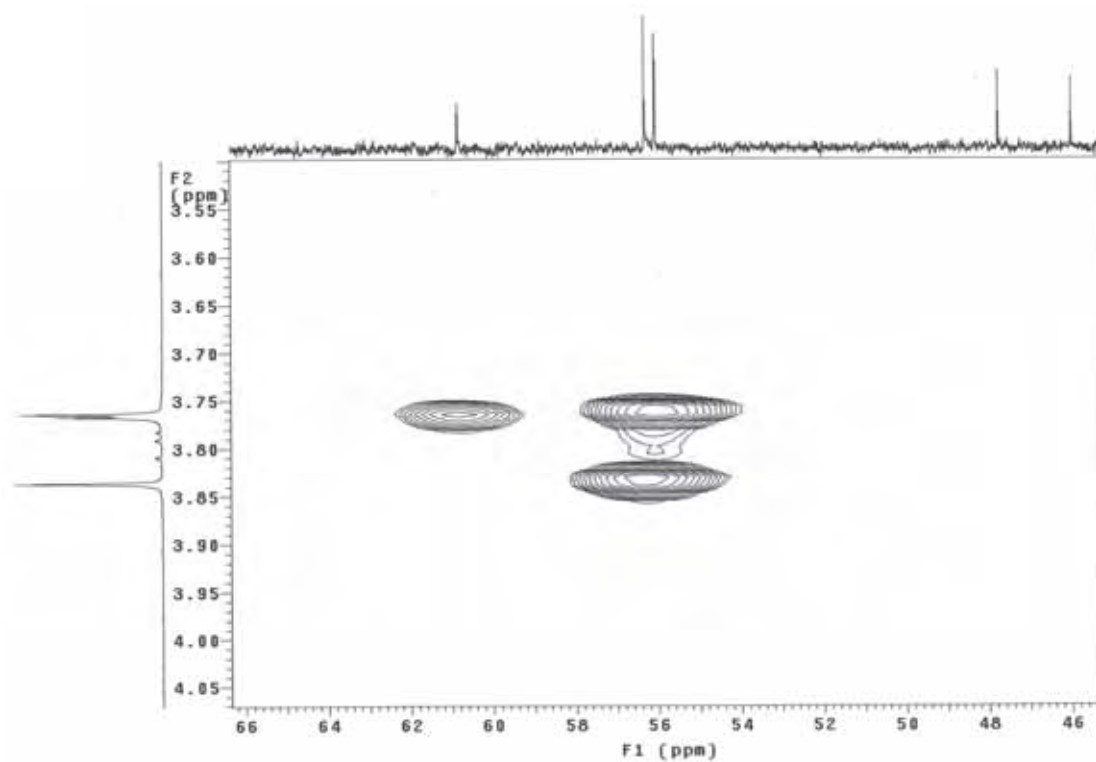
Espectro 72: Mapa de contorno gHMQC da substância 4.



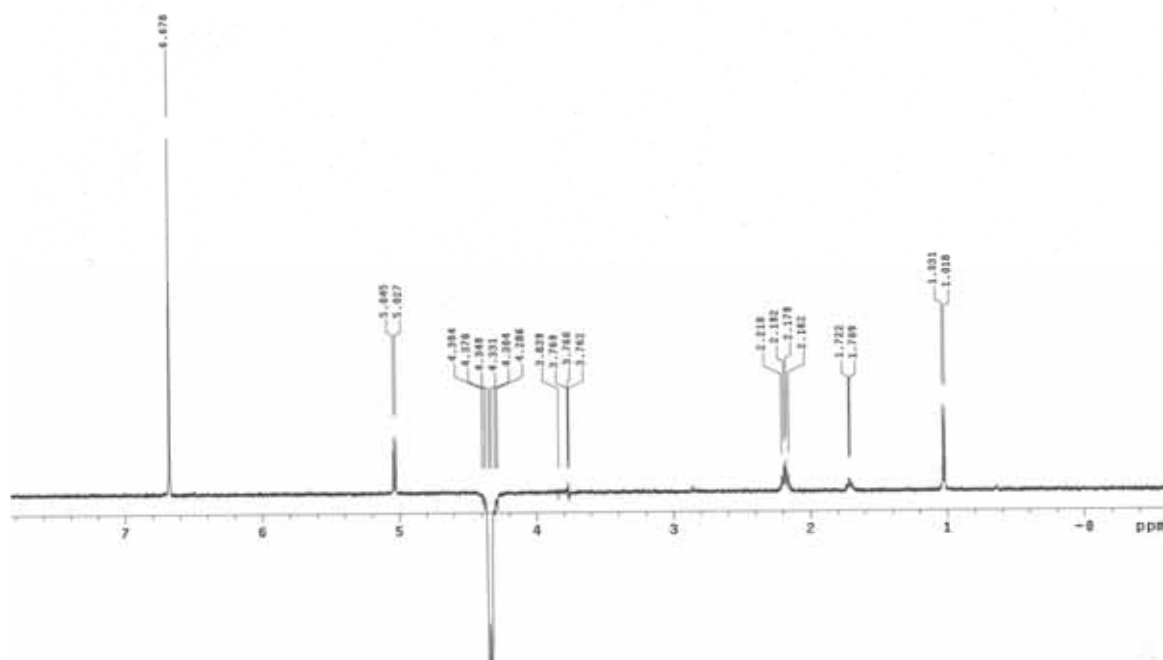
Espectro 73: Mapa de contorno gHMQC da substância 4 - expansão



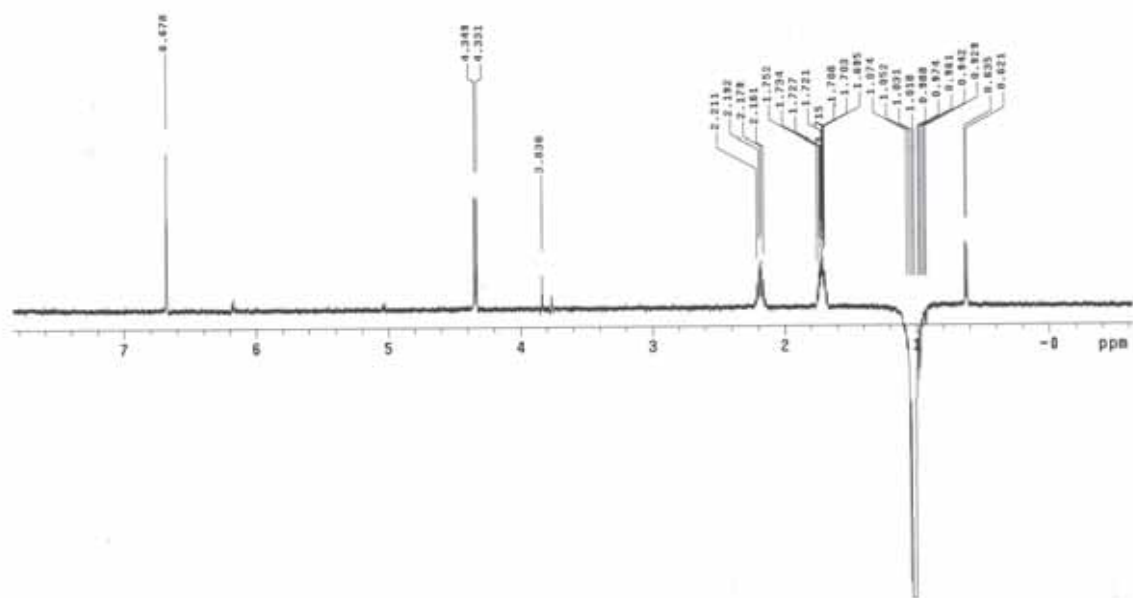
Espectro 74: Mapa de contorno gHMQC da substância 4 - expansão



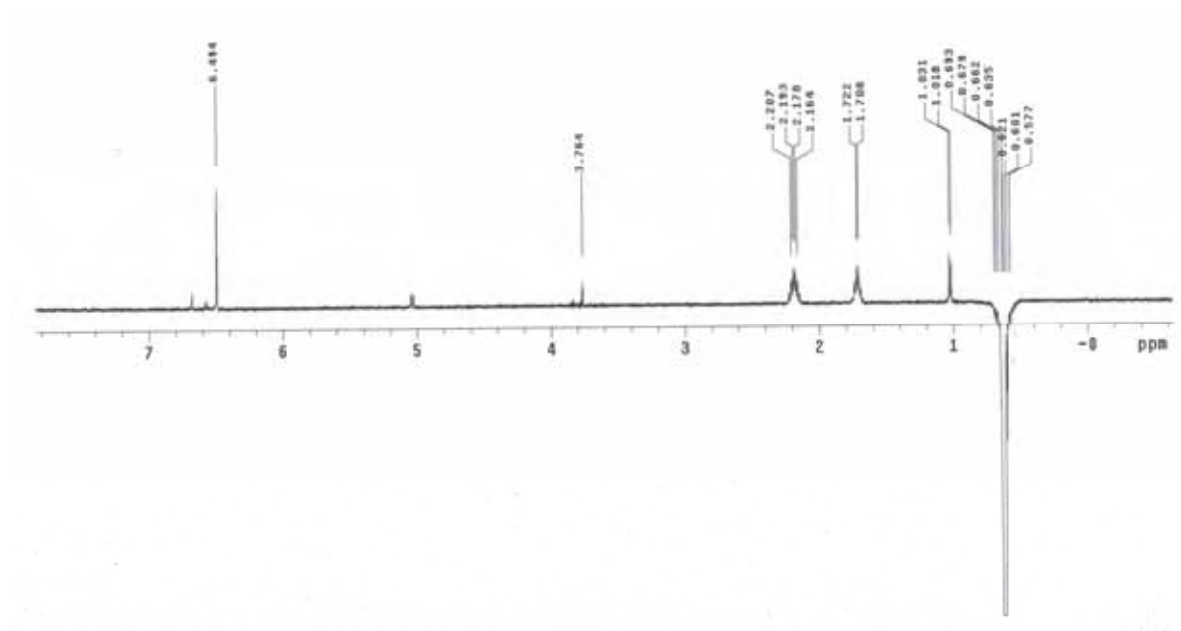
Espectro 75: Mapa de contorno gHMQC da substância 4 - expansão



