

Amanda Uliana de Carvalho

**Dinâmica metabólica em *Piper gaudichaudianum*:
estudo das etapas de ciclização estereosseletiva do
ácido gaudichaudiânico.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maysa Furlan
Coorientador: Dr. João Marcos Batista Junior

Araraquara

2014

AMANDA ULIANA DE CARVALHO

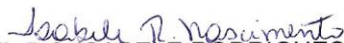
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 24 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. MAYSA FURLAN (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof^a. Dr^a. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof^a. Dr^a. SILVIA NOELÍ LÓPEZ
Universidad Nacional de Rosário / UNR / Rosário

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome	Amanda Uliana de Carvalho
Filiação	Renilda Uliana de Carvalho e Jader Santos de Carvalho
Nascimento	15/07/1987
Naturalidade	Vila Velha, ES
Nacionalidade	Brasileira
Estado Civil	Solteira
Profissão	Químico
E-mail	amandauliana@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

Curso: Licenciatura em Química

Instituição: Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Campus Vitória

Período: Maio/2006 - Dez/2009

Pós-Graduação

Curso: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

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

Projeto: Dinâmica Metabólica em *Piper gaudichaudianum*: estudos das etapas de ciclização estereosseletivas do ácido gaudichaudiânico

Financiamento: FAPESP

Orientadora: Maysa Furlan

Período: Agosto/2011 – atual

Estágios

Estágio Supervisionado em Docência (modalidade EJA)

Instituição: Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) – Vitória, ES.

Período: Agosto/2009 – Novembro/2009

Estágio Supervisionado em Docência

Instituição: EEEM Godofredo Schneider

Período: Março/2008 – Julho/2009

Estágio de Iniciação Científica

Área de Concentração: Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Núcleo de Biotecnologia – Vitória, ES.

Projeto: Bioprospecção de plantas da Mata Atlântica ao norte do rio Doce (ES): uma visão biotecnológica

Financiamento: FAPES

Orientadora: Patrícia Machado Bueno Fernandes

Período: Maio/2007 – Julho/2009

EXPERIÊNCIAS PROFISSIONAIS

Instituição: Colégio São José – Vila Velha, ES

Cargo: Professora de Química (Ensino Fundamental e Médio)

Período: Janeiro/2010 – Julho/2011

Instituição: Colégio Salesiano Nossa Senhora da Vitória – Vitória, ES

Cargo: Professora de Química Orgânica (Curso Técnico em Química - Projeto com a Secretaria de Educação do Espírito Santo)

Período: Maio/2010 – Julho/2011

Instituição: Colégio Salesiano Nossa Senhora da Vitória – Vitória, ES

Cargo: Professora de Química (Ensino Fundamental e Médio)

Período: Agosto/2010 – Dezembro/2010

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

RANGEL, T. B. A.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. F.; CARVALHO, A. U.; BENEVIDES, R. G.; SIMÕES, R. C.; SILVA, H. C.; BEZERRA, M. J. B.; NASCIMENTO, A. S. F.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; FERNANDES, P. M. B.; CAVADA, B. S. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**, Switzerland, v. 16, p. 5087-5103, 2011. DOI:10.3390/molecules16065087.

Trabalhos publicados em anais de congressos

CARVALHO, A. U.; BATISTA JR, J. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. The variable enantioselectivity in the biosynthesis of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum*. In: 4th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2013, Natal - RN.

RANGEL, T. B. A.; CARVALHO, A. U.; BENEVIDES, R. G.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; FERNANDES, P. M. B. Isolamento e Caracterização Parcial de Lectina Proveniente de Sementes da Espécie *Dioclea wilsonii* Standl. (Leguminosae - Fabaceae). In: 61^o Congresso Nacional de Botânica, 2010, Manaus - AM.

RANGEL, T. B. A.; CARVALHO, A. U.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; FERNANDES, P. M. B. Isolamento e Caracterização Parcial de Lectina Proveniente de Sementes da Espécie Vegetal *Andira frauxinifolia* (Leguminosae - Fabaceae). In: 61^a Reunião Anual da SBPC, 2009, Manaus - AM.

BENEVIDES, R. G. ; RANGEL, T. B. A.; CARVALHO, A. U.; CAVADA, B. S.; FERNANDES, P. M. B. Levantamento de lectinas em frações protéicas obtidas por extração em diferentes soluções a partir de farinha de sementes de *Swartzia apetala* Raddi. In: 59º Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal – RN.

Participações em eventos

4th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Natal, RN, Brazil, 2013.

São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry. Araraquara, SP, Brazil, 2013.

2º Encontro Nacional de Tecnologia Química. Salvador, BA, Brasil, 2009.

XLVIII Congresso Brasileiro de Química. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

3º Encontro Capixaba de Biossegurança. Vitória, ES, Brasil, 2008.

3ª Mostra Estadual de Ciência e Inovação. Vitória, ES, Brasil, 2008.

XXI Encontro Regional SBQ. Uberlândia, MG, Brasil, 2007.

II Workshop de Química do Espírito Santo "Química: Desenvolvimento Industrial / Urbano de Espírito Santo". Vitória, ES, Brasil, 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho em primeiro lugar ao Deus que eu sirvo e que sempre se fez presente em minha vida. E, também, à minha mãe e minha irmã que sempre me apoiaram com tanto amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que sempre me guardou e guiou meus passos, que me deu forças para lutar e fé para perseverar, que tudo fez em minha vida e tudo fará.

À minha orientadora, Prof^a. Maysa Furlan, que prontamente me aceitou como aluna e que sempre me ajudou. Obrigada pela confiança, carinho e dedicação.

Ao meu coorientador, Dr. João Marcos Batista Junior, que me ajudou imensamente no desenvolvimento deste trabalho e sempre esteve disposto a colaborar.

À minha mãe e minha irmã por me apoiarem, incentivarem e por dedicarem tanto carinho, atenção e amor. Obrigada por serem meu porto seguro.

A todos os familiares que sempre torceram por mim.

Ao meu namorado, Pedro Henrique, que mesmo na distância se manteve ao meu lado e me incentivou a lutar por meus objetivos. Obrigada pelo amor dedicado e por toda cumplicidade e companheirismo.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Química Orgânica.

Aos professores e amigos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) por toda colaboração e carinho.

Ao grupo de pesquisa de Biossíntese de Produtos Naturais por toda ajuda e convívio. Em especial à Dr^a. Andrea N. L. Batista que estava sempre disposta a ajudar mesmo a distância, e ao Amauri Alves Junior pelas discussões produtivas e pela amizade.

Aos funcionários do IQ por toda simpatia, dedicação e competência.

Ao Dr. Nivaldo Borale e Dr^a. Lucinéia Vizzoto pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e pelas importantes discussões.

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

À Prof^a. Maria Célia Bertolini e ao doutorando Thiago Candido pela ajuda nos experimentos de eletroforese.

À Prof^a. Ana Marisa Fusco e a doutoranda Fernanda Gullo pela realização dos ensaios antifúngicos.

Ao Prof. Massuo J. Kato pela colaboração e participação neste trabalho.

Aos amigos verdadeiros que fiz, em especial, Andressa Somensi, Rebeca P. Medina, Mariana Fonseca, Gabriel Mazzi e Jeferson H. Franco pela amizade, carinho e paciência. Obrigada por terem sido minha família nessa cidade.

À Paula Carolina Bueno pelo companheirismo, carinho e paciência que tornou menos dolorida a distancia da minha família.

À FAPESP pelo financiamento que tornou possível a realização deste projeto.

No caminho da sabedoria, te ensinei e, pelas carreiras direitas, te fiz andar.
Por elas andando, não se embaraçarão os teus passos; e, se correres, não
tropearás.
(Bíblia Sagrada, Provérbios 4:11-12)

RESUMO

A família Piperaceae compreende aproximadamente 4000 espécies, sendo que o gênero *Piper* é o mais abundante. Muitas espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades. A ampla potencialidade biológica dessa família deve-se ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos secundários, dentre os quais, destacam-se os derivados prenilados do ácido *p*-hidroxibenzoico e seus produtos ciclizados, denominados cromenos e/ou cromanos, que apresentam como característica química fundamental a presença de um anel pirano fundido a um anel benzeno. A espécie *Piper gaudichaudianum* em particular, apresenta em sua constituição o ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico, conhecido como ácido gaudichaudiânico, um cromeno prenilado que além de ser o metabólito majoritário em folhas e raízes dessa espécie, possui conhecida atividade tripanocida e antifúngica frente a fitopatógenos. Estudos químicos mostraram a rara presença das duas formas isoméricas naturais, (+)-*S* e (-)-*R*, do ácido gaudichaudiânico, durante o isolamento desse composto, despertando ainda mais o interesse na avaliação de suas etapas biossintéticas. Logo, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar a etapa de formação dos enantiômeros, que devem ser formados durante o processo de ciclização de um intermediário geranilado derivado do ácido benzoico para a formação do anel benzopirânico. As propostas de ciclização química e enzimática foram avaliadas utilizando como precursor o ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil)benzoico conhecido como ácido myrsinoico A, identificado e isolado da espécie *P. gaudichaudianum*. Alguns testes para a avaliação da possibilidade da ciclização se dar por métodos químicos mostrou que em meio ácido e sob aquecimento não foi observada a formação do ácido gaudichaudiânico, o que demonstra que a ciclização pode ocorrer por via enzimática, pela atuação de uma enzima ciclase. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando extratos proteicos solúveis e insolúveis (fração microssomal) obtidos das folhas *P. gaudichaudianum*, nas condições de extração de enzimas ciclases análogas, e o ácido myrsinoico A como precursor. A atividade enzimática da enzima ciclase foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência e não mostrou a formação do ácido gaudichaudiânico nas condições pré-estabelecidas. Esses resultados demonstram que a formação do anel benzopirânico pode ter como principal precursor o derivado epoxidado nas posições C-2' e C-3' do ácido myrsinoico A, ou mesmo o ácido benzoico monogeranilado, sendo que a prenilação subsequente ocorre após a etapa de ciclização. Dessa forma, abre-se novas possibilidades de estudo dos aspectos mecanísticos envolvidos na biossíntese desse importante metabólito secundário.

ABSTRACT

The Piperaceae family comprises about 4000 species, and the genus *Piper* is the most abundant. Many species of this genus are used in folk medicine to treat various diseases. The wide biological potential of this family is due to the accumulation of different classes of secondary metabolites, among which stand out the prenylated derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid and its cyclized products, known as chromenes and/or chromanes, which are characterized by the presence of a pyran ring fused with a benzene moiety. *Piper gaudichaudianum*, in particular, presents in its constitution the 2-methyl-2-(4'-methyl-3'-pentenyl)-8-(3''-methyl-2-butenyl)-2*H*-1-chromene-6-carboxylic acid, known as gaudichaudianic acid, a prenylated chromene that is the major metabolite in leaves and roots of this species. This compound has shown trypanocidal and antifungal activities. Chemical studies demonstrated the presence of two naturally occurring rare isomeric forms, (+)-*S* and (-)-*R*, gaudichaudianic acid, arousing the interest in further evaluations of their biosynthetic steps. Therefore, the present work aimed to study the biosynthetic pathway related to the cyclization step leading to the enantiomers of gaudichaudianic acid using prenylated benzoic acid derivatives as intermediates. The proposed chemical and enzymatic cyclizations were evaluated using as the precursor the 3-geranyl-4-hydroxy-5-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoic acid, known as myrsinoic acid identified and isolated from *P. gaudichaudianum*. To evaluate the possibility of cyclization occur by chemical methods acidic media and heating conditions were used. Under these conditions the formation of gaudichaudianic acid was not observed, which shows that the cyclization may occur enzymatically, catalyzed by a cyclase-type enzyme. Enzyme assays were performed using soluble and microsomal fractions obtained from the leaves *P. gaudichaudianum* and using the 3-geranyl-4-hydroxy-5-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoic acid as the precursor. The cyclase-type enzymatic activity was evaluated by liquid chromatography. The results also showed no formation of gaudichaudianic acid under these pre-determined conditions. These results demonstrated that the formation of the benzopyran ring could occur by an enzyme that requires another precursor, possibly a myrsinoic acid epoxide derivative or a monogeranylated benzoic acid derivative, in which the second prenylation would occur after the cyclization step leading to the benzopyran ring. These results open up new possibilities for studying the mechanistic aspects involved in the biosynthesis of this important secondary metabolite.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
AA	aminoácidos
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
Cl ₅₀	concentração inibitória a 50%
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
δ	deslocamento químico
d	duplete
DAD	detector de arranjo de diodo
ddc	duplo duplete coalescido
DMAPP	pirofosfato de dimetilalila
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	espectrometria de massas
ESI	ionização por eletrospray
EtOH	etanol
GPP	pirofosfato de geranila
<i>J</i>	constante de acoplamento
m	multiplete
m/v	relação massa/volume
m/z	relação massa/carga
MeOH	metanol
MEP	via metabólica do metileritritol
MM	massa molecular
Multipl.	multiplicidade
MVA	via metabólica do mevalonato
P.A.	pureza analítica
pI	ponto isoelétrico
PM	peso molecular
PSA	persulfato de amônio
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RMN	ressonância magnética nuclear
s	simpleto
SN	sobrenadante
t	tripleto
t*	tripleto aparente
TCA	ciclo da ácido tricarboxílico
TEA	triethylamônia
TEMED	tetrametiletlenodiamina
TMS	trimetilsulfóxido
tq	tripleto de quintuplete
t _R	tempo de retenção
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
v/v	relação volume/volume

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Etapas do isolamento de 1 por cromatografia líquida de baixa pressão	34
Esquema 2 -	Etapas do isolamento de 2 por cromatografia líquida de alta eficiência	36
Esquema 3 -	Extração de proteínas das folhas de <i>P. gaudichaudianum</i>	39
Esquema 4 -	Precipitação Salina	40
Esquema 5 -	Preparação do extrato proteico microssomal	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Substâncias com atividades biológicas extraídas de espécies do gênero <i>Piper</i>	24
Figura 2 -	<i>Piper gaudichaudianum</i>	24
Figura 3 -	Estrutura do ácido gaudichaudiânico e predição das vias biossintéticas envolvidas na sua formação em <i>P. gaudichaudianum</i>	26
Figura 4 -	Proposta biossintética para o ácido gaudichaudiânico.	27
Figura 5 -	Formas enantioméricas do ácido gaudichaudiânico	27
Figura 6 -	Proposta de racemização pós-biossíntese	28
Figura 7 -	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1	57
Figura 8 -	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1	58
Figura 9 -	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1	59
Figura 10 -	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1	60
Figura 11 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1	61
Figura 12 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 1	62
Figura 13 -	Espectro de massas de 1 por eletrospray e modo negativo	63
Figura 14 -	Cromatograma da mistura racêmica de 1 e espectros no UV	64
Figura 15 -	Cromatograma do enantiômero 1.1	64
Figura 16 -	Cromatograma do enantiômero 1.2	65
Figura 17 -	Estrutura química dos precursores propostos para 1	66
Figura 18 -	Cromatograma da Fração F5 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 30,78 min.	66
Figura 19 -	Ampliação do cromatograma da Fração F5 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 30,19 min.	67
Figura 20 -	Cromatograma da Fração F9 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 24,27 min.	67
Figura 21 -	Cromatograma de P4, espectros de massas (IES, modo negativo) e no ultravioleta da substância selecionada para isolamento	69
Figura 22 -	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2	72
Figura 23 -	Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2	73
Figura 24 -	Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2	74
Figura 25 -	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2	75
Figura 26 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2	76
Figura 27 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2	77