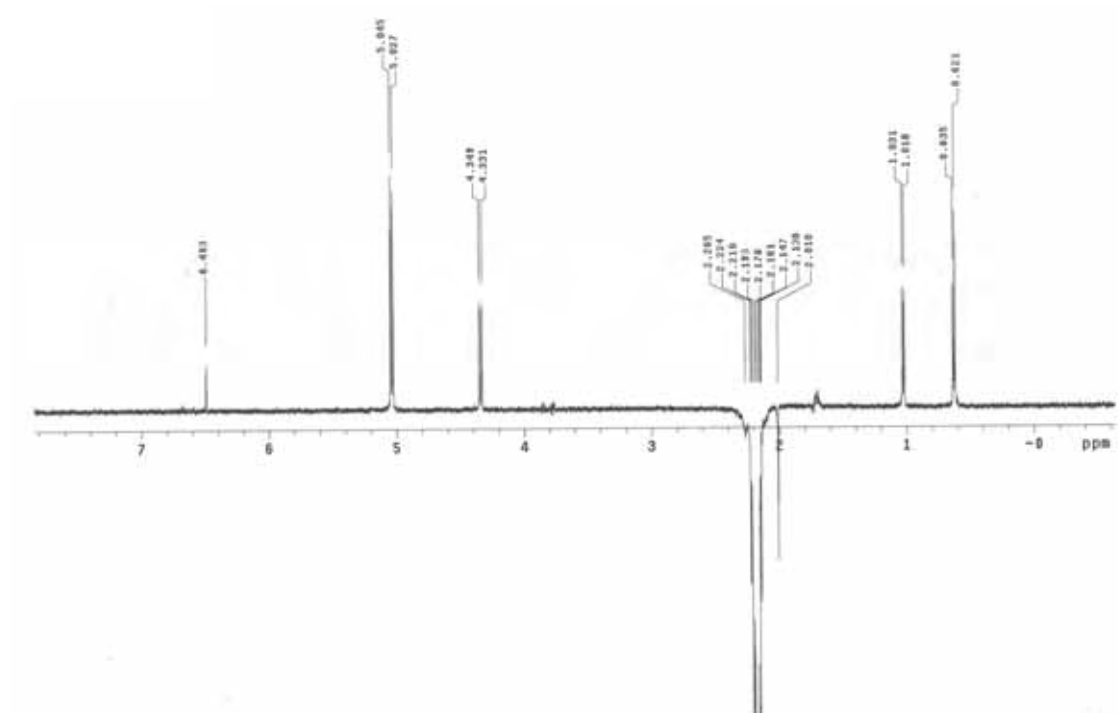
Espectro 76: Experimento de NOESY 1D da substância 4



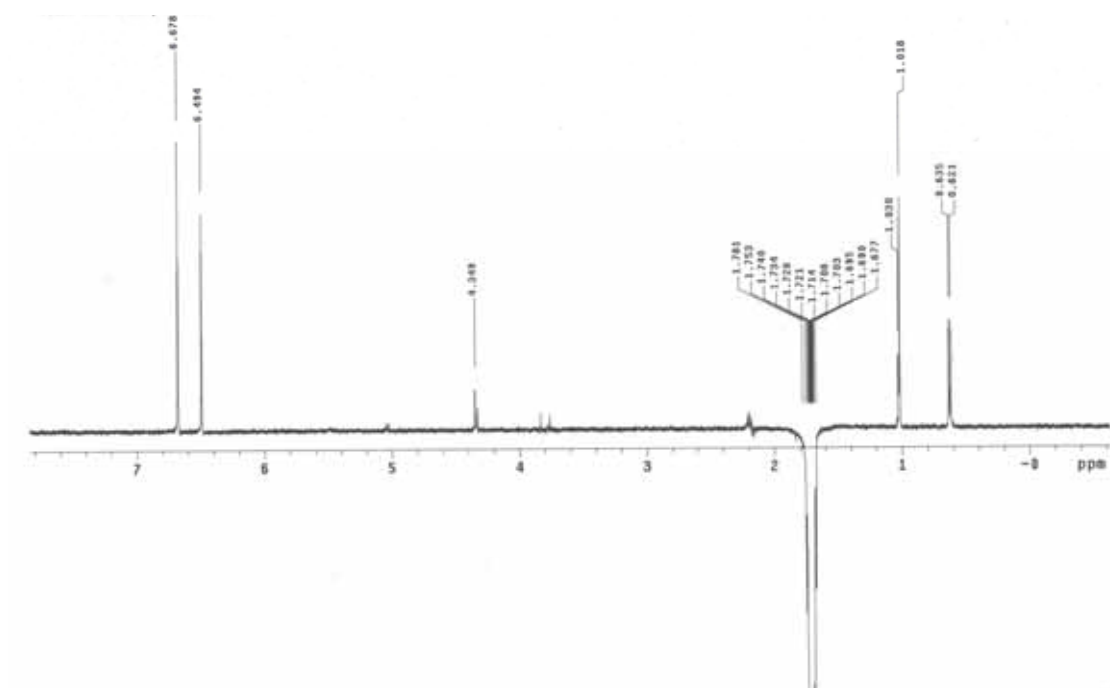
Espectro 77: Experimento de NOESY 1D da substância 4



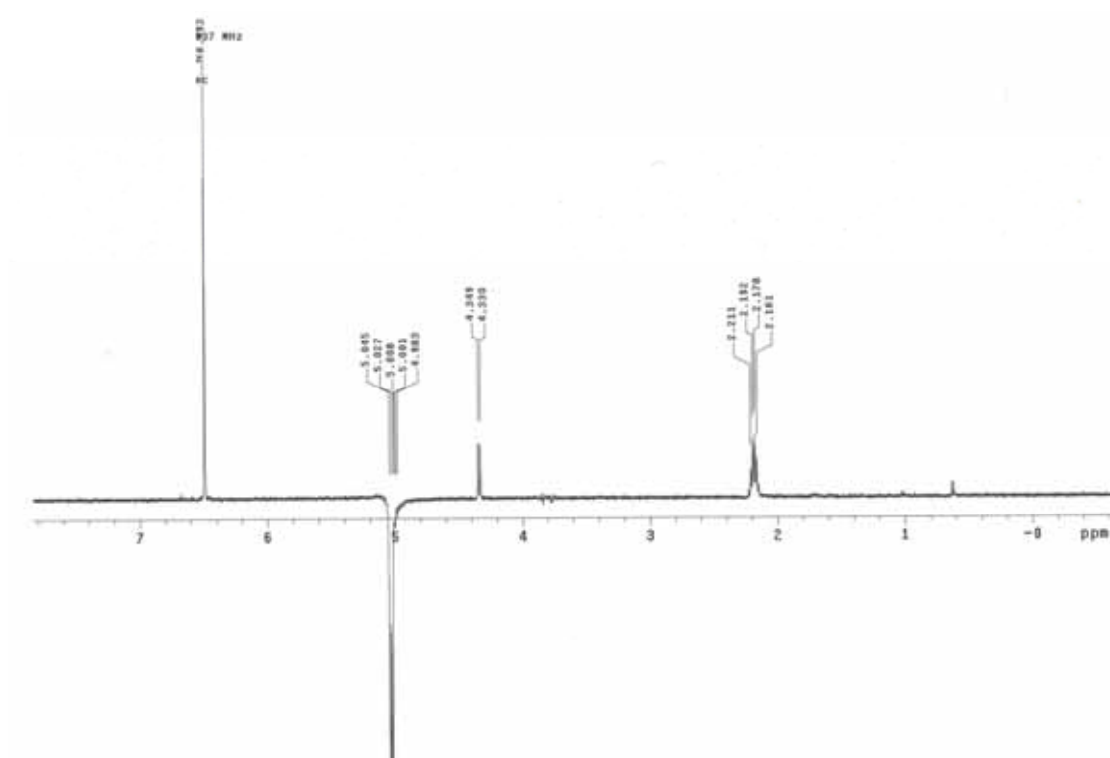
Espectro 78: Experimento de NOESY 1D da substância 4



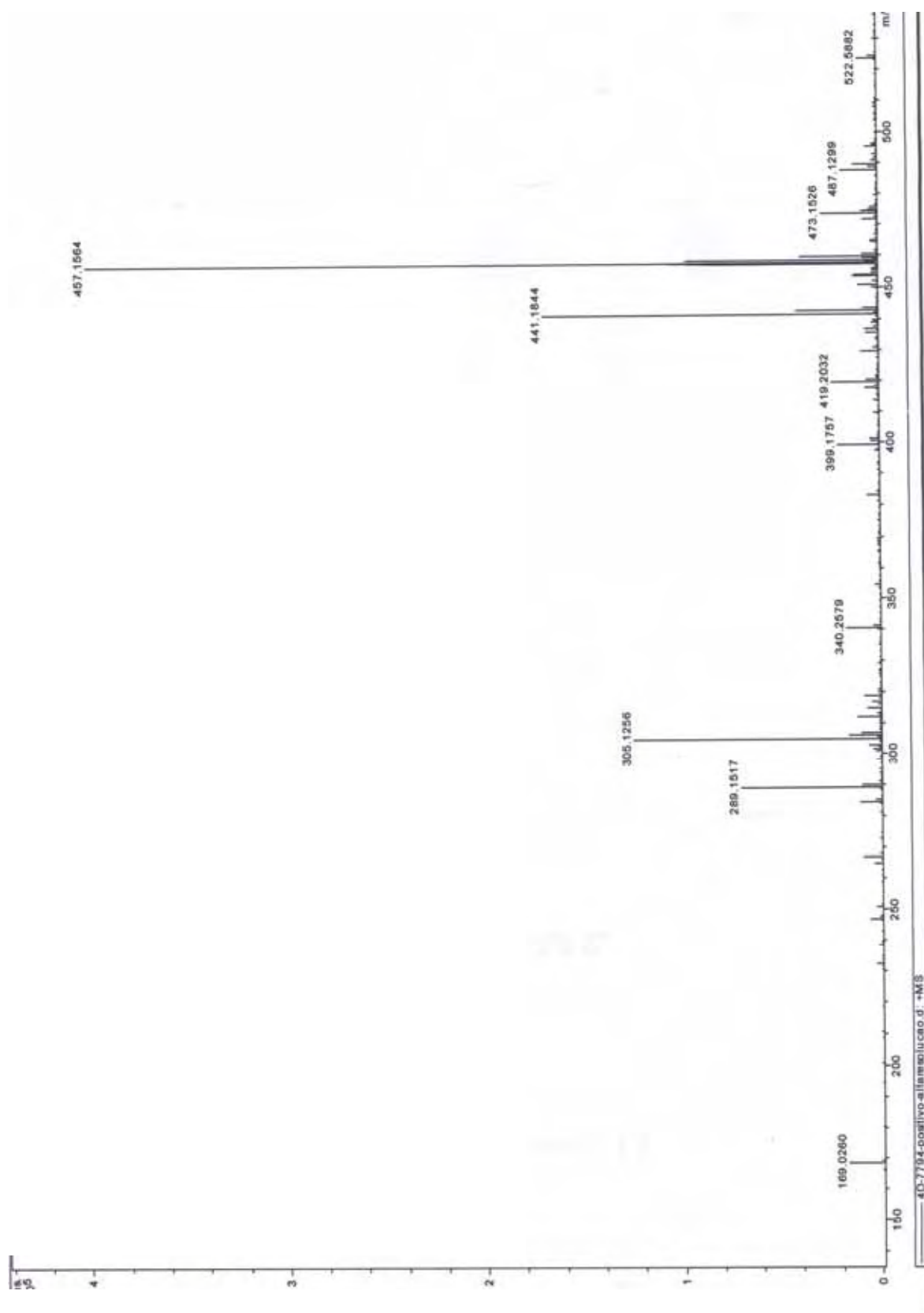
Espectro 79: Experimento de NOESY 1D da substância 4.