Figura 28 -	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	81
Figura 29 -	Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	82
Figura 30 -	Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	83
Figura 31 -	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	84
Figura 32 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	85
Figura 33 -	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de 2 isolado a partir de <i>M. cuneifolia</i>	86
Figura 34 -	Representação da densidade eletrônica do ácido myrsinóico	87
Figura 35 -	Proposta de ciclização química do anel cromeno	88
Figura 36 -	Cromatogramas da avaliação do precursor 2 em Meio ácido	89
Figura 37 -	Cromatogramas da avaliação do precursor 2 em diferentes temperatura (Solvente AcOEt)	89
Figura 38 -	Cromatogramas da avaliação do precursor 2 em diferentes temperatura (Solvente EtOH)	90
Figura 39 -	Perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i>	92
Figura 40 -	Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático solúvel, avaliados nos tempos de 30 min e 1 hora.	94
Figura 41 -	Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático solúvel avaliados nos tempos de 12 e 24 horas.	95
Figura 42 -	Cromatograma do Branco 2 com ácido gaudichaudiânico	96
Figura 43 -	Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático microssomal, avaliados nos tempos de 30 min e 1 hora.	97
Figura 44 -	Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático solúvel, avaliados nos tempos de 12 e 24 horas.	98
Figura 45 -	Novas propostas biossintéticas para formação de 1 .	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas presentes na solução padrão e suas respectivas massas moleculares	43
Tabela 2 - Gradiente de voltagem para focalização isoeletrica de fitas de 13 cm	47
Tabela 3 - Esquema de brancos e reação para avaliação da atividade enzimática	52
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1 em CDCl_3	56
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 2 em CDCl_3	71
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 2 em CDCl_3	80
Tabela 7 - Principais características da enzima tocoferol ciclase encontrada em diferentes espécies vegetais	91
Tabela 8 - Atividade antifúngica (CIM/CFM - $\mu\text{g/mL}$) do composto 1	99

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Produtos naturais	21
1.2	Família Piperaceae	22
1.3	A espécie <i>Piper gaudichaudianum</i>	24
1.4	Ácido gaudichaudiânico	25
2	OBJETIVOS	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Materiais e equipamentos	31
3.1.1	Métodos cromatográficos	31
3.1.1.1	Solventes	31
3.1.1.2	Fases estacionárias	31
3.1.1.3	Colunas cromatográficas	31
3.1.1.4	Cromatógrafos	31
3.1.2	Técnicas espectroscópicas e espectrométricas	32
3.1.3	Demais equipamentos	32
3.2	Material vegetal	33
3.3	Obtenção do extrato vegetal	33
3.4	Isolamento de <u>1</u> por cromatografia líquida de baixa pressão	33
3.5	Resolução dos enantiômeros de <u>1</u>	34
3.6	Isolamento do precursor de <u>1</u> por cromatografia líquida de alta eficiência	35
3.7	Obtenção de <u>2</u> a partir da fração hexânica do extrato etanólico dos frutos de <i>Myrsine cuneifolia</i>	37
3.8	Avaliação de ciclização por catálise química	37
3.8.1	Influência de meio ácido	37
3.8.2	Influência de aquecimento	38
3.9	Perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional	38
3.9.1	Preparação do extrato proteico	38
3.9.2	Precipitação proteica	39
3.9.3	Dosagem proteica	40

3.9.4	Eletrforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3.9.4.1	Reagentes e soluções	41
3.9.4.2	Preparo das amostras e dos padrões	42
3.9.4.3	Preparo, desenvolvimento e revelação do gel monodimensional	43
3.9.5	Eletrforese em gel de poliacrilamida 2D SDS-PAGE	44
3.9.5.1	Soluções	44
3.9.5.2	<i>Clean-up</i> das amostras	46
3.9.5.3	Hidratação das tiras de IPG	47
3.9.5.4	Primeira dimensão: focalização isoelétrica	47
3.9.5.5	Segunda dimensão: SDS-PAGE	48
3.9.5.5.1	Preparo do gel de poliacrilamida 12%	48
3.9.5.5.2	Equilíbrio das tiras	48
3.9.5.5.3	Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE	48
3.9.5.6	Revelação do gel com corante Coomassie Brilliant Blue R250	49
3.10	Ensaio enzimático	49
3.10.1	Preparo do extrato enzimático solúvel	49
3.10.2	Preparo do extrato enzimático microssomal	50
3.10.3	Preparo da amostra (precursor)	51
3.10.4	Desenvolvimento do ensaio enzimático.	52
3.11	Avaliação da atividade antifúngica	53
3.11.1	Microrganismos	53
3.11.2	Concentração inibitória mínima (CIM)	53
3.11.3	Concentração fungicida mínima (CFM)	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Isolamento e caracterização do ácido gaudichaudiânico (<u>1</u>)	54
4.2	Resolução dos enantiômeros de <u>1</u>	63
4.3	Isolamento e caracterização da substância <u>2</u>	65
4.4	Obtenção de <u>2</u> a partir da fração hexânica do extrato etanólico dos frutos de <i>Myrsine cuneifolia</i>	78
4.5	Avaliação da ciclização química	87
4.6	Perfil proteico por eletrforese monodimensional	90
4.7	Ensaio Enzimático utilizando a substância <u>2</u> como precursor do ácido gaudichaudiânico	92

4.8	Avaliação da atividade antifúngica de <u>1</u>	98
5	CONCLUSÃO	100
6	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

Durante o processo de evolução as plantas desenvolveram um metabolismo espécie-específico capaz de produzir diversos compostos com grande complexidade química. Esses produtos naturais, também chamados de metabólitos secundários, em referência aos metabólitos primários que estão diretamente associados às atividades essenciais de crescimento e desenvolvimento das plantas, possuem importantes funções ecológicas que visam a melhor adaptação e sobrevivência das espécies em seu ecossistema (VERPOORT, 2010). Dentre estas, pode-se citar a proteção contra herbívoros e microrganismos patogênicos, a atração de polinizadores e agentes dispersantes de sementes, e ainda atividades alelopáticas, como a supressão do crescimento de espécies vegetais vizinhas (SPRINGOB; KUTCHAN, 2009).

Além de suas funções ecológicas e fisiológicas, os produtos naturais podem desempenhar atividades em outros organismos vivos. Por isso, desde a antiguidade as substâncias extraídas das plantas são utilizadas pelas civilizações como condimento, pesticida e principalmente como medicamento. Documentos que registram a importância e utilização dessas entidades químicas desde o início das civilizações foram encontrados em diversas partes do mundo. O principal e mais conhecido é o Papiro de Ebers, um manuscrito da antiga Mesopotâmia, datado de 1500 anos a.C., que descreve aproximadamente 700 drogas utilizadas para o tratamento de doenças da época (BORCHARDT, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Devido sua rica variedade e complexidade estrutural, ainda hoje os metabólitos secundários são a base de inúmeros produtos utilizados pelo homem (ZÁRATE, 2010). Desde o início, no século XIX, até meados de 1980, com a grande ascensão dos produtos naturais no mercado farmacêutico, a pesquisa em produtos naturais se baseou no isolamento e identificação de novas substâncias bioativas. Atualmente estima-se que aproximadamente 250 mil produtos naturais tenham sido isolados e identificados, sendo que a cada ano aproximadamente 4 mil novas substâncias são elucidadas (ZÁRATE, 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Com o avanço das técnicas de isolamento e caracterização, o surgimento de novas metodologias de estudo e, principalmente, com o aprofundamento dos estudos genômicos, a pesquisa em produtos naturais expandiu suas fronteiras e caminha para se tornar cada vez mais uma ciência multidisciplinar. Seguindo a tendência de uma ciência não reducionista, áreas como biologia, física e informática estão sendo, cada vez mais, inseridas ao cotidiano da pesquisa em produtos naturais. Estudos de sequenciamento genético, determinação de metaboloma e proteoma total, manipulação de vias biossintéticas e modelagem molecular, proveem vastos recursos para o futuro da descoberta de novos agentes farmacêuticos (PUPPO, 2007; LI; VEDERAS, 2009; TRENERRY; ROCHFORT, 2010).

Entretanto, apesar dos inúmeros trabalhos desenvolvidos nesta área, estima-se que apenas 8% das aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores existentes no planeta tenham sido completamente estudadas em nível fitoquímico, sendo que estes valores percentuais tendem a diminuir ao se considerar os estudos em níveis moleculares (ZÁRATE, 2010). No Brasil, país que possui 20% das espécies do mundo distribuídas em complexos ecossistemas, estudos de bioprospecção que aliem a visão da química de produtos naturais moderna são de grande importância não somente para o desenvolvimento da ciência no país, mas também, para a preservação da biodiversidade local (SILVA; CASTRO-GAMBOA; BOLZANI, 2010).

1.2 Família Piperaceae

A família Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, é classificada, juntamente com Aristolochiaceae, Saururaceae e Lactoridaceae, entre as angiospermas basais (KATO; FURLAN, 2007). Compreende cerca de 4000 espécies divididas em 5 gêneros (SAMAIN et al., 2010): *Piper* L., com aproximadamente 2000 espécies; *Peperomia* Ruiz e Pavon, com aproximadamente 1700 espécies; *Manekia* Trel., classificada anteriormente como *Sarcorrhachis*, *Zippelia* Blume (WANKE et al., 2006) e *Verhuellia*, um pequeno gênero descrito recentemente (SAMAIN et al., 2010). De porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo, as espécies dessa família são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, distribuindo-se pelas Américas, desde o

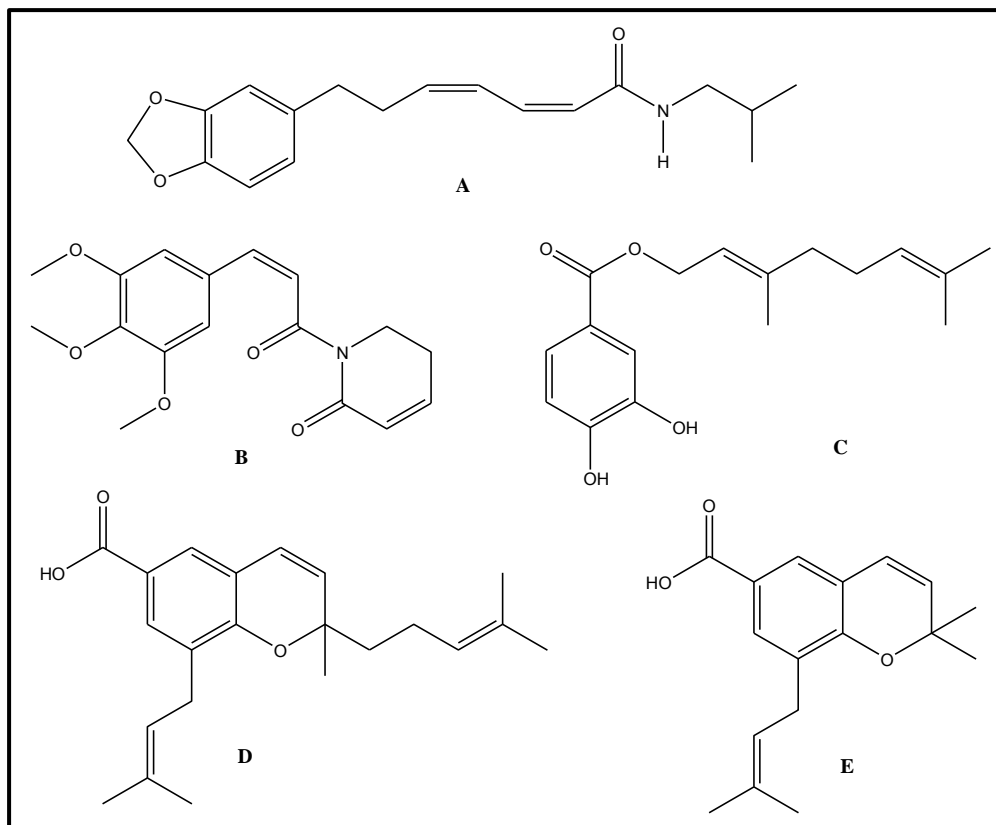
México até o sudoeste da Argentina (YUNCKER, 1972; FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000; ALBIERO et al., 2005).

A constituição química das plantas pertencentes à esta família é bastante diversificada. Entre as principais classes de substâncias descritas pode-se citar as lignanas/neolignanas (PARMAR et al., 1997; FELIPPE et al., 2008; FELIPPE et al., 2011; FELIPPE et al., 2012), amidas (NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002; CONTIGUIBA et al., 2009), piperolídeos (LAGO et al., 2005; MARQUES et al., 2010), derivados do ácido benzoico (BALDOQUI et al., 1999; LAGO et al., 2004; MORANDIM et al., 2004; BERGAMO et al., 2005; LOPES et al., 2008), cromanos e cromenos (BALDOQUI et al., 1999; LOPES et al., 2008; BATISTA JUNIOR et al., 2008; MOTA et al., 2009; BATISTA JUNIOR et al., 2011a; BATISTA JUNIOR et al., 2012).

Dentre essas classes encontram-se metabólitos importantes do ponto de vista farmacológico, que desempenham, por exemplo, atividades antiprotozoária (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; BATISTA JUNIOR et al., 2008; FELIPPE et al., 2008; REGASINI et al., 2009a; BATISTA JUNIOR et al., 2011b), antifúngica (NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2006; REGASINI et al., 2009b; MORANDIN et al., 2010), antibacteriana (CUNICO et al., 2007) antileishmania (NAKAMURA et al., 2006; ESTEVEZ et al., 2007; RODRIGUES-SILVA et al., 2009), ansiolítica (AMORIN et al., 2007) anticonvulsante e anti-inflamatória (BARBOSA-FILHO et al., 2006; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008).

O gênero *Piper*, em particular, também conhecido como *Arctotonia* Trel., *Macropiper* Miq., *Pothomorphe* Miq., *Ottonia* Spreng e *Trianaoepiper* Trel. (WANKE et al., 2007), foi amplamente investigado devido às inúmeras substâncias com potenciais atividades biológicas encontradas em extratos de suas espécies. Nesse âmbito, destacam-se substâncias com atividade antifúngica, inseticida e antiprotozoária, entre as quais pode-se citar algumas amidas extraídas de *Piper hispidum* (Figura 1 (A)) e *Piper tuberculatum* (Figura 1 (B)) (NAVICKIENE et al., 2000); derivados prenilados de ácido benzoico extraídos de *Piper crassinervium* (Figura 1 (C)) (LÓPEZ et al., 2010); e cromenos encontrados em *Piper gaudichaudianum* (Figura 1 (D)) e *Piper aduncum* (Figura 1 (E)) (LAGO et al., 2004; BATISTA JUNIOR et al., 2008).

Figura 1 - Substâncias com atividades biológicas extraídas de espécies do gênero *Piper*



1.3 A Espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth

A espécie *Piper gaudichaudianum* (Figura 2) é abundante e ocorre do nordeste ao sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina e Paraguai. Apresenta-se como um arbusto de pequeno porte com folhas simples, alternadas, pecioladas, um pouco ásperas, com limbo ovadoelíptico, acuminadas no ápice e de base oblíqua, com inflorescências do tipo espiga, levemente curvadas, podendo atingir até 8 cm de comprimento. (ALBIEIRO et al., 2005).

Figura 2 - *Piper gaudichaudianum*



(Fotografado por Adriana A. Lopes, 2004)

Popularmente conhecida como “pariparoba”, “paripaioba”, “muta”, “iaborandi” ou “falso jaborandi” (RAMOS et al., 2009), *P. gaudichaudianum* tem um restrito uso na medicina tradicional, sendo empregada como anti-inflamatório e analgésico para o tratamento de dores de dente (PÉRES et al., 2006) e distúrbios hepáticos, principalmente por populações que mascam suas folhas ou raízes frescas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

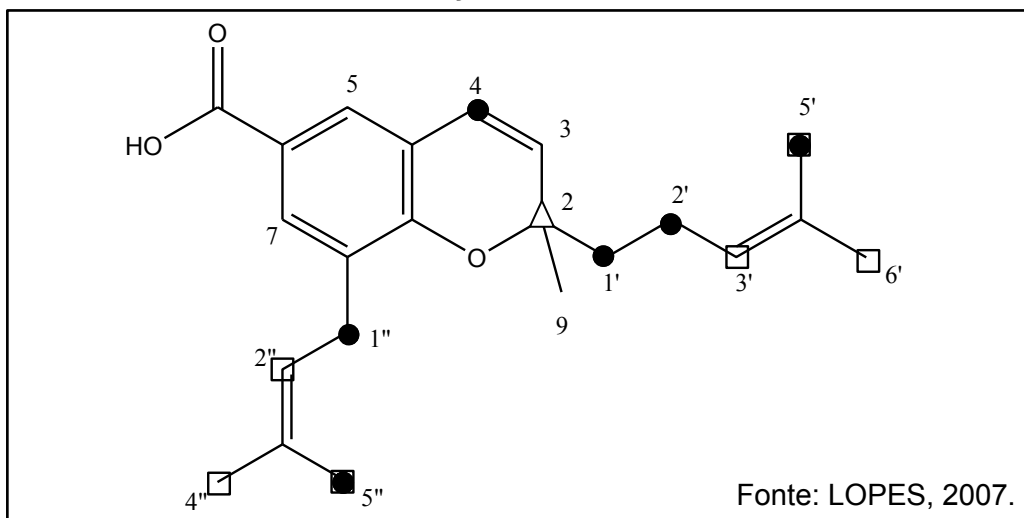
Os estudos químicos até então realizados mostram a presença de diversas classes de substâncias que conhecidamente possuem atividades biológicas importantes, como terpenos, derivados de ácido benzoico geranilados, flavanonas e cromenos (PARMAR et al., 1997; PÉRES et al., 2006; LOPES et al., 2007; BATISTA JUNIOR et al., 2008), sendo que um dos cromenos, o ácido gaudichaudiânico, além de ser o metabólito secundário majoritário, possui considerada atividade antifúngica observada contra os fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (LAGO et al., 2004) e atividade tripanocida (BATISTA JUNIOR et al., 2008; MOTA et al., 2009; BATISTA JUNIOR et al., 2011b).

1.4 Ácido gaudichaudiânico

O ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (**1**), ácido gaudichaudiânico (Figura 3), é um cromeno derivado do ácido *p*-hidroxibenzoico que possui duas unidades isoprênicas como substituintes no núcleo benzopirano e caracteriza-se por ser o metabólito secundário majoritário na espécie *Piper gaudichaudianum* (LAGO et al., 2004; LOPES et al., 2007).

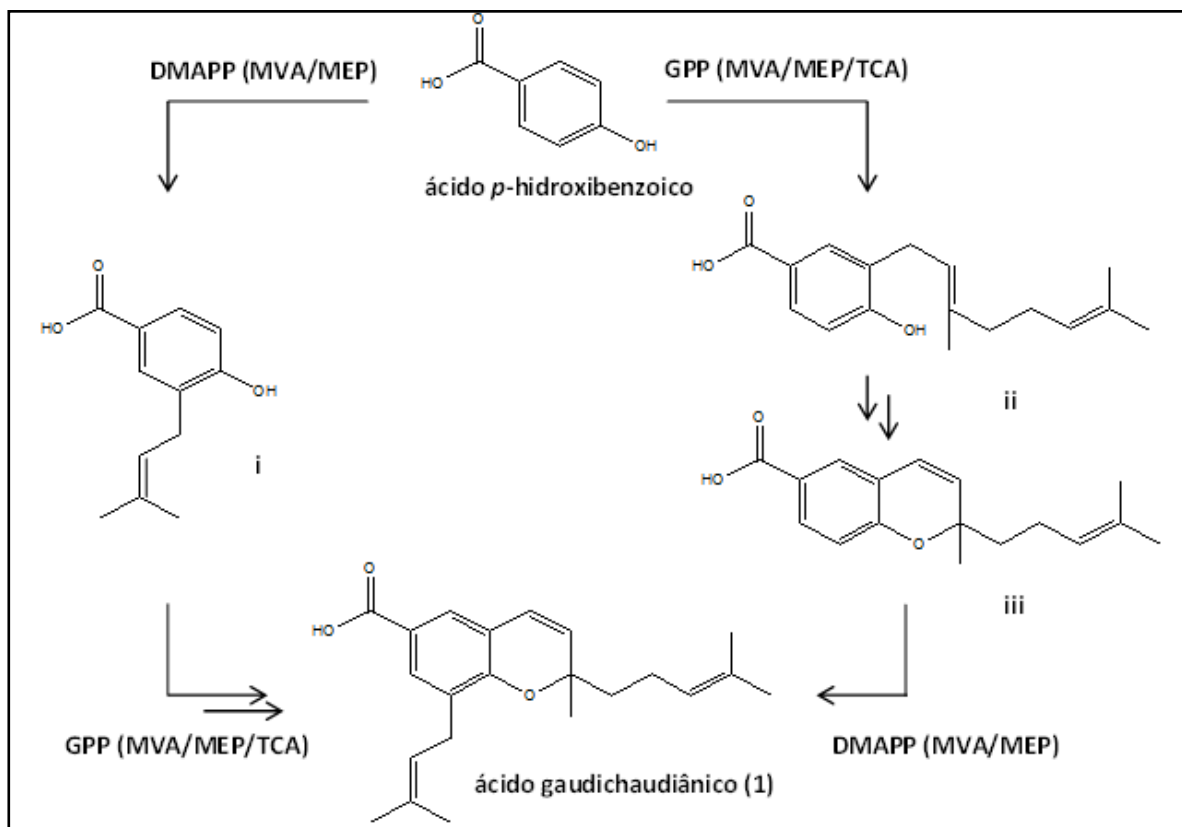
A biossíntese desse cromeno foi descrita por Lopes e colaboradores (2007), por meio de estudos de incorporação de glicose-1-[¹³C] em folhas de *P. gaudichaudianum*. Os resultados demonstraram que o ácido *p*-hidroxibenzoico é geranilado por uma geraniltransferase utilizando pirofosfato de geranila (GPP) como precursor advindo exclusivamente da via metabólica da triose/piruvato (●), enquanto a outra unidade prenila mostrou ser derivada do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), biossintetizado pelas vias do mevalonato (□) e da triose/piruvato, propondo-se assim uma biossíntese de via mista, como descrito na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química do ácido gaudichaudiânico e predição das vias biossintéticas envolvidas na sua formação em *P. gaudichaudianum*



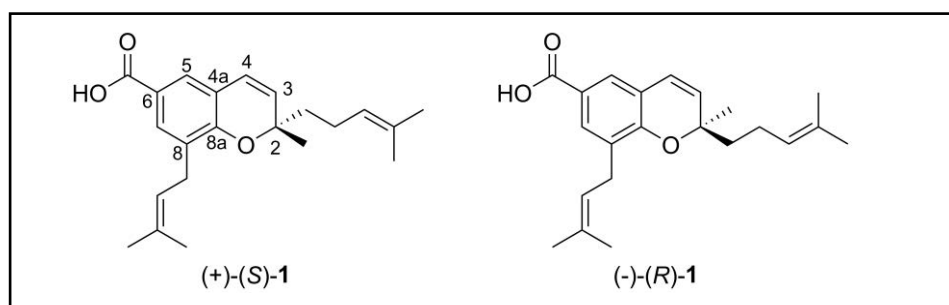
Via metabólica do mevalonato (□), Via metabólica da triose/piruvato (●), TCA (Ciclo do ácido tricarboxílico) (Δ).

Como visto, por meio desses estudos de marcação isotópica, pôde-se propor as vias metabólicas envolvidas na biossíntese deste cromeno, mas não a sequência das etapas de formação do mesmo. Por isso, os autores descrevem a biogênese partindo-se do ácido *p*-hidroxibenzoico com possibilidade de duas diferentes rotas (Figura 4). A primeira, inicia-se pela prenilação do ácido *p*-hidroxibenzoico pela ação de uma preniltransferase, formando a espécie **i**, seguida de uma geranilação catalisada por uma geraniltransferase e subsequente ciclização e formação do anel benzopirano. A segunda rota propõe o caminho inverso, ocorrendo primeiramente a geranilação, formando a espécie **ii**, seguida de ciclização e formação do cromeno, espécie **iii**, e por último a prenilação e formação do ácido gaudichaudiânico (**1**).

Figura 4 - Proposta biossintética para o ácido gaudichaudiânico

MVA (Via metabólica do mevalonato), MEP (Via metabólica do metileritritol), TCA (Ciclo do ácido tricarbóxico). Fonte: LOPES et al., 2007.

Outra característica peculiar do ácido gaudichaudiânico é o seu acúmulo na espécie como uma mistura racêmica, combinando as formas enantioméricas naturais (+)-*S* e (-)-*R* (Figura 5) (BATISTA JUNIOR et al., 2011b).

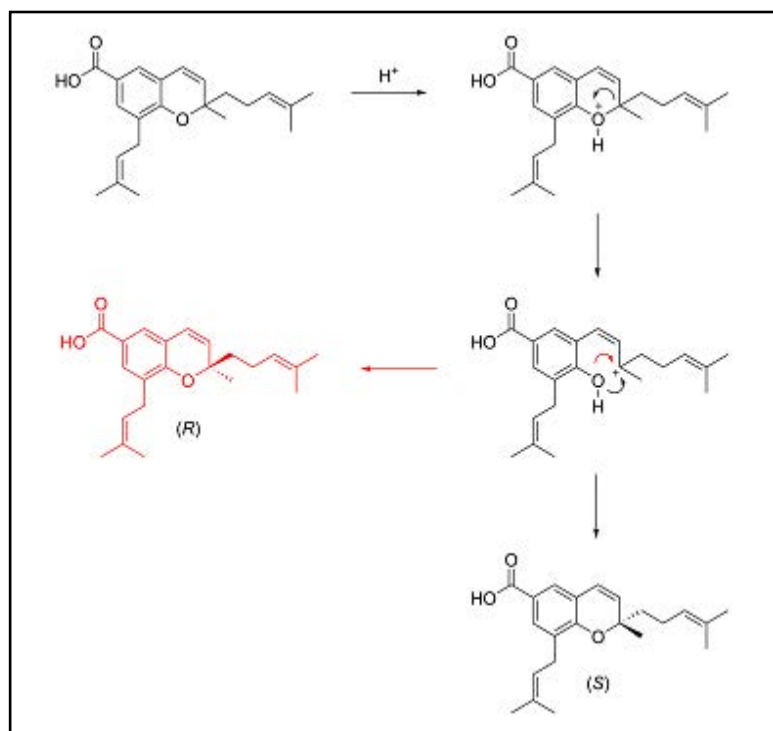
Figura 5 - Formas enantioméricas do ácido gaudichaudiânico

Fonte: BATISTA JUNIOR et al., 2011b.

O fato de se encontrar misturas racêmicas em compostos naturais é relativamente raro (MORI, 2010), por isso, inúmeros questionamentos podem ser levantados a respeito de sua formação. A primeira hipótese seria a

presença de sistemas enzimáticos distintos dedicados à formação de cada enantiômero, como observado no caso de alguns alcalóides tropânicos, em que diferentes enzimas reduzem o grupo carbonila da tropinona de forma enantiosseletiva (DEWICK, 2009). Outra possibilidade é a ocorrência de ciclização química, ou mesmo racemização pós-biossíntese, como exemplificado na Figura 6.

Figura 6 - Proposta de racemização pós-biossíntese.



Contudo, acredita-se que a ciclização e formação do núcleo benzopirano ocorra por catálise enzimática, com participação de uma enzima ciclase, de maneira análoga ao que ocorre na biossíntese dos tocoferóis, para os quais, a enzima tocoferol ciclase é bem caracterizada (GRÜTTER et al., 2006).

Quando se trata de compostos quirais outro fato que desperta grande interesse de estudo é a possibilidade de diferentes estereoisômeros desempenharem atividades biológicas diversificadas e este aspecto é extremamente importante quando relacionado a substâncias com potencial farmacêutico. Batista Junior e colaboradores (2011b) avaliaram a mistura racêmica e os enantiômeros de **1** frente à forma epimastigota da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, que revelou uma atividade enantiosseletiva (CI_{50} $176,5 \pm$

2,2 μM para (+)-*S* e CI_{50} 223,5 \pm 2,0 μM para (-)-*R*) e sinérgica para o racemato (CI_{50} 5,8 \pm 2,5 μM) , o que aumenta o interesse em investigar essa mesma ação para outros tipos de microrganismos patogênicos. Baseado no exposto, esse trabalho teve como objetivos centrais a investigação da possível estereosseletividade que ocorre na biossíntese do ácido gaudichaudiânico (**1**) e as implicações que tal fenômeno pode desempenhar quando avaliada do ponto de vista biológico frente a fungos patógenos humanos.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a possibilidade de ciclização estereosseletiva na síntese do ácido gaudichaudiânico (**1**) envolvendo catálise enzimática;
- Avaliar a possibilidade de ciclização química na formação do ácido gaudichaudiânico;
- Avaliar a atividade antifúngica frente a patógenos humanos da mistura racêmica e dos enantiômeros de **1**

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Métodos cromatográficos

3.1.1.1 Solventes

- Acetato de etila, etanol, hexano (95 % *n*-hexano), isopropanol e metanol da marca J.T. Baker, Panreac e Tedia para CLAE e outros fins e água purificada em sistema Milli-Q, Millipore.
- Como modificadores utilizou-se ácido acético glacial (Synth®) e trietilamina P.A. (Sigma Aldrich®)

3.1.1.2 Fases estacionárias

- Cromatoplasmas Whatman® sílica gel (250 μm);
- Sílica Gel Sigma Aldrich® de 65 a 200 μm e 43 a 63 μm ;
- Cartucho Phenomenex Strata® C18-E (55 μm , 70 Å).

3.1.1.3 Colunas cromatográficas

- Phenomenex Lux® Cellulose-1, 250 x 4,6 mm, 5 μm ;
- Daicel Chiralcel OD-H®, 250 x 10 mm, 5 μm ;
- Phenomenex Luna® C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm ;
- Phenomenex Luna® C-18, 150 x 21,2 mm, 5 μm .

3.1.1.4 Cromatógrafos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-6AD, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-10AF, coletor de frações FRC-10A, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-20AD, detector UV-DAD SPD-M20A, auto-injetor SIL-20A, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A e processador de dados LC-solution. Utilizou-se esse equipamento acoplado a

espectrômetro Bruker Daltonics® modelo ultrOTOF_Q de alta resolução com ionização por eletrospray, no modo negativo.

3.1.2. Técnicas espectroscópicas e espectrométricas

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz na frequência do ¹H e a 125 MHz na frequência do ¹³C, Varian INOVA 300, operando a 300 MHz na frequência do ¹H e a 75 MHz na frequência do ¹³C, e Bruker Fourier 300 Dual ¹³C/¹H probe. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna. Foram utilizados solventes deuterados das marcas Synth e Cambridge Isotopes.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Bruker ultrOTOF_Q ESI-TOF, no modo positivo utilizando ácido acético como agente ionizante e trietilamina no modo negativo. Os espectros no UV foram obtidos a partir dos detectores de arranjo de diodos acoplados aos equipamentos de CLAE utilizados nas separações cromatográficas.