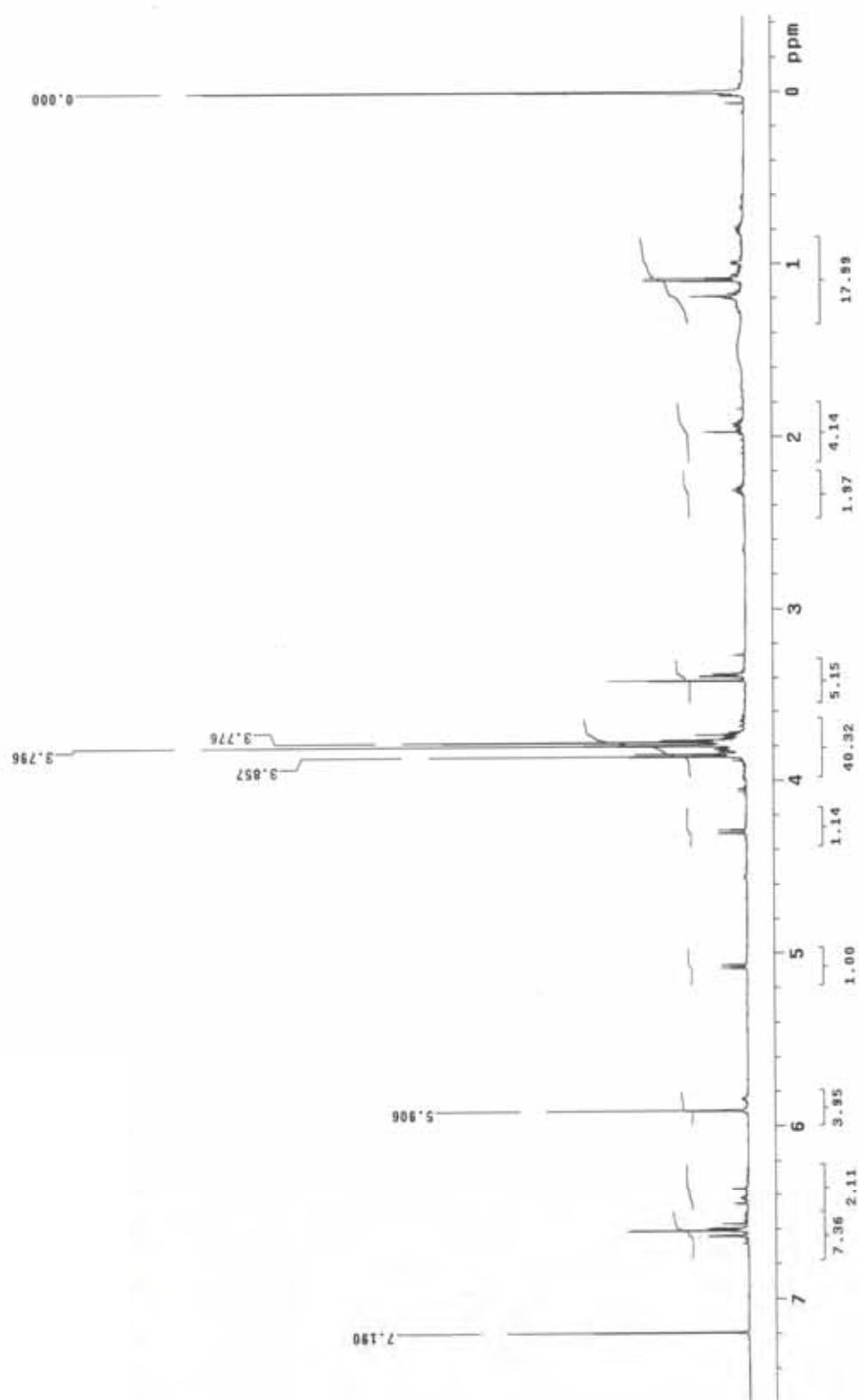
Espectro 80: Experimento de NOESY 1D da substância 4

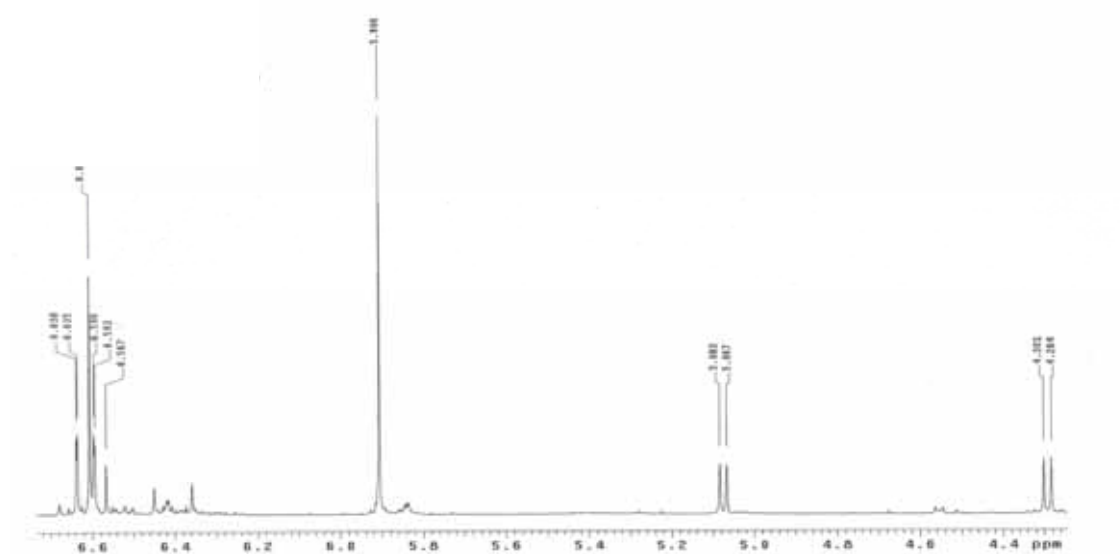
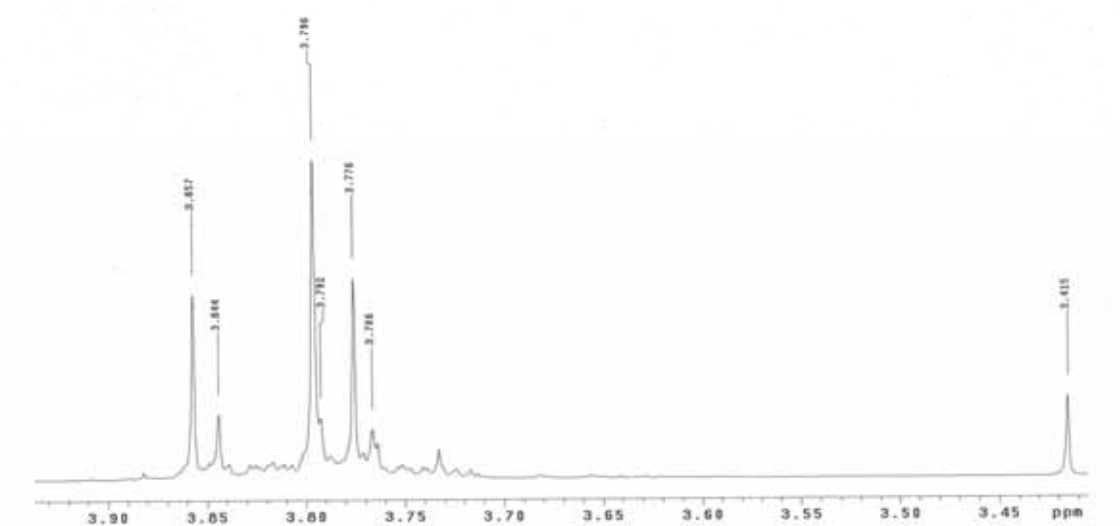
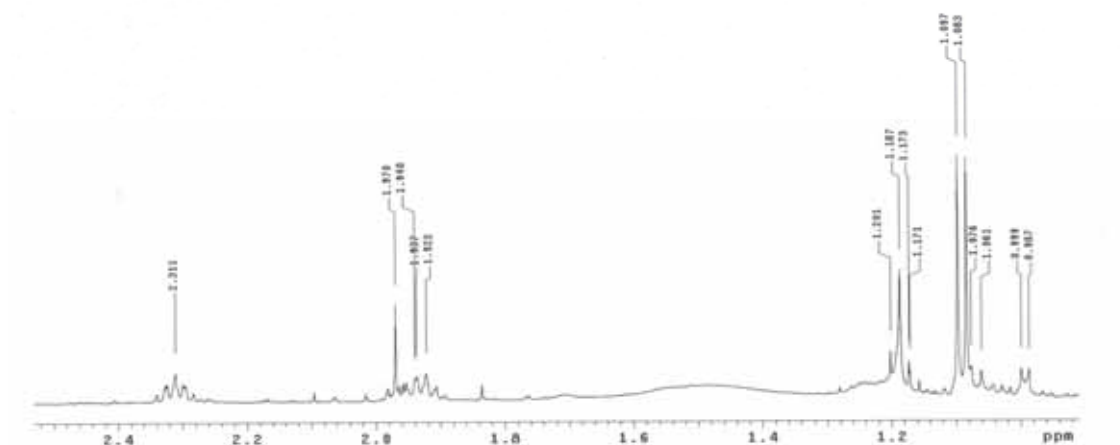


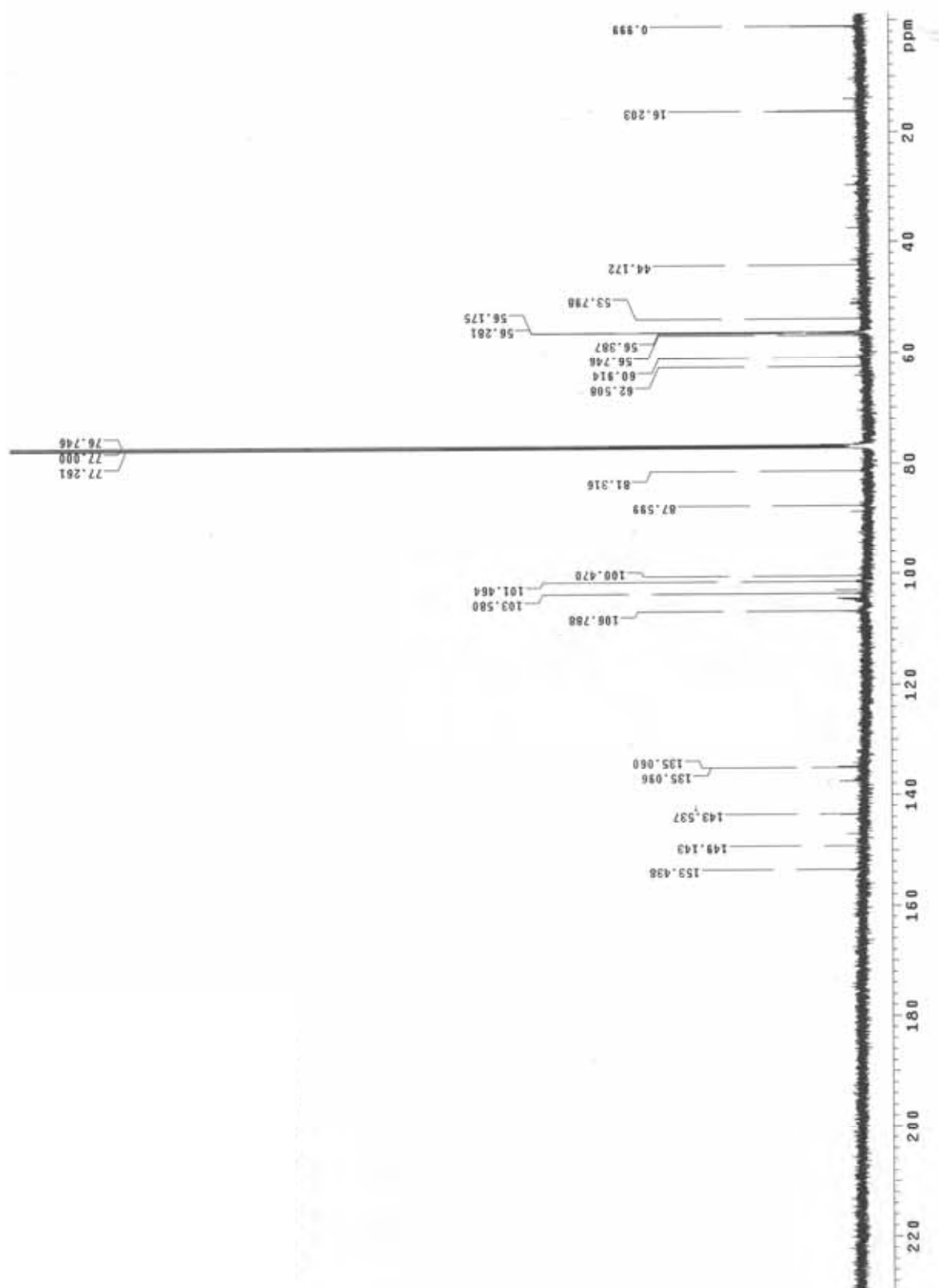
Espectro 81: Experimento de NOESY 1D da substância 4



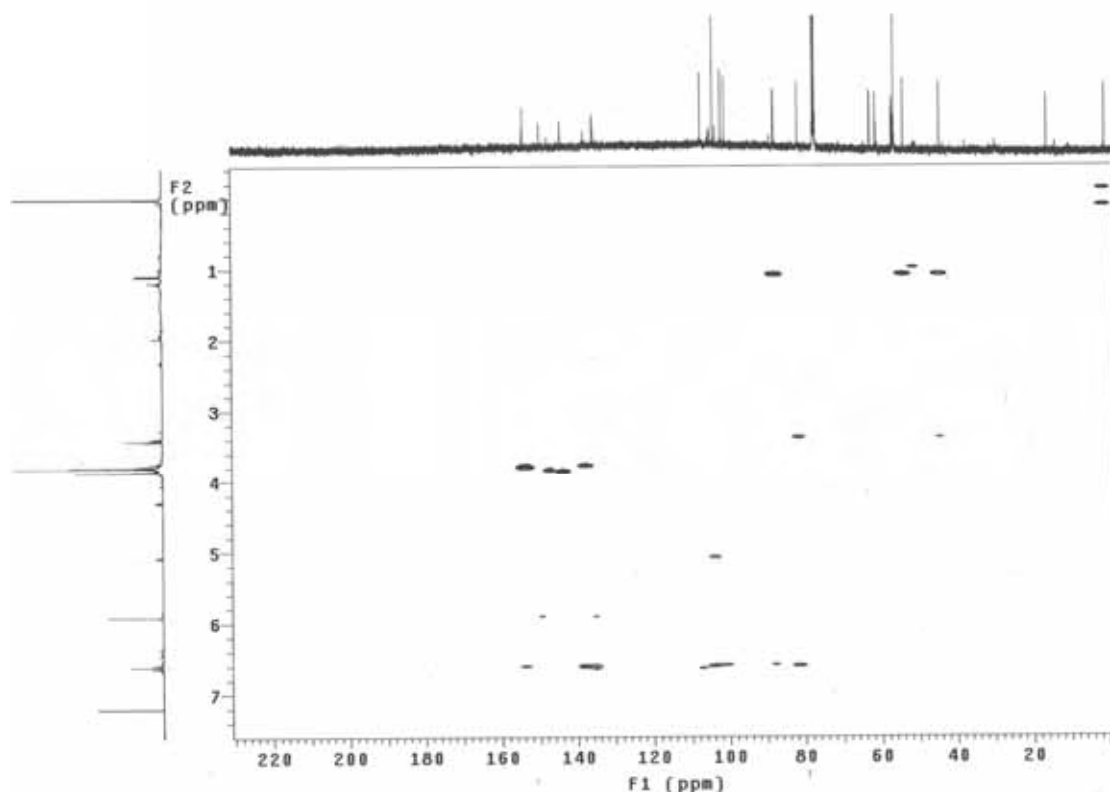
Espectro 82: Espectro de massas de alta resolução da substância 4