3.1.3 Demais equipamentos

- Evaporador rotatório Buchi;
- Balança analítica Metter Toledo AG 45;
- Centrífuga refrigerada Sorvall® modelo RC5C plus;
- Microcentrifuga Denver Instrument Force 7;
- Banho climatizado Dubnoff, modelo TE-053;
- Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro da Amersham Biosciences;
- Cuba para eletroforese SDS-PAGE Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster; Mighty Small SE250/SE260 Mini Vertical Unity. Fonte Electrophoresis Power Supply EPS 301.
- Cuba Vertical para eletroforese 2D Hoefer SE600 Ruby e sistema de focalização isoelétrica Ettan IPGphor II.
- Gel Dryer, modelo 583, Bio-RAD.

3.2 Material vegetal

As plantas da espécie *Piper gaudichaudianum* foram mantidas na casa de vegetação do Instituto de Química da USP em São Paulo, pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato. A identificação vegetal foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências - USP - SP sob o código Kato 093.

3.3 Obtenção do extrato vegetal

Para obtenção do extrato vegetal, as folhas da espécie *Piper gaudichaudianum* foram secas em estufa a 40 °C e pulverizadas em moinho de facas tipo Willey. A extração foi feita por maceração à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, utilizando AcOEt como solvente extrator, até exaustão. Em seguida, o material particulado restante foi filtrado em papel filtro e descartado, e o extrato líquido passou para etapa de secagem. Após a evaporação do solvente, à pressão reduzida, o extrato foi armazenado em recipiente de vidro à temperatura ambiente.

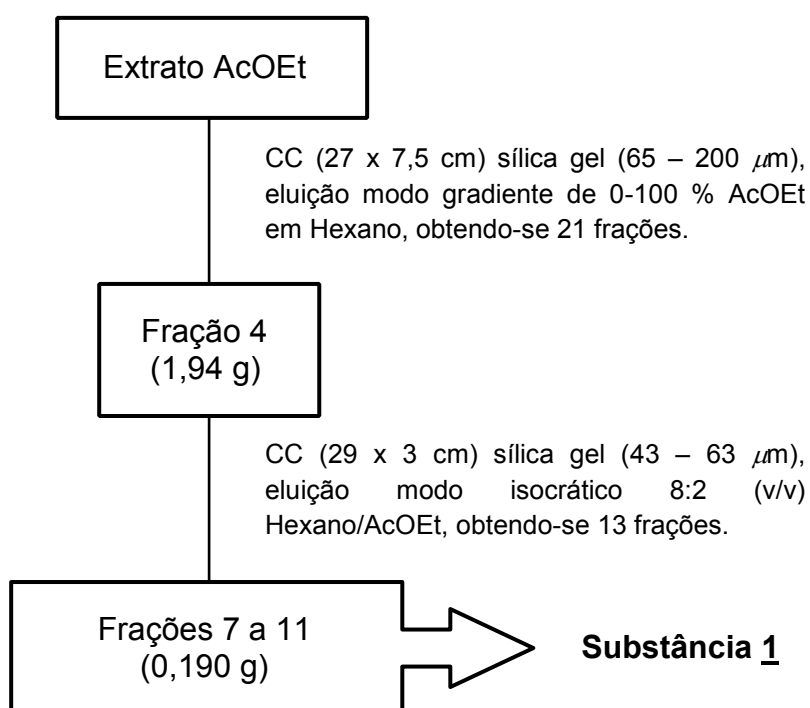
3.4 Isolamento de **1** por cromatografia líquida de baixa pressão

Os extratos das folhas da espécie *P. gaudichaudianum*, preparados como descrito no item **3.3**, foram inicialmente avaliados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) a fim de confirmar a presença do composto **1**. Utilizou-se cromatoplaças de sílica gel como fase estacionária e solução de Hexano/AcOEt (7:3 v/v) com 0,1 %(v/v) de ácido acético como fase móvel. O extrato e o padrão de **1**, previamente obtido pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Furlan, foram solubilizados em AcOEt e aplicados na placa de sílica com tubo capilar. Os resultados foram analisados em câmara de luz ultravioleta e por revelação com solução de *p*-anisaldeído sulfúrico preparado misturando-se, em banho de gelo, 1 mL de *p*-anisaldeído, 20 mL de ácido acético, 170 mL de MeOH e 10 mL de ácido sulfúrico.

Uma vez confirmada a presença da substância **1**, 12 g de extrato AcOEt foram submetidos a fracionamento cromatográfico em coluna (CC) (27,0 x 7,5 cm), à pressão ambiente, com fase estacionária sílica gel (65 – 200 μ m) e eluição no modo gradiente de 0-100 % AcOEt em Hexano, obtendo-se 21 frações, que foram avaliadas por CCDC nas condições anteriormente descritas.

A fração 4 (1,94 g) foi submetida a novo fracionamento cromatográfico em coluna (29 x 3 cm), à pressão ambiente, com fase estacionária de sílica gel (43 – 63 μm) e eluição no modo isocrático Hexano/AcOEt (8:2 v/v), obtendo-se 13 subfrações. Após a análise por CCDC, as subfrações 7, 8, 9, 10 e 11 foram reunidas (190 mg) e enviadas para análise por RMN e EM, confirmando o isolamento do cromeno **1**. O Esquema 1 ilustra as etapas envolvidas no isolamento de **1**.

Esquema 1 - Etapas do isolamento de **1** por cromatografia líquida de baixa pressão



3.5 Resolução dos enantiômeros de **1**

A substância **1**, descrita como um racemato por BATISTA JUNIOR e colaboradores (2011b) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência quiral, em fase normal, nas seguintes condições: em escala analítica utilizando Phenomenex Lux[®] Cellulose-1 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel composta por *n*-hexano/EtOH (99,5:0,5 v/v) em modo de eluição isocrático, vazão 0,8 mL/min, amostra em concentração de 1 mg/mL, volume de injeção 30 μL e detecção a 254 nm; em escala semi-preparativa usando coluna Chiralcel OD-H (250 x 10 mm, 5 μm), nas mesmas condições da escala analítica, alterando apenas a vazão para 3 mL/min, concentração da amostra para 5 mg/mL e

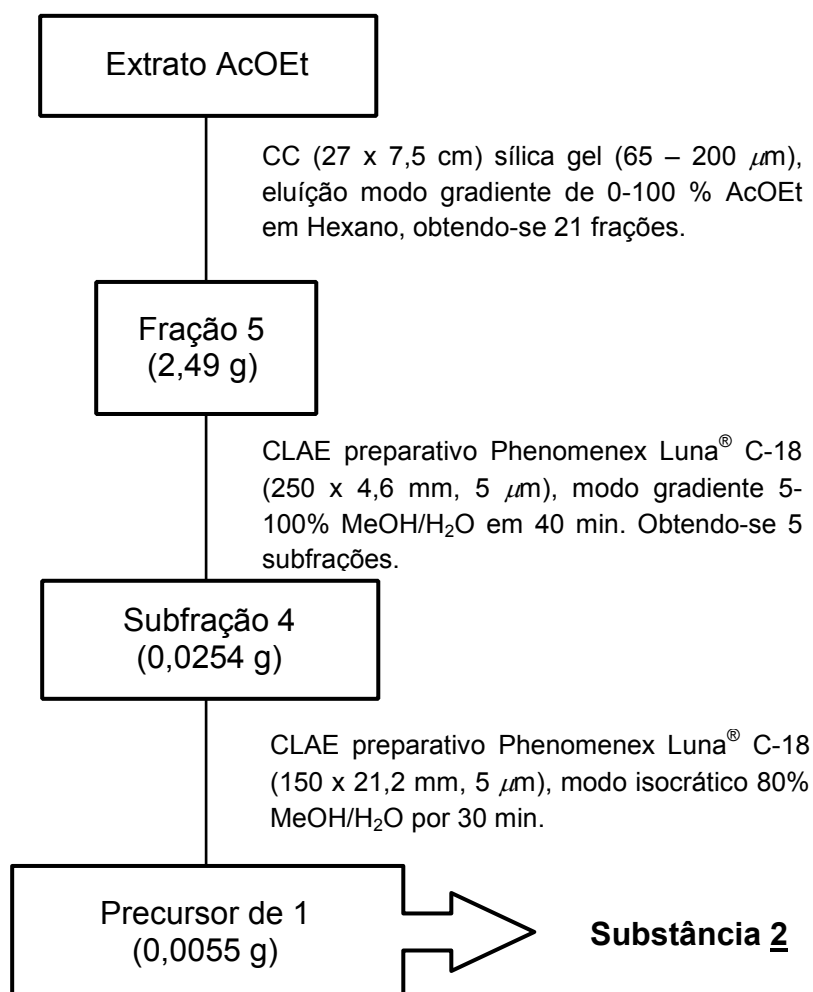
volume de injeção para 50 μL . Esse procedimento resultou em 1,5 mg de cada enantiômero.

3.6 Isolamento do precursor de **1** por cromatografia líquida de alta eficiência

Um possível precursor de **1**, contendo o ácido *p*-hidroxibenzoico geranilado e prenilado, nas posições C-3 e C5, respectivamente, foi identificado na fração 5 (2,49 g), obtida no fracionamento do extrato bruto, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas (CL-MS), utilizando coluna Phenomenex Luna[®] C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), modo gradiente exploratório 5-100 % MeOH/H₂O em 40 min, seguidos de 10 min a 100 % MeOH, injeção de 30 μL de amostra na concentração de 1 mg/mL e vazão de 1 mL/min. A detecção foi obtida na região do ultravioleta a 254 nm e por espectrometria de massas no modo negativo.

Determinado o pico referente a substância de interesse, iniciou-se sua purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa, nas seguintes condições: coluna Phenomenex Luna[®] C-18 (150 x 21,2 mm, 5 μm), modo gradiente 5-100 MeOH/H₂O com 0,1 % de trietilamina (TEA), vazão de 10 mL/min, injeção de 1 mL de solução a 10 mg/mL da fração 5 solubilizada em MeOH. Foram coletados 5 picos que foram novamente analisados por CL-MS e no pico 4 (25,4 mg) encontrou-se a massa do possível precursor. Foi então isolado o precursor de **1**, chamado neste trabalho de composto **2**, por cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa, utilizando coluna Phenomenex Luna[®] C-18 (150 x 21,2 mm, 5 μm), modo isocrático 80 % MeOH/H₂O por 30 min, seguidos de 10 min em 100 % MeOH. Injetou-se 400 μL de amostra a 10 mg/mL e vazão de 10 mL/min obtendo-se 5,5 mg do composto **2**. Para confirmação estrutural a substância isolada foi enviada para análise de RMN ¹H e ¹³C. As etapas para obtenção de **2** estão descritas no Esquema 2, a seguir.

Esquema 2 - Etapas do isolamento de **2** por cromatografia líquida de alta eficiência



Como se pode observar pela massa final obtida (5 mg), este processo de purificação de **2** se tornou inviável devido ao baixo rendimento e elevado consumo de solventes, e por isso, buscou-se novas alternativas para a obtenção deste produto em quantidades significativas necessárias para a realização dos testes enzimáticos.

Uma das possibilidades foi o estabelecimento de uma parceria com o Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, da Universidade Estadual de Goiás, que prontamente se dispôs a colaborar com o presente trabalho. O Professor Menezes trabalha com espécies do gênero *Myrsine*, conhecidas pelo acúmulo de ácido myrsinoico A (**2**) em seus frutos (DONG et al., 1999).

3.7 Obtenção de **2** a partir da fração hexânica do extrato etanólico dos frutos de *Myrsine cuneifolia*

A fração hexânica dos frutos de *Myrsine cuneifolia* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, da Universidade Estadual de Goiás. As amostras foram obtidas durante o trabalho de mestrado da aluna Marcela Carmem de Melo Burger e sua descrição se encontra na dissertação de mestrado da aluna (BURGER, 2009).

Primeiramente foram obtidos espectros de RMN de ^1H da fração, para a confirmação da presença de **2** no extrato enviado e em seguida iniciou-se os processos de purificação.

A substância **2** foi então obtida a partir de 150 mg de extrato ressuspenso em 10 mL de MeOH grau espectroscópico e submetidos a purificação em Cartucho Phenomenex Strata® C18-E (55 μm , 70 Å) condicionado em 100% MeOH. O eluato obtido foi, então, seco em capela à temperatura ambiente, resultando em 119 mg de uma fração enriquecida de **2**. Em seguida, foram realizados espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dessa fração.

3.8 Avaliação da ciclização por catálise química

Uma das propostas de ciclização do derivado geranilado do ácido p-hidroxibenzoico e formação de **1** era a ciclização por catálise química, como descrito no item 1.4 (pg. 25). Esta proposta foi analisada por meio de 2 testes que avaliaram diferentes fatores que podem influenciar a ciclização dessa espécie química.

3.8.1 Influência de meio ácido

Foram preparadas três soluções de 1mg/mL do precursor (**2**) em Hexano grau espectroscópico, contendo 1, 5 e 10% de ácido acético glacial, respectivamente. As amostras foram armazenadas em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml e mantidas ao abrigo da luz, a temperatura ambiente, permanecendo nessas condições por 16 horas. Em seguida as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando coluna Phenomenex Luna® C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) com método gradiente de eluição de 70% a 100% MeOH/H₂O por 30 min, seguidos de limpeza a 100% MeOH por 5 min e vazão de 1 mL/min. A amostra controle foi preparada e analisada nas mesmas

condições porém sem a presença de ácido. Foram realizadas triplicatas de todas as amostras.

3.8.2 Influência de aquecimento

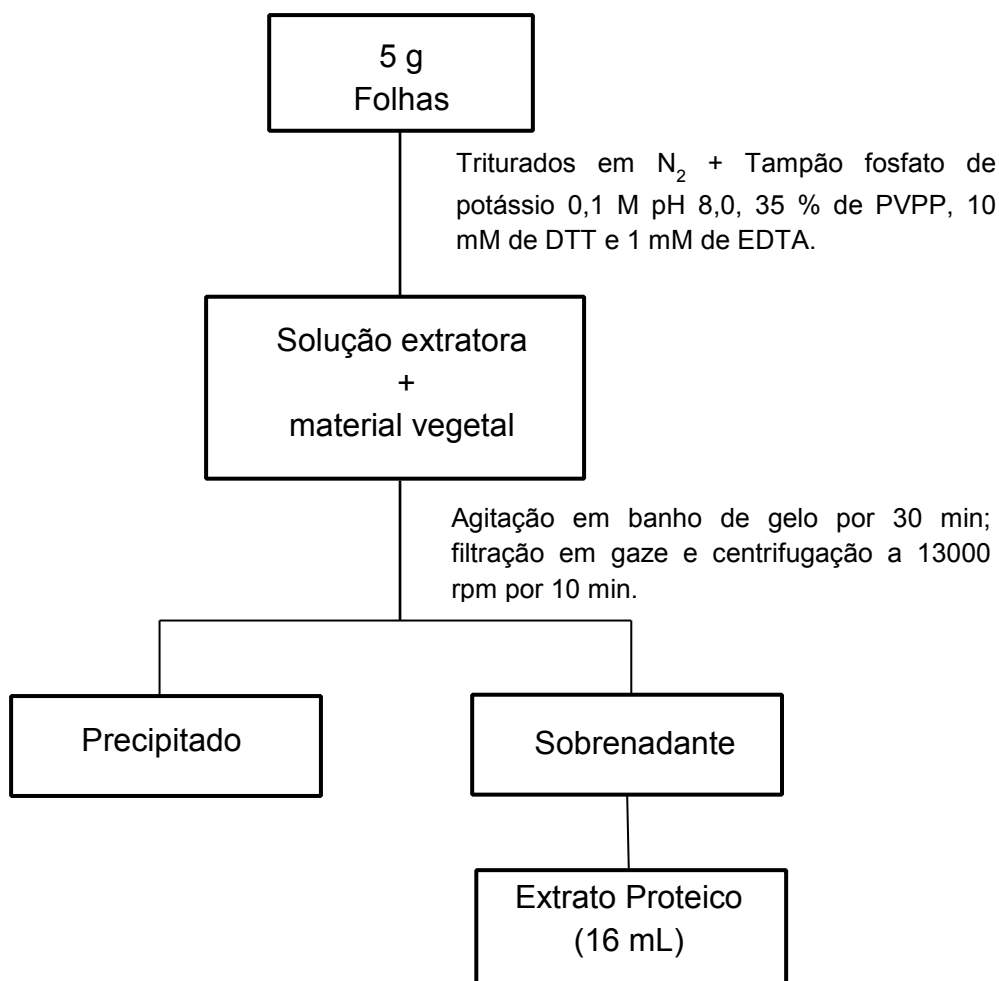
Foram preparadas soluções de 1 mg/mL do precursor (**2**) em EtOH e em AcOEt grau espectroscópico. Amostras distintas de cada solvente foram testadas em três temperaturas, 40, 50 e 60°C, por 1h. As amostras controle foram preparadas nas mesmas condições, mas não foram aquecidas. Em seguida as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito na seção 3.8.1 (pg. 37).

3.9 Perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional

3.9.1 Preparação do extrato proteico

O extrato proteico foi preparado seguindo a metodologia descrita por LÓPEZ e colaboradores (2010), com pequenas modificações. Para isso, as folhas de *Piper gaudichaudianum* foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, 5 g deste material foram triturados em moinho analítico e adicionados a 15 mL da solução extratora (Tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 8,0, 35 % de PVPP, 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA). Essa suspensão permaneceu sob agitação em banho de gelo por 30 min. Em seguida, o extrato foi filtrado em 6 camadas de gaze e centrifugado a 13000 rpm por 10 min obtendo-se 16 mL de extrato proteico total (EPt). Desse extrato foram retiradas 2 alíquotas de 0,5 mL para análise e com o volume restante (15 mL) foi realizada a precipitação salina. As etapas de preparação do extrato proteico estão descritas no Esquema 3.

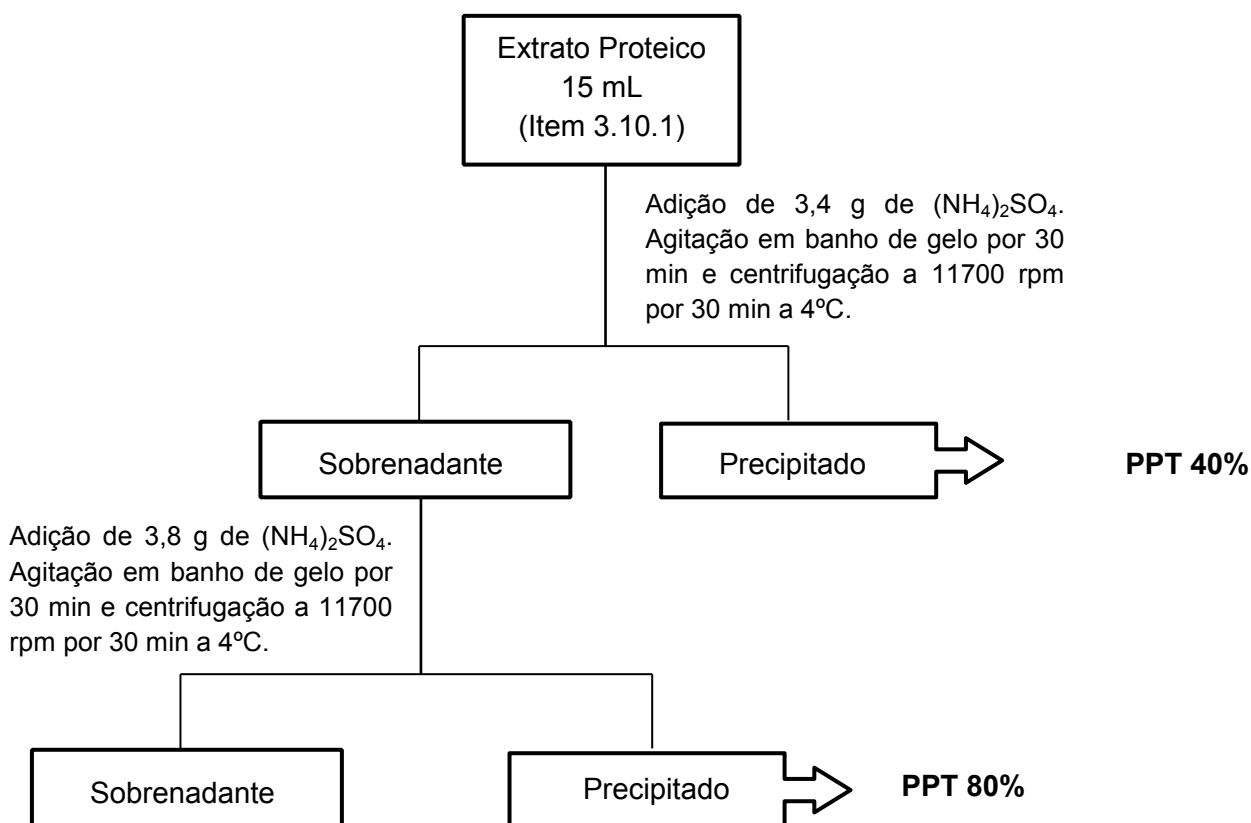
Esquema 3 - Extração de proteínas das folhas de *P. gaudichaudianum*.



3.9.2 Precipitação proteica

A precipitação salina com saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Englard e Seifter (1990). Primeiramente foram adicionados a 15 mL do extrato proteico, 3,4 g de sulfato de amônio, quantidade necessária para atingir a saturação de 40 %. Essa mistura permaneceu em agitação por 30 min em banho de gelo. Em seguida, a solução foi centrifugada a 11700 rpm, a 4 °C por 30 min. O precipitado (PPT_{40}) foi então separado e armazenado em freezer a -20 °C. O sobrenadante foi novamente tratado com 3,8 g de sulfato de amônio nas mesmas condições anteriormente descritas, essa quantidade foi suficiente para saturação de 80%. Após a centrifugação, o precipitado (PPT_{80}) foi separado e armazenado, assim como o sobrenadante (SN). O esquema 4, descreve as etapas realizadas na precipitação proteica.

Esquema 4 - Precipitação Salina



3.10.3 Dosagem proteica

Para a dosagem proteica utilizou-se o método Bradford modificado (STOSCHECK, 1990) e padrão de proteínas. O reagente foi preparado utilizando 500 mL de HCl 0,6 M onde foi adicionado *Coomassie Brilliant Blue G-250* suficiente para alcançar um valor de 1,3 - 1,5 unidades de absorvância, em 465 nm (branco de H_2O), após filtração da solução em papel de filtro. Para a construção da curva padrão foram preparadas diluições sucessivas ao meio partindo de uma solução padrão de albumina bovina comercial contendo 1 mg/mL. Foram avaliadas então soluções de 1,00; 0,50; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031 e 0,016 mg/mL, respectivamente.

Em cubetas de poliestireno foram adicionados 50 μL destas soluções, e misturados com 1 mL de H_2O deionizada e 1 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização, e transcorridos 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a absorvância em 595 nm. A calibração do valor 0 foi realizada com a mistura do reagente e H_2O . Cada valor foi determinado em triplicata.

3.9.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.9.4.1. Reagentes e soluções

Abaixo estão descritos os reagentes utilizados e as suas respectivas quantidades para a preparação das soluções necessárias para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

1. Tampão de Separação (pH 8,8)

TRIS	1,5 M
SDS	0,4 % p/v

2. Tampão de Concentração (pH 6,8)

TRIS	0,5 M
SDS	0,4 % p/v

3. Solução Acrilamida-Bisacrilamida

Acrilamida	30 % p/v
Bisacrilamida	0,8 % p/v

4. Bisacrilamida 2 % p/v

5. Solução Tampão de Corrida (pH 8,3)

TRIS	3,025 g/L (0,025 M)
Glicina	14,4 g/L (0,192 M)
SDS	1 g/L

6. *Loading Buffer*

TRIS	1,5 M (pH 6,8) 0,83 mL
Glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
Azul de Bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	Completado com 10 mL

Esta solução foi armazenada em alíquotas de 290 μ L a -20°C, sendo que antes do uso foram adicionados 13,5 μ L de DDT 0,5 M.


7. Persulfato de Amônio (PSA) 12 %

Persulfato de Amônio 12 % (m/v)	120 mg
H ₂ O deionizada	1 mL

3.9.4.2 Preparo das amostras e dos padrões

Após a determinação da concentração proteica das amostras a serem aplicadas, as mesmas foram diluídas para uma concentração de 0,2 mg/mL. Em seguida 20 μ L de cada amostra foi misturado a 10 μ L de solução *Loading Buffer* e aquecidas a 100 °C durante 5 min. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão de proteínas, contendo as enzimas descritas na Tabela 1. Estas soluções foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 1 min e, em seguida, foram aplicados no gel de poliacrilamida 10 μ L de amostra e 7,5 μ L de padrão.

Tabela 1 - Enzimas presentes na solução padrão e suas respectivas massas moleculares

		Enzima	MM (KDa)
97.0—		fosforilase	97,0
66.0—		albumina sérica	66,0
45.0—		ovalbumina	45,0
30.0—		anidrase carbônica	30,0
20.1—		inibidora de tripsina	20,1
14.4—		α -lactalbumina	14,4

3.9.4.3 Preparo, desenvolvimento e revelação do gel monodimensional

Foram utilizados dois tipos de géis, o gel de concentração e o gel de separação. Abaixo, estão indicadas as proporções dos reagentes que foram necessárias para preparar o gel de separação 12 % e o gel de concentração.

· Gel de separação

Reagente	Gel 12 %
Tampão de separação	1,25 mL
Solução acril-bisacrilamida	2 mL
H ₂ O	1,72 mL
PSA (10% p/v)*	50 μ L
TEMED	7 μ L

* Preparou-se no momento da utilização.

• **Gel de concentração**

Reagente	Quantidade
Tampão de concentração	375 μL
Solução acril-bisacrilamida	150 μL
H ₂ O	770 μL
Bisacrilamida 2 %	100 μL
PSA (10 % p/v)*	15 μL
TEMED	2,5 μL

* Preparou-se no momento da utilização.

Cada gel foi montado no suporte e foi adicionado o volume necessário da solução tampão de corrida, sendo então aplicada uma intensidade de corrente de 20 mA por gel. A voltagem inicial foi de 130 V até que a linha do corante atingisse o final do gel de concentração. Neste momento aumentou-se a voltagem para 180 V, constante até o final da corrida, o qual foi verificado quando a linha de frente do corante (azul de bromofenol, para o caso de migração anódica, pólo positivo) atingiu quase o final do gel de separação (tempo estimado de 1 hora e 20 min). Posteriormente, o gel foi retirado da cuba eletroforética e iniciou-se o processo de revelação.

3.9.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida 2D SDS-PAGE

3.9.5.1 Soluções

A. Tampão de amostra (alíquotas de 2,5 mL foram estocadas a -20 °C)

	Concentração final	Quantidade
uréia	7 M	10,5 g
tiouréia	2M	3,8 g
CHAPS	4% (m/v)	0,5 g
DTT	20 mM	76 mg
TRIS-HCl, 30 mM, pH 8,0		para 25 mL

B. Tampão de equilíbrio (alíquotas de 5 mL foram estocadas a -20 °C)

	Concentração final	Quantidade
TRIS-HCl, pH 8,8	50 mM	10 mL*
uréia	6 M	72,07 g
Glicerol (8% v/v)	30% (v/v)	69 mL
SDS	2% (m/v)	4,0 g
azul de bromofenol (Solução F)	0,001% (m/v)	400 μ L
Água deionizada		para 200 mL

* Solução estoque 1 mol/L

C. Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida

	Concentração final	Quantidade
Acrilamida	30% (m/v)	60 g
bisacrilamida	0,8% (m/v)	1,6 g
água deionizada		para 200 mL

D. Tampão de resolução

	Concentração final	Quantidade
TRIS	1,5 M	181,7 g
SDS	1%	10 mg
HCl		Ajustar o pH para 8,8
água deionizada		para 1 L

E. Tampão de corrida

	Concentração final	Quantidade
TRIS	250 mM	3,0 g
Glicina	1,92 mM	14,4 g
SDS	1%	1 g
água deionizada		para 1 L

F. Solução estoque de bromofenol

	Concentração final	Quantidade
azul de bromofenol	1%	100 mg
Tris-base	50 mM	60 mg
água deionizada	0,002% (m/v)	para 10 mL

G. Solução 10% SDS

	Concentração final	Quantidade
SDS	10% (m/v)	0,1 g
água deionizada		para 1 mL

H. Solução de persulfato de amônio 10%

	Concentração final	Quantidade
persulfato amônio	10% (m/v)	0,1 g
água deionizada		para 1 mL

I. Solução de agarose

	Concentração final	Quantidade
Tampão de corrida		100 mL
agarose	0,5%	0,5 g
azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	200 μ L

3.9.5.2 *Clean-up* das amostras

O *clean-up* da amostra foi realizado utilizando o kit 2-D *clean-up* da GE Healthcare, seguindo as orientações do fabricante. Este procedimento foi realizado por duas vezes e envolve a combinação de agentes precipitantes que eliminam da amostra a presença de interferentes, tais como sais e ácidos nucléicos, que dificultam o desenvolvimento e a resolução da metodologia. Para a remoção total dos possíveis interferentes esse procedimento foi realizado duas vezes com um intervalo de 24h.

3.9.5.3 Hidratação das tiras de IPG

Após os procedimentos de *clean-up* das amostras, iniciou-se a separação eletroforética, na qual as proteínas foram, primeiramente, separadas pelo ponto isoelétrico em fitas de IPG (*Immobilized pH Gradient*) de 13 cm, com pH variando entre 3 e 10. Para isso, a amostra foi ressuspendida em tampão de reidratação contendo: uréia 7M; tiouréia 2M; CHAPS 2% (m/v), azul de bromofenol (1%); 20 mM de DTT; 250 μ g de proteína e 1,25 μ L de Pharmalyte (3-10), perfazendo um volume de 250 μ L. Essa solução foi cuidadosamente colocada na bandeja de *DryStrip Reswelling Tray*, juntamente com fita de IPG e, em seguida, cobriu-se o sistema (amostra + fita) com óleo mineral (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare). O período de reidratação foi de 22 h à temperatura ambiente.

3.9.5.4 Primeira dimensão: focalização isoelétrica

Após a reidratação, iniciou-se o processo de focalização isoelétrica utilizando o focalizador isoelétrico Ettan™ IPGphor III. Para isso, as tiras foram colocadas no *Strip Holder* segundo o especificado pelo fabricante e a isoelectrofocalização foi realizada a 20 °C sendo aplicados 50 μ A por tira. O gradiente utilizado está descrito na Tabela 2, abaixo. Depois de focalizadas, as tiras foram submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE.

Tabela 2 - Gradiente de voltagem para focalização isoelétrica de fitas de 13 cm

Etapa	Voltagem (V)	Volts-Hora	Tempo (h)
1	100		10
2	500	500	
3	1000	750	
4	8000	11325	
5	8000	5067	
6	100		10

Vale ressaltar que todos os parâmetros especialmente o tempo de focalização, são muito particulares à espécie e ao tipo de tecido que se pretende analisar, e por isso precisam ser avaliados e ajustados de acordo com cada trabalho.