Espectro 83: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 5

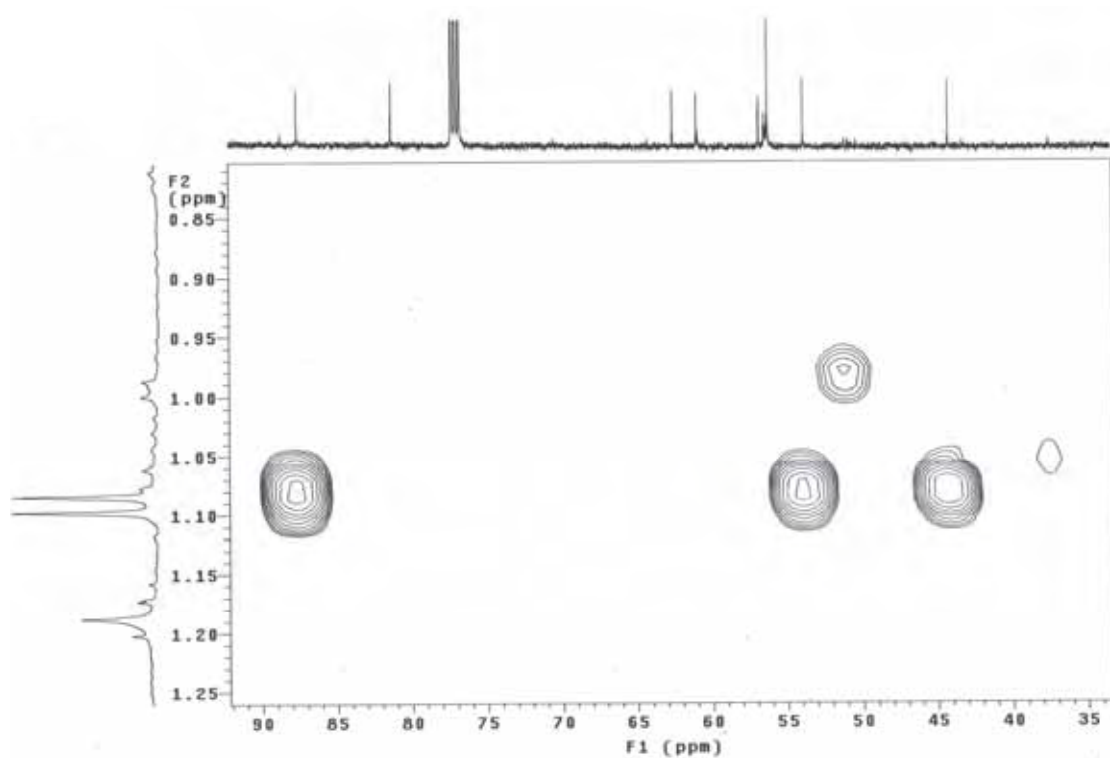




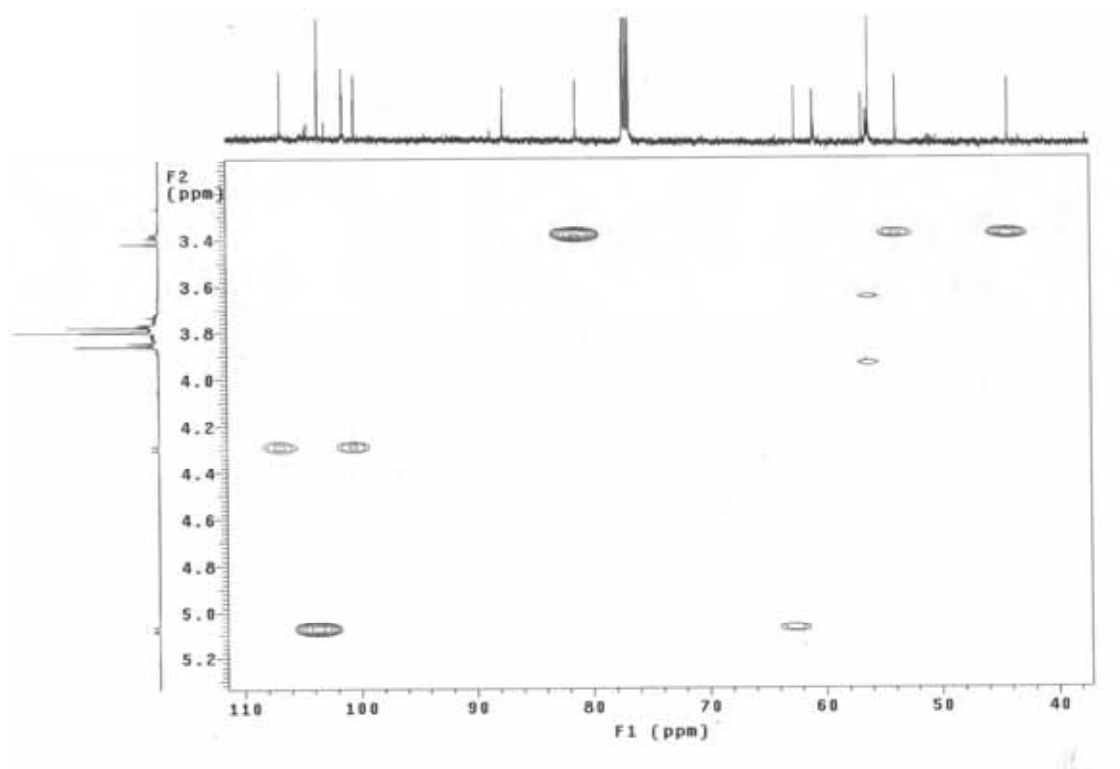
Espectro 87: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da substância 5.



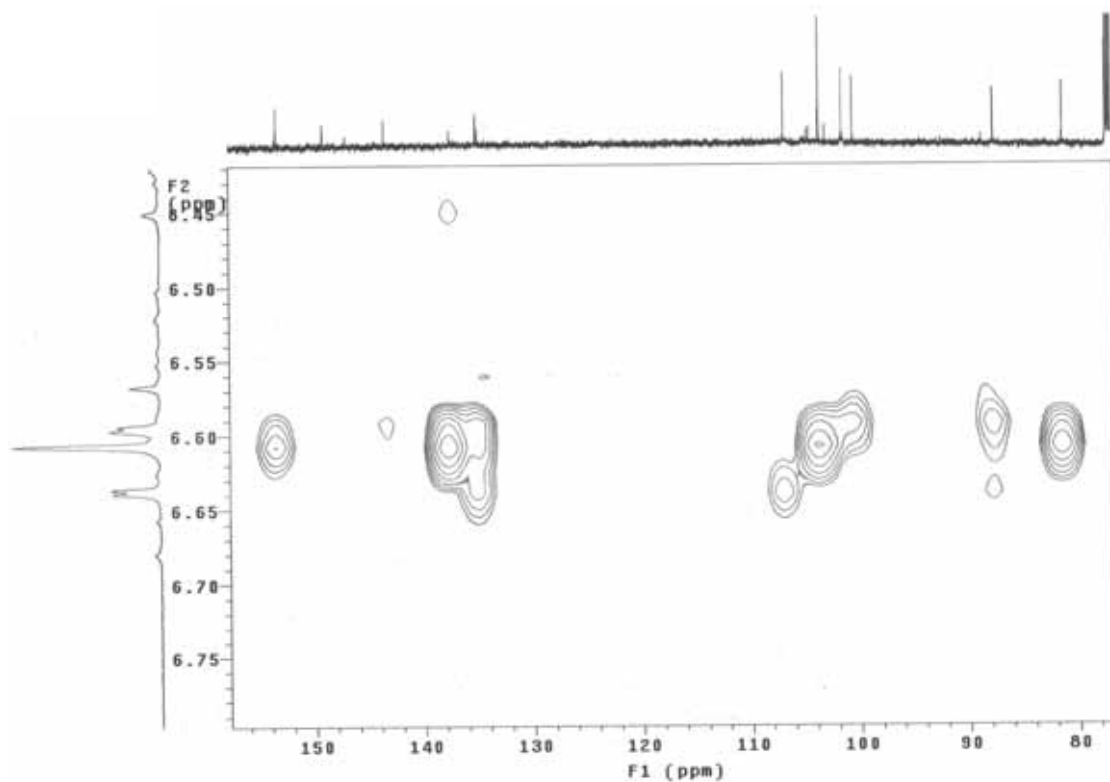
Espectro 88: Mapa de contorno gHMBC da substância 5.



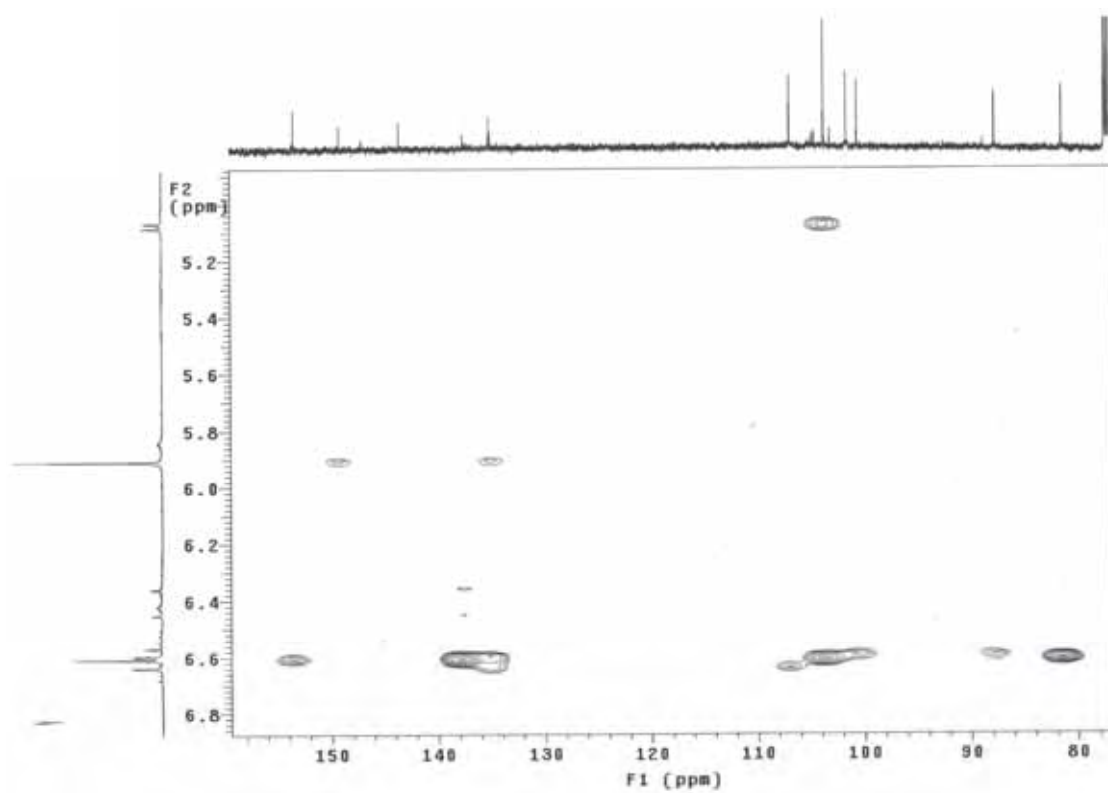
Espectro 89: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 – expansão.



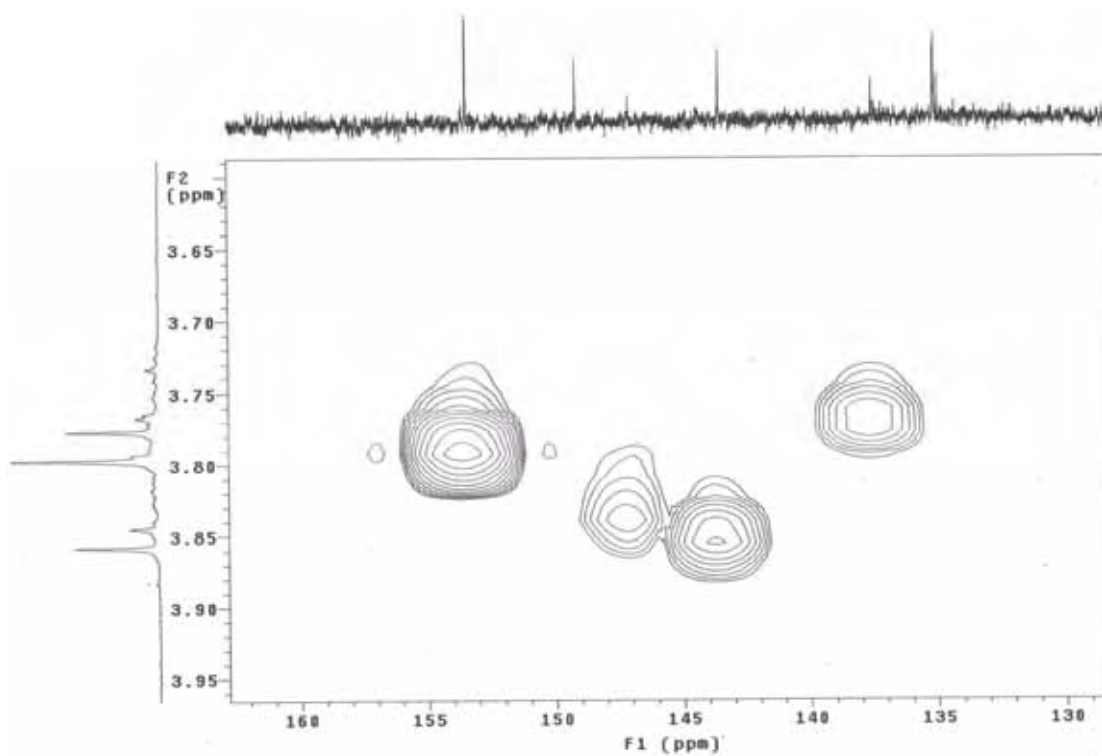
Espectro 90: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 – expansão.