3.9.5.5 Segunda dimensão: SDS-PAGE

3.9.5.5.1 Preparo do gel de poliacrilamida 12,5 % (110 mL)

Para aplicar tiras de IPG de 13 cm de comprimento, foram preparados géis em placas de 18x16 cm com espaçadores de 1,0 mm de espessura e 1 cm de largura.

Estes géis foram preparados pela adição de 45,8 mL da solução de acilamida/bisacrilamida (solução C), 22 mL de tampão de resolução (solução D), 41,62 mL de H₂O deionizada, 550 μ L de solução de persulfato de amônio (solução H) e 36,30 μ L de TEMED. Essa solução foi colocada nas placas previamente montadas e limpas, e adicionada uma pequena camada de água destilada para evitar bolhas na extremidade superior do gel. Após a polimerização a água foi retirada e seguiu-se com a aplicação das tiras.

3.9.5.5.2 Equilíbrio das tiras

Antes de serem aplicadas ao gel as tiras foram submetidas a um tratamento com DTT e iodoacetamida no tampão de equilíbrio (solução B) para reduzir as pontes de dissulfeto das proteínas e alquilar os grupos tióis, evitando assim processos de re-oxidação durante o experimento de eletroforese.

A tira foi colocada em um tubo tampado com 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 50 mg de DTT e mantida sob agitação por 15 min. Essa solução foi descartada e trocada por 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 125 mg de iodoacetamida, mantida por 15 min, sob agitação.

3.9.5.5.3 Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE

Após equilíbrio das tiras e antes de serem aplicadas no gel, as fitas foram lavadas em tampão de corrida (solução E) (uma vez) para retirar o excesso da solução de equilíbrio.

Foram utilizados 20 μ L da solução estoque dos padrões de peso molecular aplicados em papel absorvente, o qual foi colocado à esquerda do gel, próximo ao extremo ácido da tira. Após isso, o gel foi selado com solução de agarose contendo 100 mL de tampão de corrida, 0,5 g de agarose 0,5% e 200 μ L azul de bromofenol 0,002% m/v.

O gel foi colocado na cuba de eletroforese (SE 600 Ruby system) refrigerada em 10-12 °C, previamente preenchida com 4 litros de tampão de corrida. O gel foi submetido a uma corrente inicial de 15 mA por 15 min, antes de migrarem no gel de separação. Posteriormente, as proteínas migraram sob campo eletroforético de 45 mA, a 4 °C, por aproximadamente 3 horas e 30 minutos, com voltagem máxima em 600 V. A corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol migrou até 0,5 cm da parte inferior do gel.

3.9.5.6 Revelação do gel com corante Coomassie Brilliant Blue R250

Para a revelação, o gel obtido foi mantido por 20 minutos em solução corante contendo 54% (v/v) de metanol, 13,5% (v/v) de ácido acético glacial e 0,27 % (m/v) de Coomassie Brilliant Blue R250. Em seguida, o gel foi descorado em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético glacial, sob agitação, até que as bandas de proteínas pudessem ser visualizadas com nitidez.

3.10 Ensaio enzimático

3.10.1 Preparo do extrato enzimático solúvel

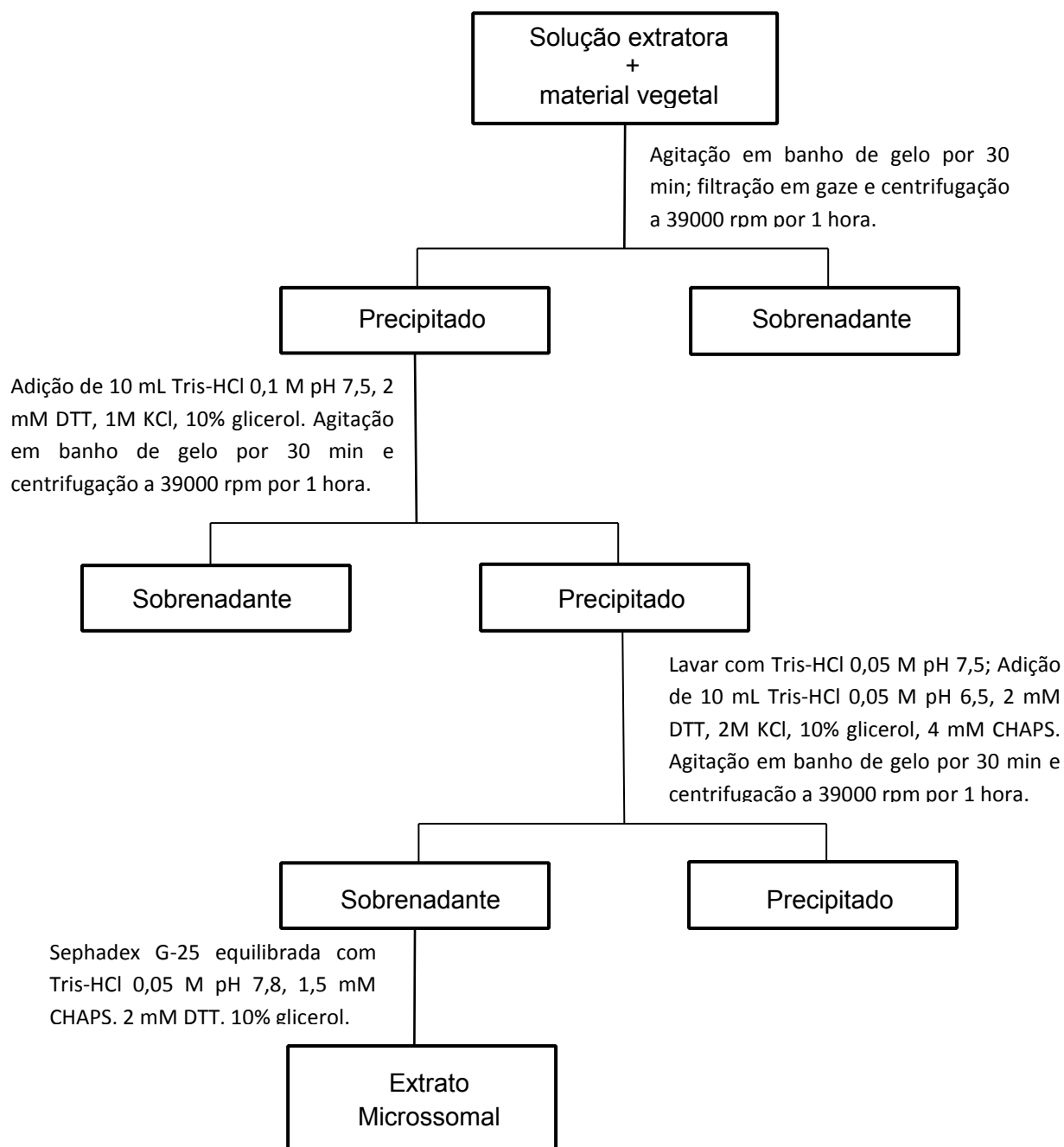
A solução extratora utilizada para obtenção do extrato enzimático foi otimizada a partir da solução descrita no item 3.9.1, com modificações baseadas em protocolos específicos para a enzima de comparação, a tocoferol ciclase.

Neste experimento, 4 g de folhas da espécie estudada foram trituradas em N₂ líquido utilizando gral e pistilo. Em seguida, adicionou-se 15 ml da solução extratora modificada, composta pelo tampão fosfato (0,2 M) pH 7,0 contendo 35 % (m/m) de PVPP, 5 mM de DTT, 75 mM de ácido ascórbico, 30 mM de MgCl₂, 20 % (v/v) glicerol e 1 mM de EDTA. Essa mistura permaneceu em agitação e banho de gelo por 30 min. Feito isso, o extrato foi filtrado em 6 camadas de gaze e centrifugado a 13000g por 10 min, obtendo-se, assim, o extrato enzimático.

3.10.2 Preparo do extrato enzimático microsomal

Para extração das enzimas microsomais utilizou-se o protocolo descrito por López e colaboradores (2010), com pequenas modificações.

Primeiramente o extrato foi realizado como descrito no item 3.10.1 até o final da extração. Em seguida o extrato foi filtrado em 6 camadas de gaze e centrifugados a 39000 rpm por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 com 2 mM de DTT, 1 M de KCl e 10% de glicerol. Essa suspensão foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 min, e em seguida foi centrifugado a 39000 rpm por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi novamente retirado e o precipitado foi lavado cuidadosamente com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, e ressuspenso em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,5 com 2 mM de DTT, 2 M de KCl, 10% de glicerol e 4 mM de CHAPS. Essa suspensão foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 min, e novamente centrifugado a 39000 rpm por 1 hora a 4 °C. Após esse procedimento o sobrenadante foi coletado e submetido a coluna cromatográfica de Sephadex G-25, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8 com 1,5 mM de CHAPS, 2 mM de DTT e 10% de glicerol. O eluato foi recolhido e chamado de extrato enzimático microsomal. As etapas dessa extração estão descritas no Esquema 5.

Esquema 5 - Preparação do extrato proteico microssomal.

3.10.3 Preparo da amostra (precursor)

Devido a baixa polaridade da substância **2** foi necessária a escolha de um solvente orgânico que além de solubilizar a amostra, não afetasse a estrutura das enzimas a serem testadas. Para isso, foi escolhido o dimetilsulfóxido (DMSO) por ser comprovado que soluções de baixa concentração (até 10% v/v) não causam danos estruturais às proteínas

(BATISTA et al., 2013). Para a realização deste ensaio enzimático foi, então, preparada uma solução de 30 mM do precursor (**2**) em DMSO.

3.10.4 Desenvolvimento do ensaio enzimático

Imediatamente após a preparação dos extratos enzimáticos realizou-se o ensaio de atividade com o possível precursor do ácido gaudichaudiânico (**2**). Para isso, seguiu-se o esquema descrito na Tabela 3, sendo que todos os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 3. Esquema de brancos e reação para avaliação da atividade enzimática

	Branco 1	Branco 2	Reação
Tampão Fosfato (0,2M, pH 7,0)	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Extrato enzimático	100 μ L	-	100 μ L
Precursor (2) (30mM)	-	25 μ L	25 μ L
MgCl₂ (10 mM)	50 μ L	50 μ L	50 μ L
H₂O	25 μ L	100 μ L	-

Os ensaios foram preparados em microtubos tipo eppendorfs de 1,5 mL, incubados em banho de água à 40 °C e coletados em diferentes tempos (0,5 h; 1 h; 12 h; 24 h). Após o tempo de incubação foram adicionados 400 μ L de AcOEt, afim de cessar a reação e extrair o produto formado por meio de partição líquido-líquido. Essa extração foi realizada por 2 vezes, visando um melhor rendimento.

Após completa secagem do solvente (AcOEt), as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol e analisadas em CLAE analítico utilizando coluna Phenomenex Luna[®] C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), modo gradiente 70-100 % MeOH/H₂O em 30 min, seguidos de 5 min a 100 % MeOH, injeção de 40 μ L de amostra e vazão de 1 mL/min. A detecção foi realizada na região de ultravioleta a 254 nm.

3.11 Avaliação da atividade antifúngica

3.11.1 Microrganismos

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pela Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Fusco Almeida, com cepas oriundas do Laboratório de Micologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. As espécies testadas foram *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90012, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 7100.

3.11.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios para determinação das concentrações inibitórias mínimas de cada composto foram realizados utilizando o método de microdiluição em placa, seguindo as técnicas descritas pelo *National Committee for Clinical Standards for yeasts* M27-S3 e M38-A2 para fungos filamentosos, com algumas modificações.

Dessa forma, as substâncias a serem analisadas foram diluídas serialmente em uma placa de 96 poços, iniciando da concentração de 250 mg/L até a concentração de 0,48 mg/L. Em seguida, foi adicionada a suspensão de conídios com concentração entre 2,5 e 5,0 x 10³ UFC/mL, aproximadamente. Feito isso, as placas foram incubadas em agitador (150 rpm) a 37 °C. As leituras de CIM foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm e confirmadas utilizando o corante Alamar Blue (Sigma-Aldrich). Para controle positivo foram utilizados a anfotericina B e o itraconazol.

3.11.3 Concentração fungicida mínima (CFM)

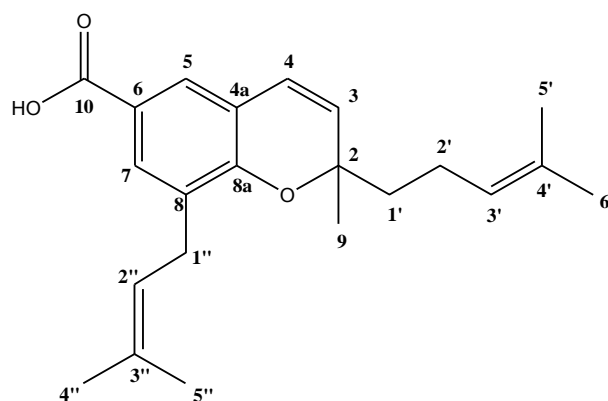
Para a determinação da concentração fungicida mínima uma alíquota de cada concentração utilizada nos teste de CIM foi transferida para um placa com meio de cultura Sabouraud (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubada a 37 °C pelo tempo específico de cada fungo. As leituras de inibição de crescimento de colônias foram realizadas visualmente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização do ácido gaudichaudiânico (1)

O fracionamento cromatográfico da substância **1** foi realizado como descrito no item 3.4 deste trabalho, seguindo a metodologia proposta por Batista Junior e colaboradores (2008) com algumas modificações. Após a realização de duas colunas cromatográficas de baixa pressão obteve-se as frações 7, 8, 9, 10 e 11 com aspecto oleoso e levemente amarelado. Pela análise em CCDC concluiu-se tratar da mesma substância, o que foi confirmado posteriormente pela análise por RMN de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 7-9) e ^{13}C (Figuras 10-12) da união dessas frações apresentam características inerentes ao ácido gaudichaudiânico. Esse composto possui dados de RMN descritos por Lago e colaboradores (2004), Lopes e colaboradores (2008b) e Batista Junior e colaboradores (2008).



No espectro de RMN de ^1H de **1** foram observados dupletos em δ 5,51 ($J= 10,0$ Hz, 1H) e δ 6,31 ($J= 10$ Hz, 1H) característicos do anel pirano insaturado dos *2H*-cromenos, que se referem aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. Na região de hidrogênios aromáticos encontram-se dois dupletos em δ 7,51 ($J= 2$ Hz, 1H) e δ 7,67 ($J= 2$ Hz), com constantes de acoplamento características de acoplamento *meta*, referentes aos hidrogênios H-5 e H-7, respectivamente.

O substituinte do anel aromático foi identificado como um grupo isopentenílico caracterizado pelos sinais em δ 3,21 (d, $J= 7$ Hz, 2H) e δ 5,02 (tq,

$J^3=7$ Hz e $J^4=1,5$ Hz, 1H) referentes a H-1'' e H-2'', respectivamente, além dos sinais em δ 1,66 (s, 6H) atribuído aos grupos metílicos H-4'' e H-5''. A presença da segunda unidade isoprênica ligada ao anel pirano foi confirmada pelos sinais em δ 5,21 (tq, $J^3=7,5$ Hz e $J^4=1,5$ Hz, 1H) e 2,04 (m, 2H) referentes à H-3' e H-2'. Além dos sinais em δ 1,48 (s, 3H) e δ 1,58 (s, 3H), atribuídos aos grupos metílicos H-5' e H-6', respectivamente.

No espectro de ^{13}C observa-se a presença do sinal em δ 171,7 característico de carbonila de ácido carboxílico, referente a C-10. Além disso, pôde-se confirmar a presença das unidades isoprênicas atribuindo aos sinais δ 41,8, 22,7, 123,8, 131,8, 17,6, 25,6 que correspondem respectivamente a C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6' e os sinais em δ 28,1, 121,9, 132,6, 25,7, 17,8 foram atribuídos a C-1'', C-2'', C-3'', C-4'' e C-5'', respectivamente. O núcleo 2H-cromeno foi confirmado pelos sinais em δ 79,9, 129,4, 122,5, 120,1, 126,7, 120,6, 131,8, 128,9, 155,9 atribuídos a C-2, C-3, C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7 e C-8a, respectivamente. A estrutura proposta foi corroborada pelo espectro de massas obtido com ionização por eletrospray, no modo negativo (Figura 13). O composto **1** apresentou um pico correspondente ao íon molécula desprotonada m/z 339,48 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C estão de acordo com aqueles descritos na literatura (LAGO et al., 2004) e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1** em CDCl_3

Posição	$^{13}\text{C}^a$ δ (ppm)	$^1\text{H}^b$ δ (ppm), multipl., J (Hz)
2	79,9	-
3	129,4	5,51 (d, 10,0, 1H)
4	122,5	6,31 (d, 10,0, 1H)
4a	120,1	-
5	126,7	7,51 (d, 2,0, 1H)
6	120,6	-
7	131,8	7,67 (d, 2,0, 1H)
8	128,9	-
8a	155,9	-
9	27,1	1,34 (s, 3H)
10	171,1	-
1'	41,8	1,70 (m)
2'	22,7	2,03 (m, 2H)
3'	123,8	5,02 (tq, 7,0 e 1,5, 1H)
4'	131,8	-
5'	17,6	1,48 (s, 3H)
6'	25,6	1,58 (s, 3H)
1''	28,1	3,21 (d, 7,0, 2H)
2''	121,9	5,21 (tq, 7,5 e 1,5, 1H)
3''	132,6	-
4''	25,7	1,66 (s, 3H)
5''	17,8	1,66 (s, 3H)

^a125 MHz; ^b500 MHz

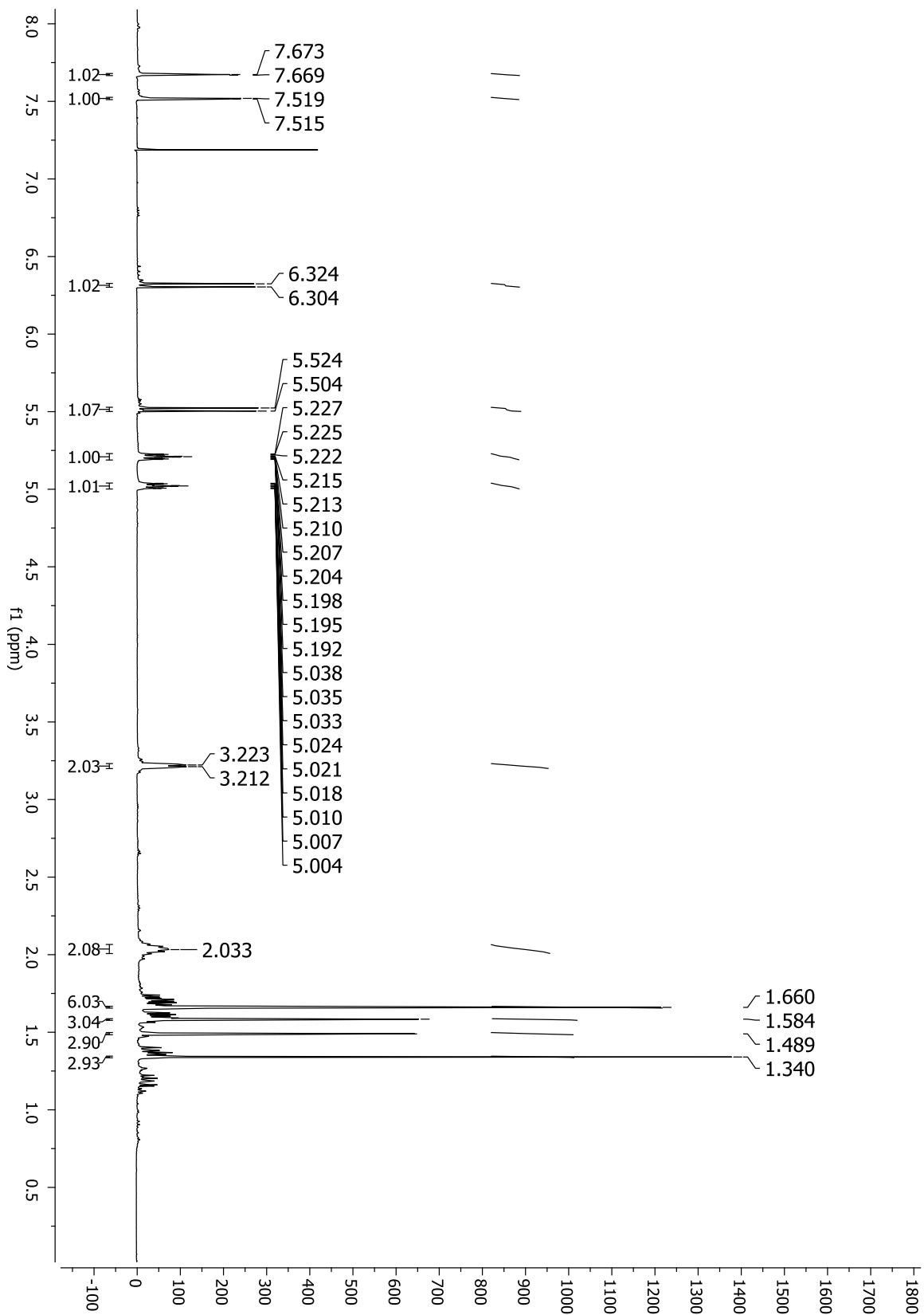
Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **1**

Figura 8 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **1**

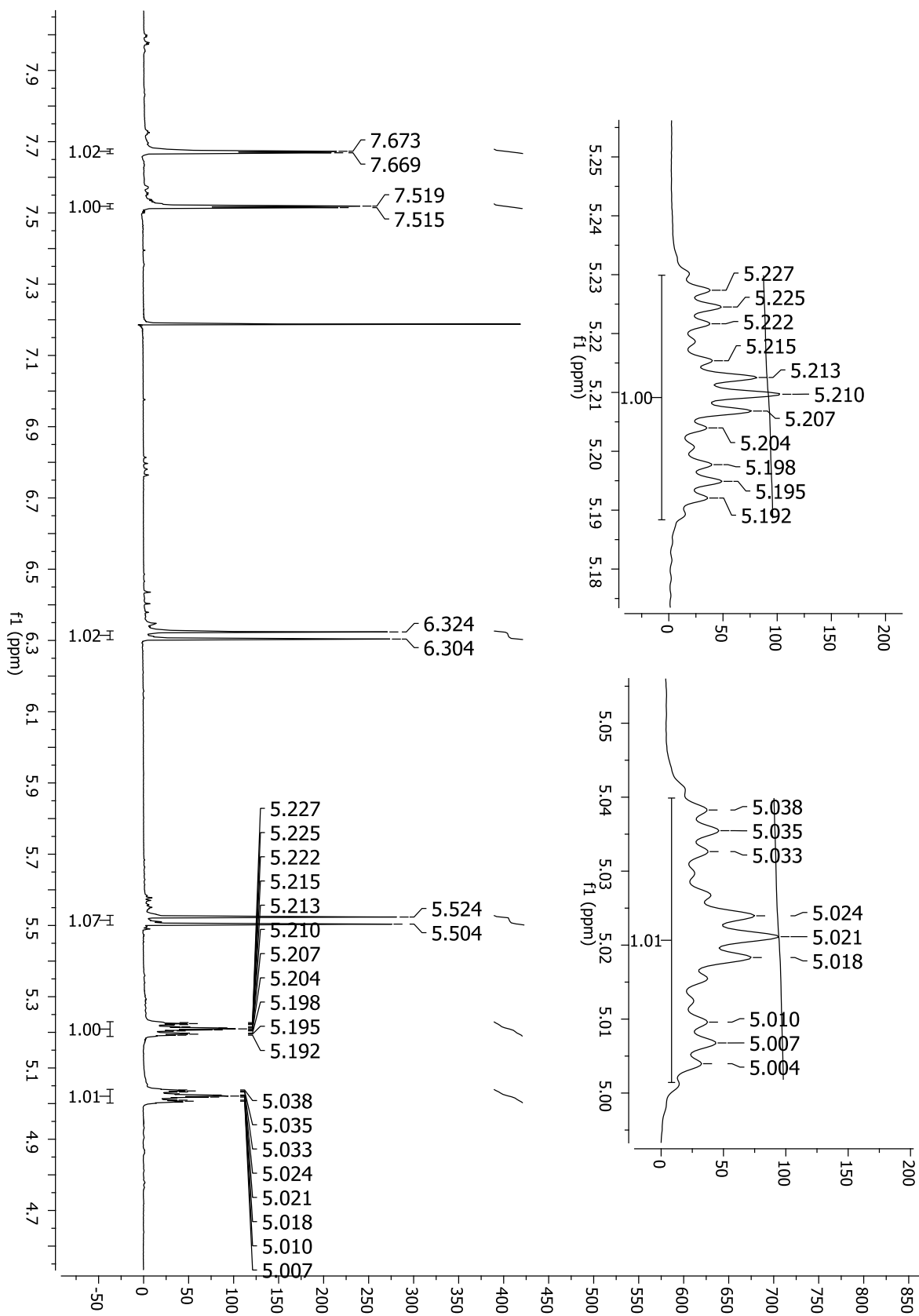


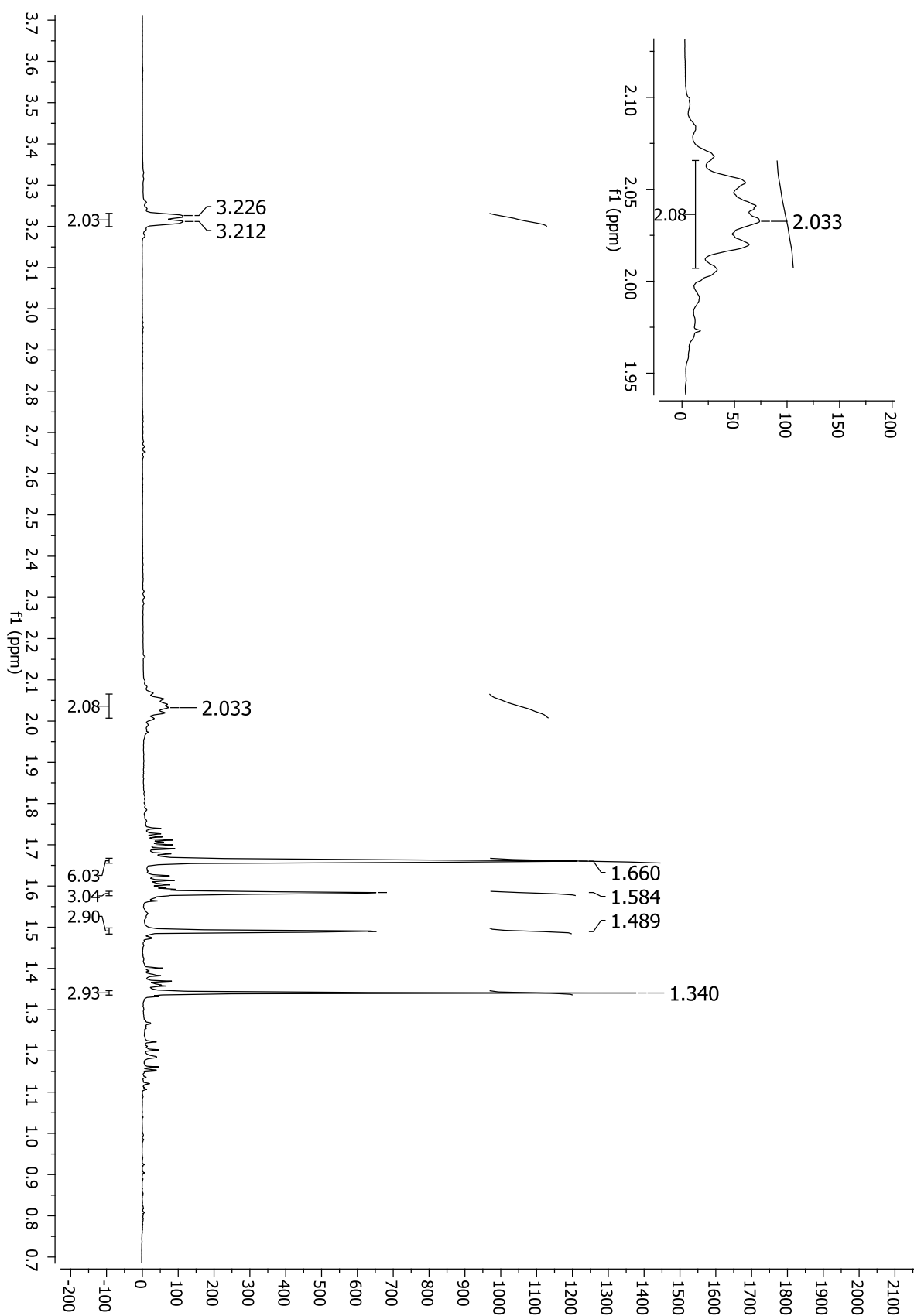
Figura 9 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **1**

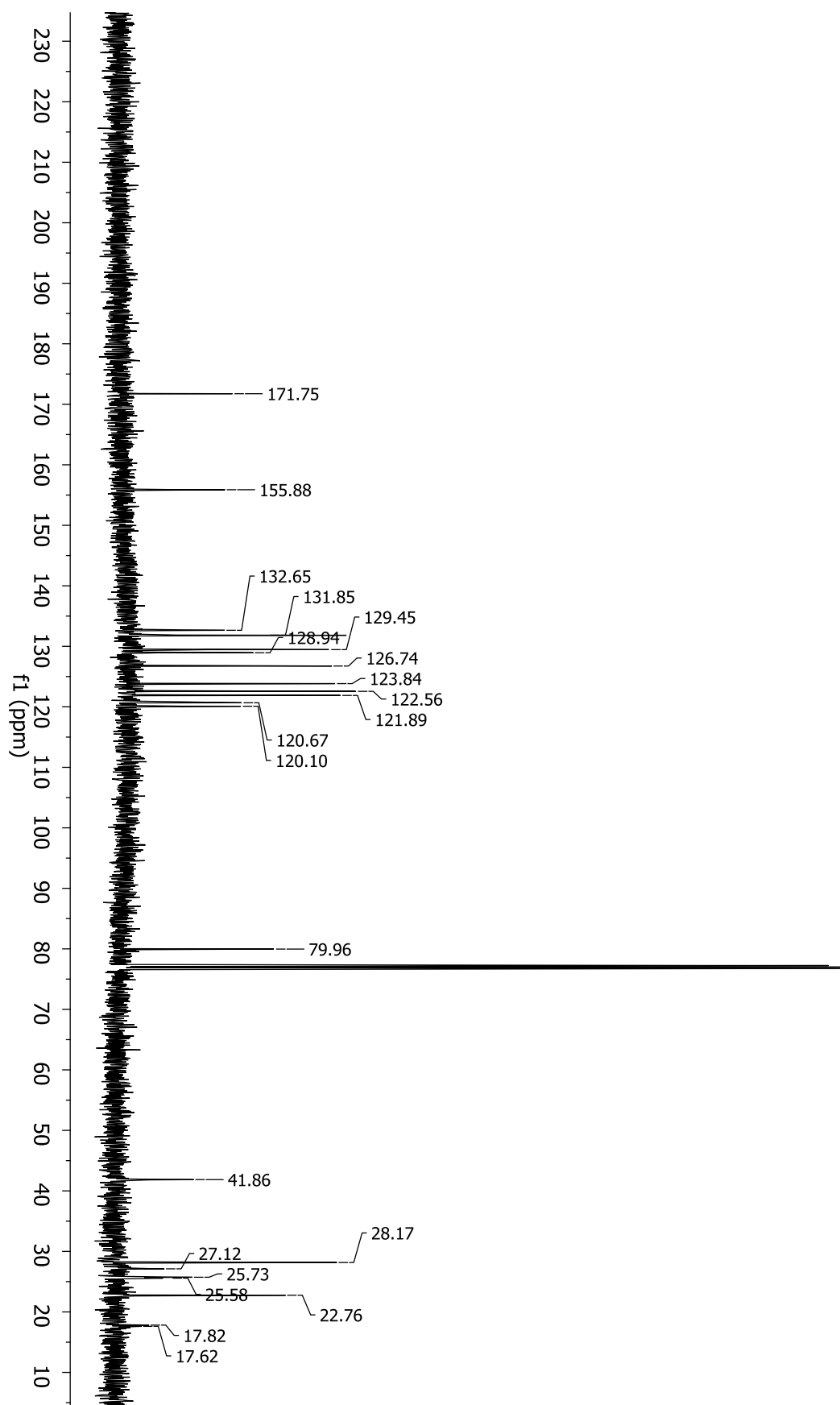
Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **1**