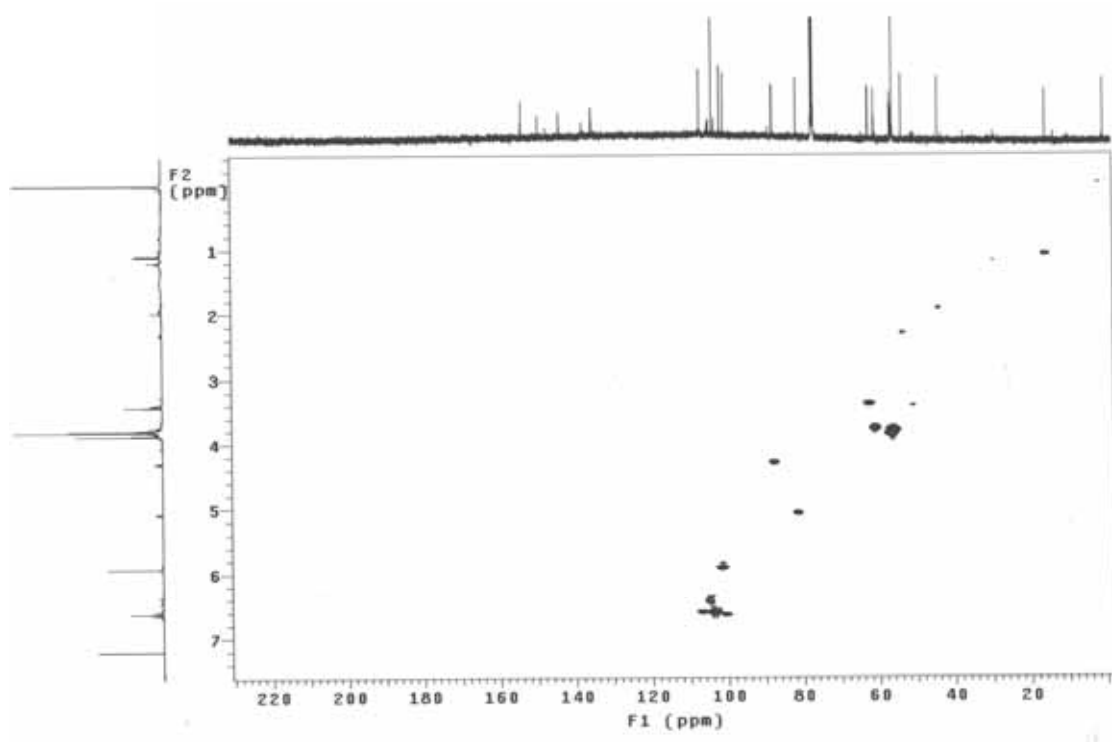
Espectro 91: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 – expansão.



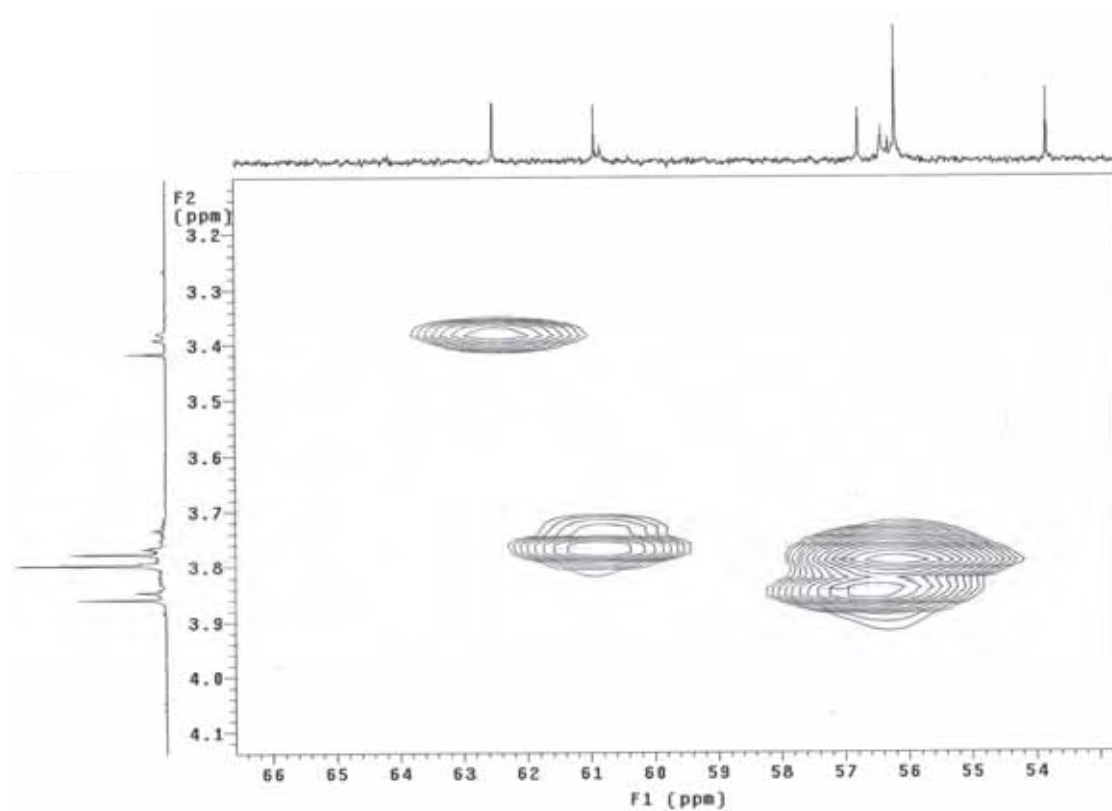
Espectro 92: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 – expansão.



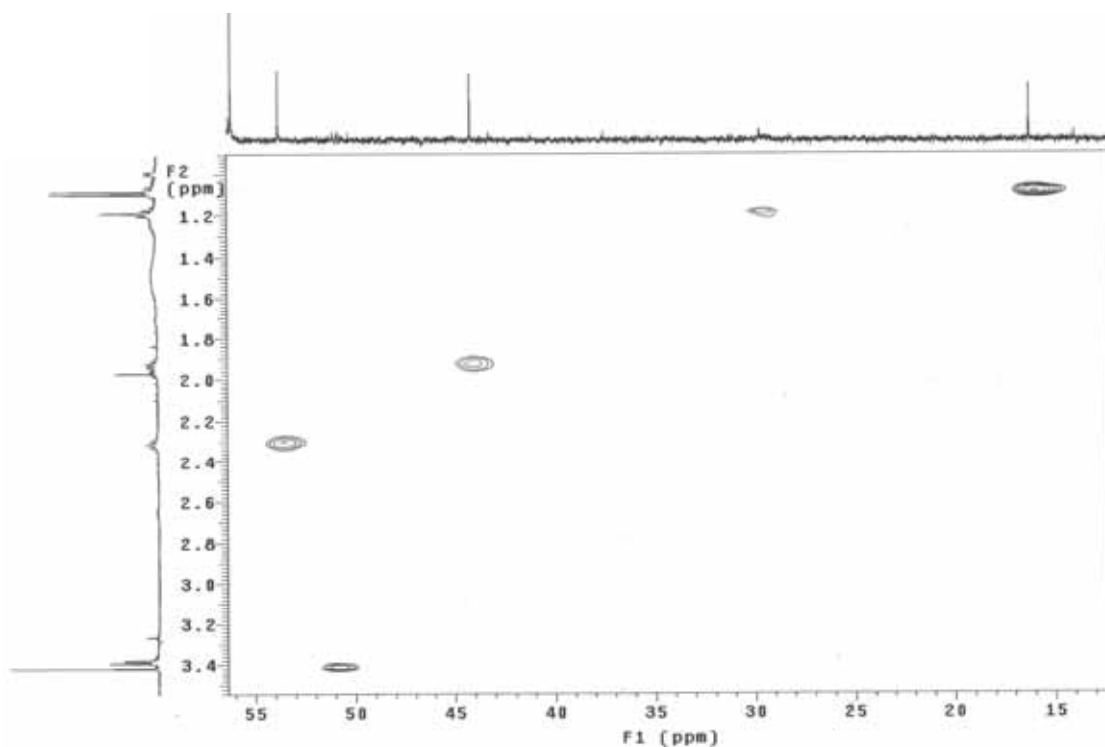
Espectro 93: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 – expansão.



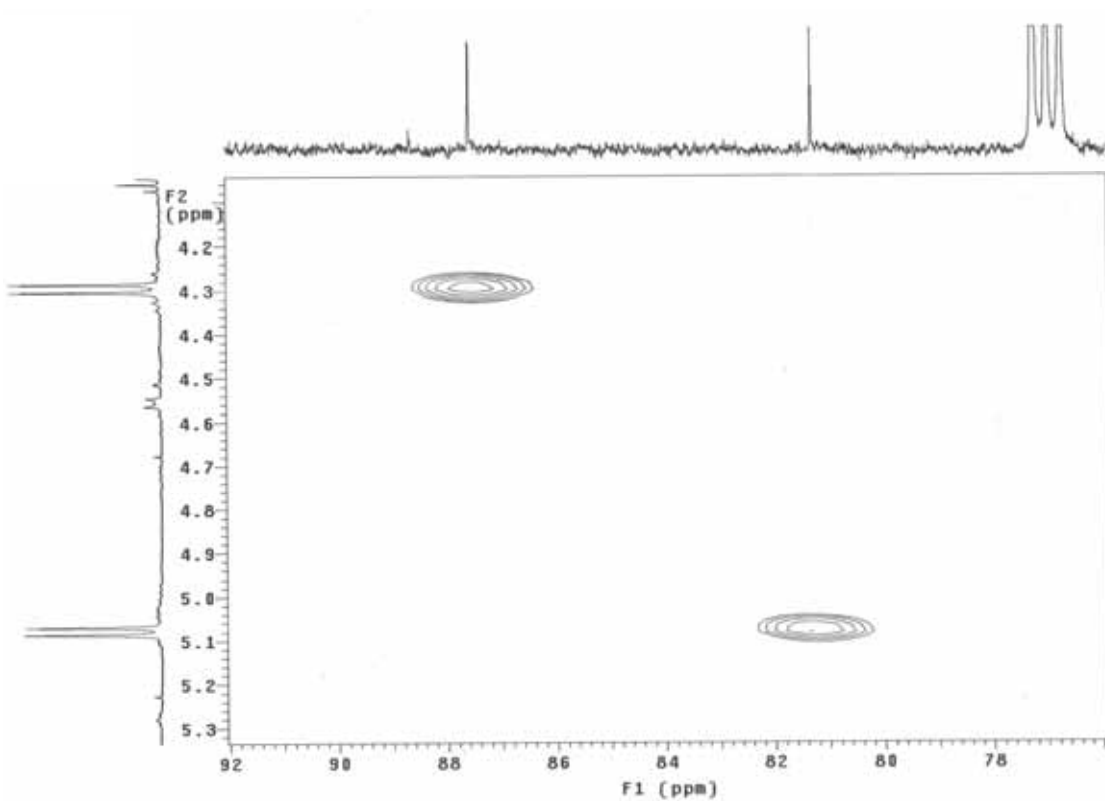
Espectro 94: Mapa de contorno gHMBC da substância 5.



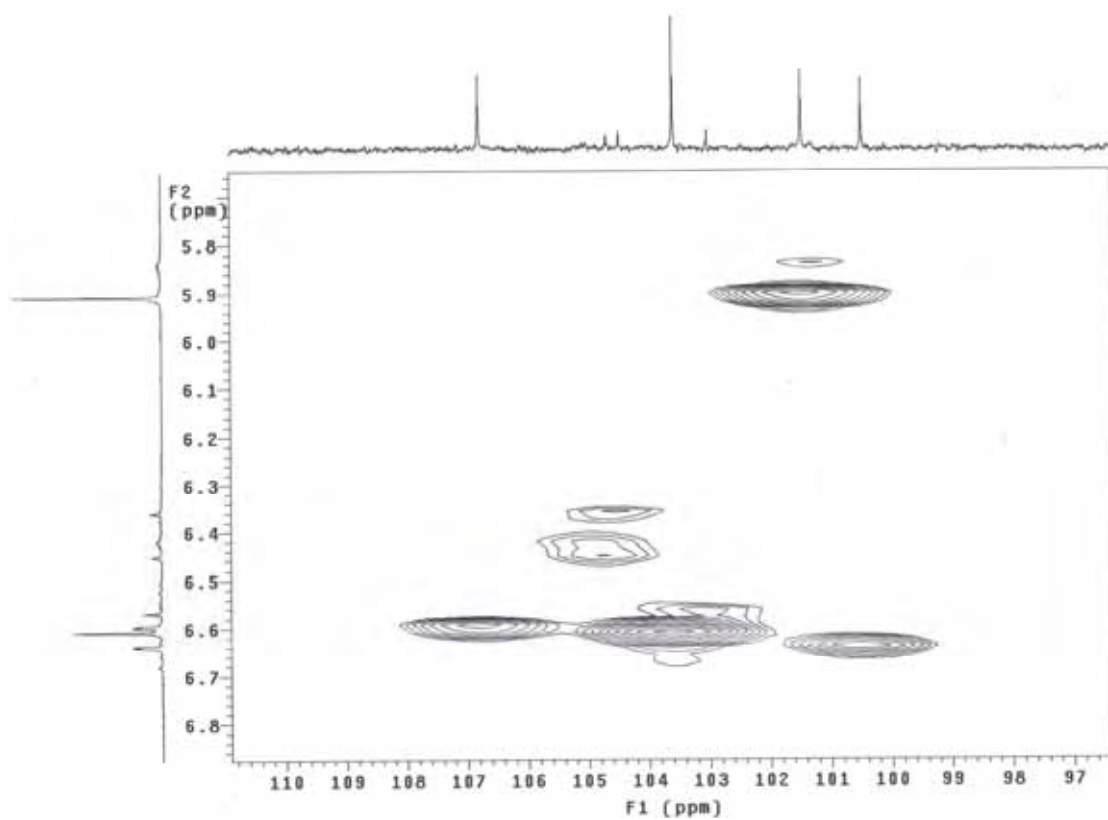
Espectro 95: Mapa de contorno gHMBC da substância 5 - expansão



Espectro 96: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 - expansão



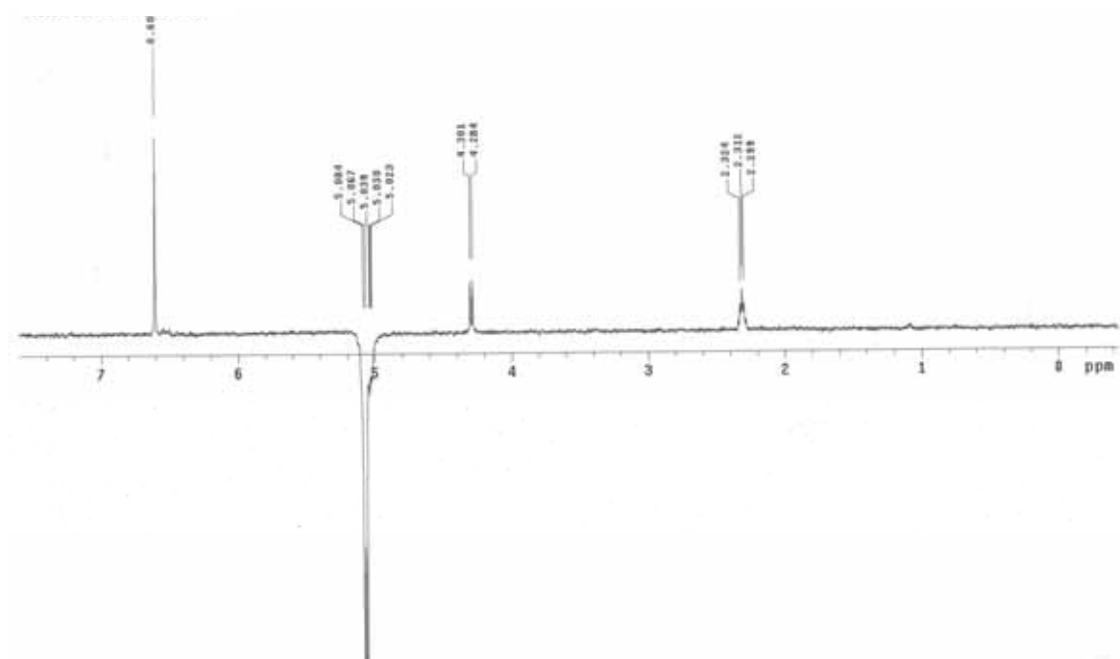
Espectro 97: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 – expansão



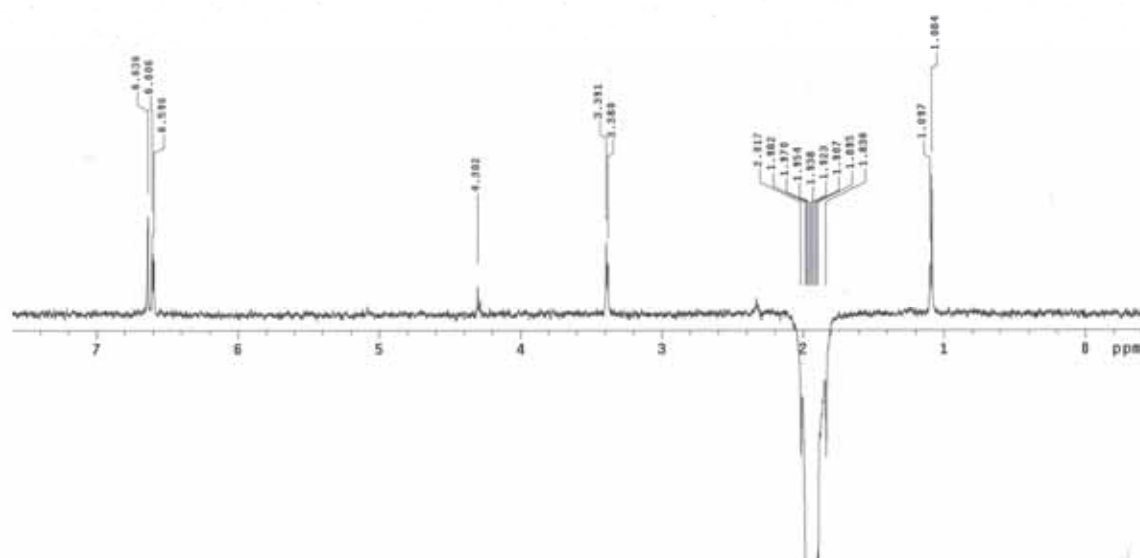
Espectro 98: Mapa de contorno gHMQC da substância 5 – expansão.



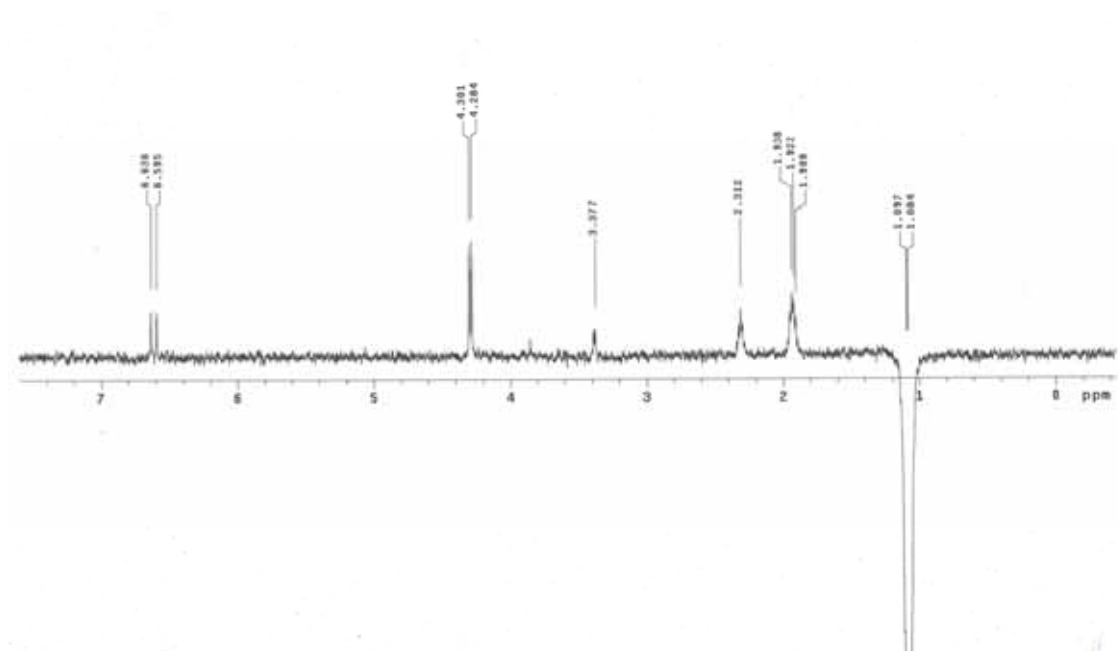
Espectro 99: Experimento de NOESY 1D da substância 5



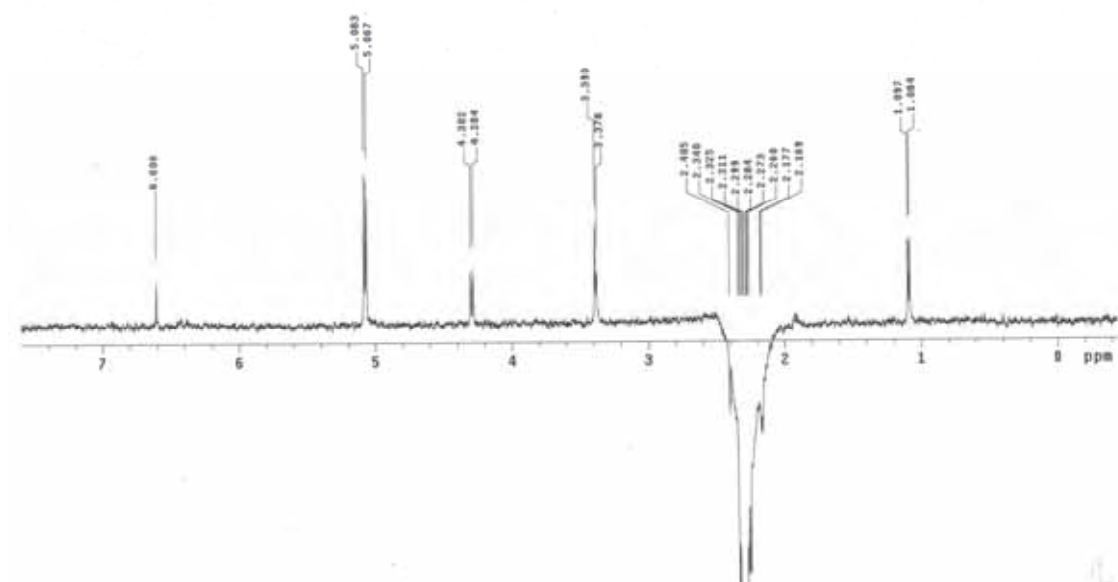
Espectro 100: Experimento de NOESY 1D da substância 5



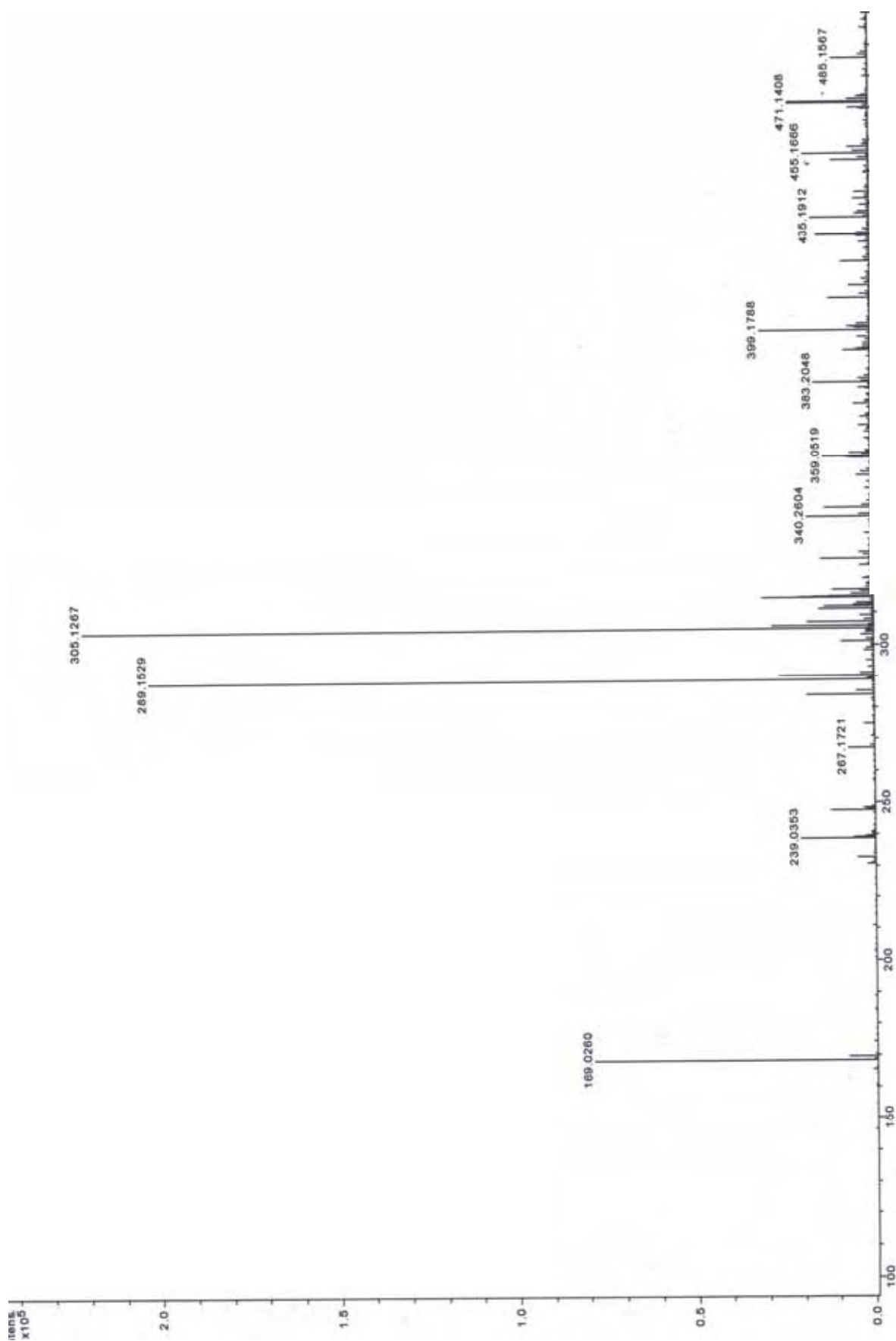
Espectro 101: Experimento de NOESY 1D da substância 5



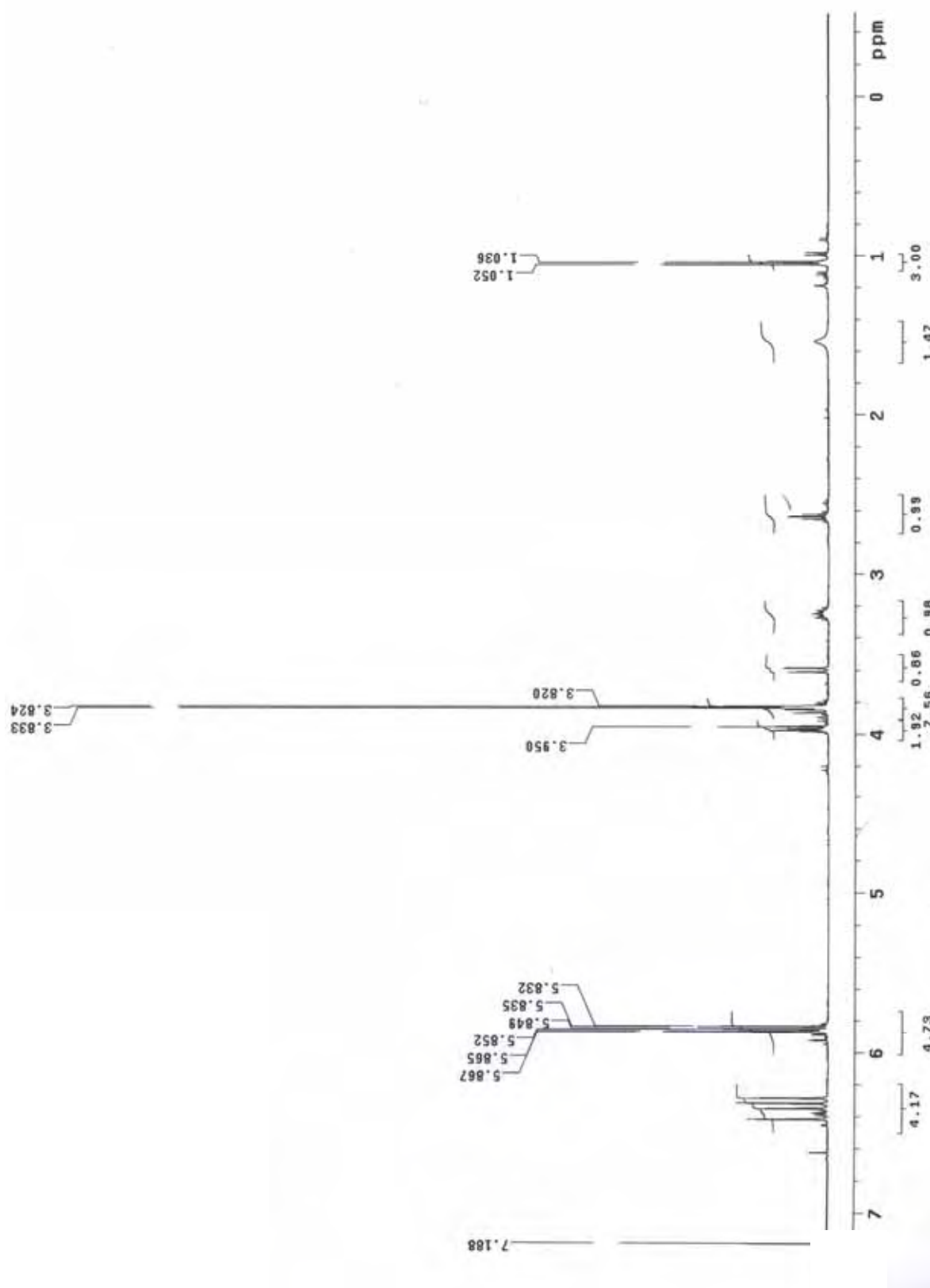
Espectro 102: Experimento de NOESY 1D da substância 5



Espectro 103: Experimento de NOESY 1D da substância 5



Espectro 104: Espectro de massas de alta resolução da substância 5.



Espectro 105: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **6**.