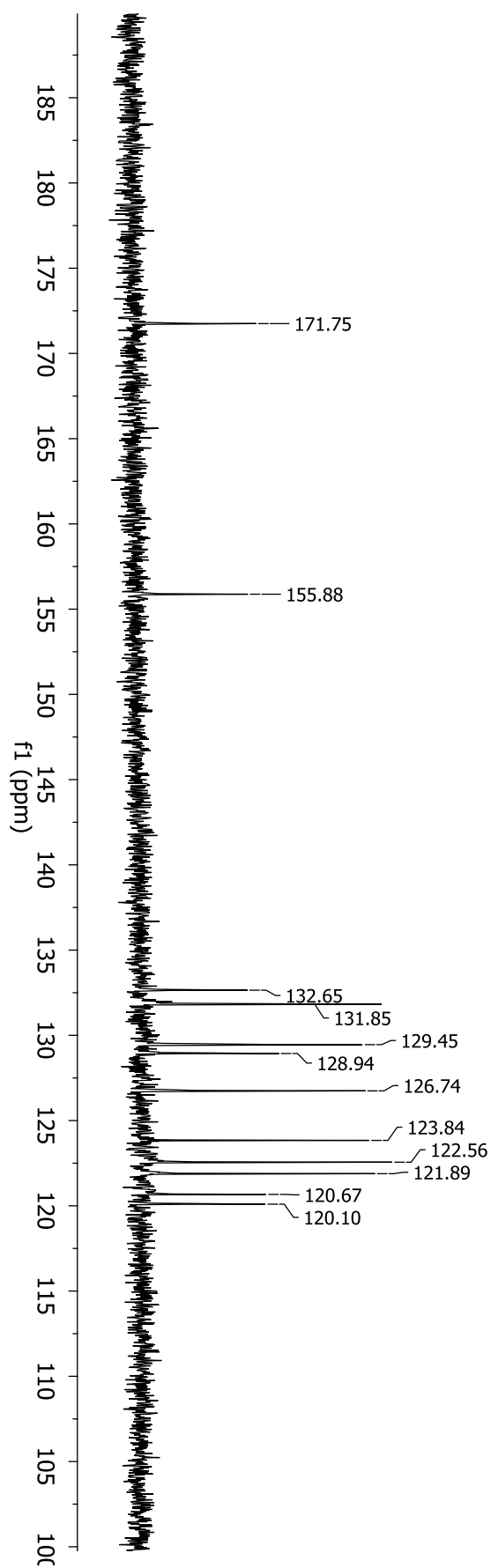
Figura 11 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **1**

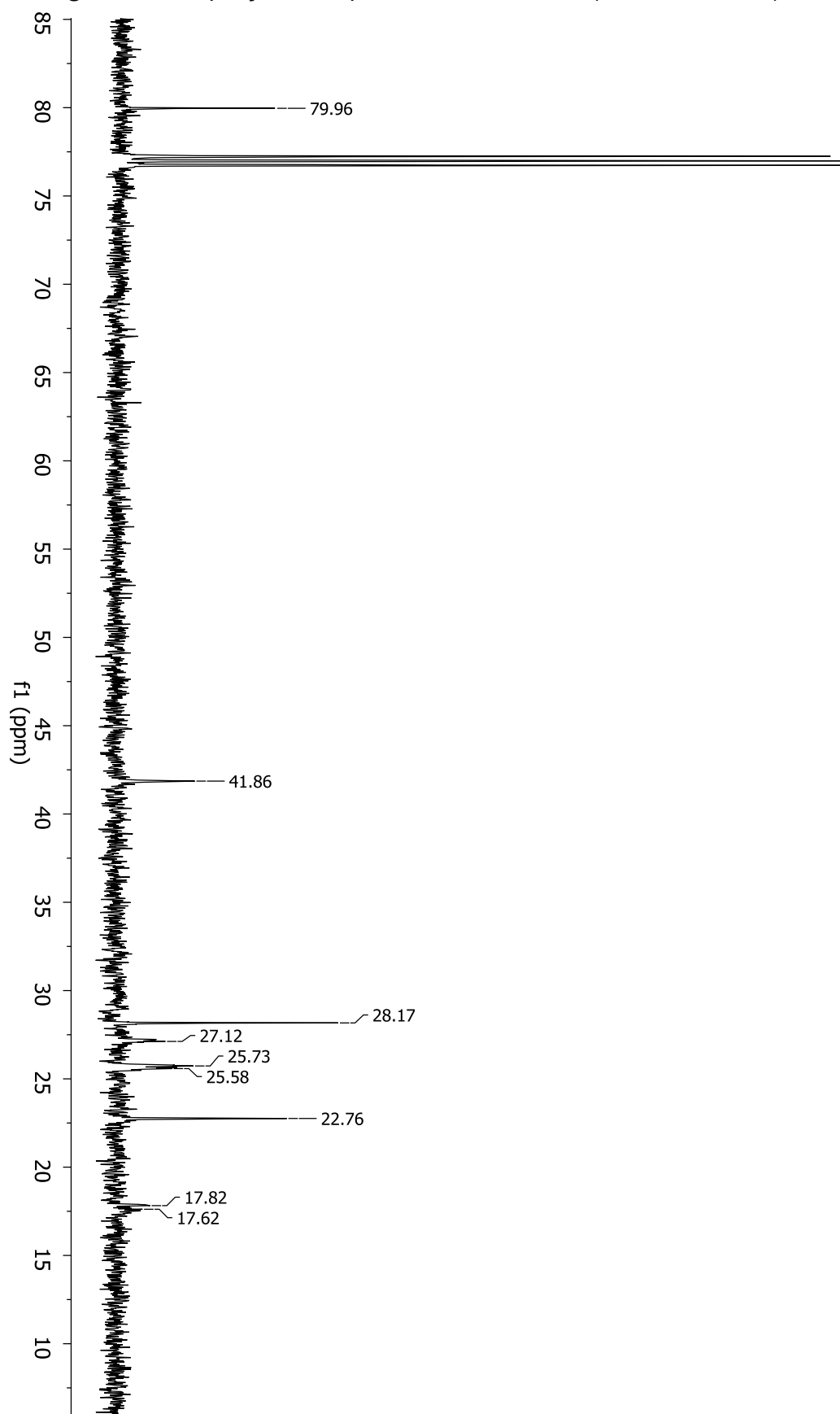
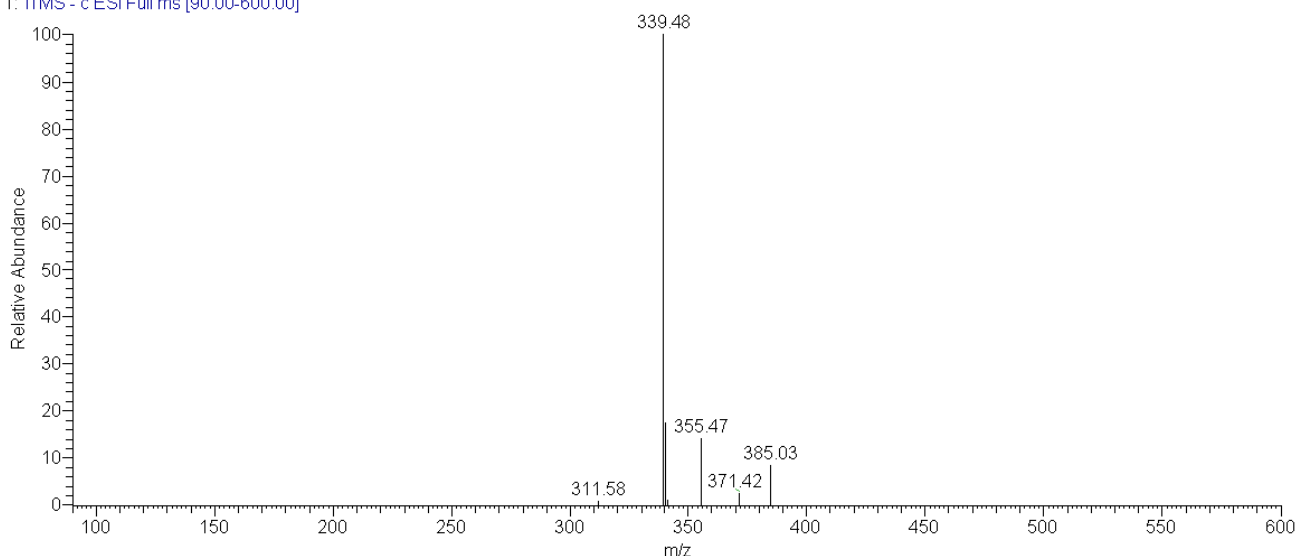
Figura 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **1**

Figura 13 - Espectro de massas de **1** por eletrospray e modo negativo

amandafurlan_acgaud_esineg_1204201201_120328142512 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.20E2
T: ITMS - c ESI Full ms [90.00-600.00]



4.2 Resolução dos enantiômeros de **1**

Assim como descrito no item 1.4 (pg. 25) deste trabalho, o ácido gaudichaudiânico acumula-se na espécie *Piper gaudichaudianum* na forma de mistura racêmica. A fim de investigar a atividade contra fungos patógenos humanos de cada enantiômero separadamente, a mistura racêmica de **1** foi submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência quiral, em escala semi-preparativa. A partir de 12,5 mg da mistura racêmica e após sucessivas injeções, obteve-se 1,5 mg de cada enantiômero, denominados **1.1** e **1.2**. O baixo rendimento deve-se, em parte, à retenção das substâncias de interesse na coluna cromatográfica, as quais só puderam ser recuperadas após o procedimento de limpeza, além de degradações durante o processo de isolamento.

Os cromatogramas quirais analíticos obtidos para a mistura racêmica de **1** e seus enantiômeros resolvidos estão apresentados nas Figuras 14, 15 e 16.

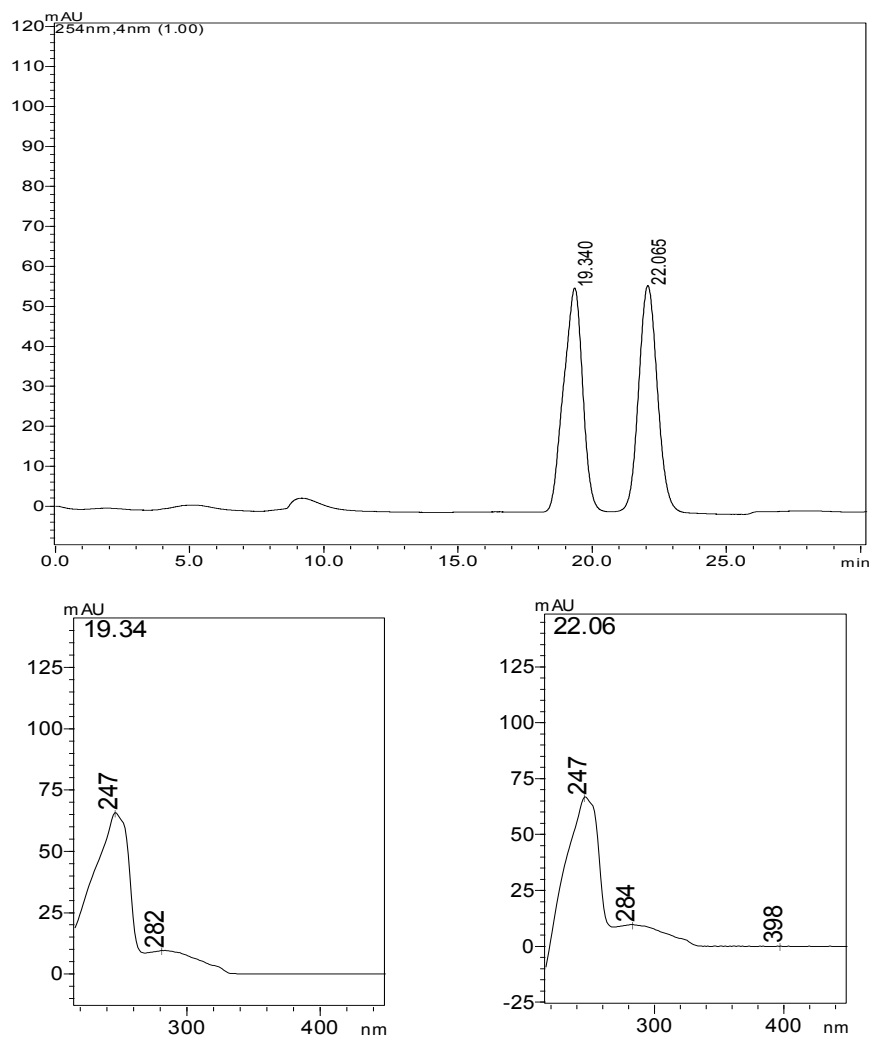
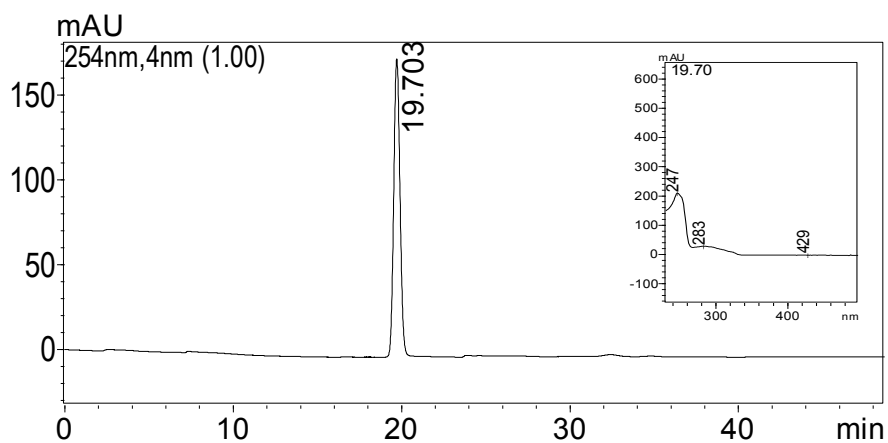
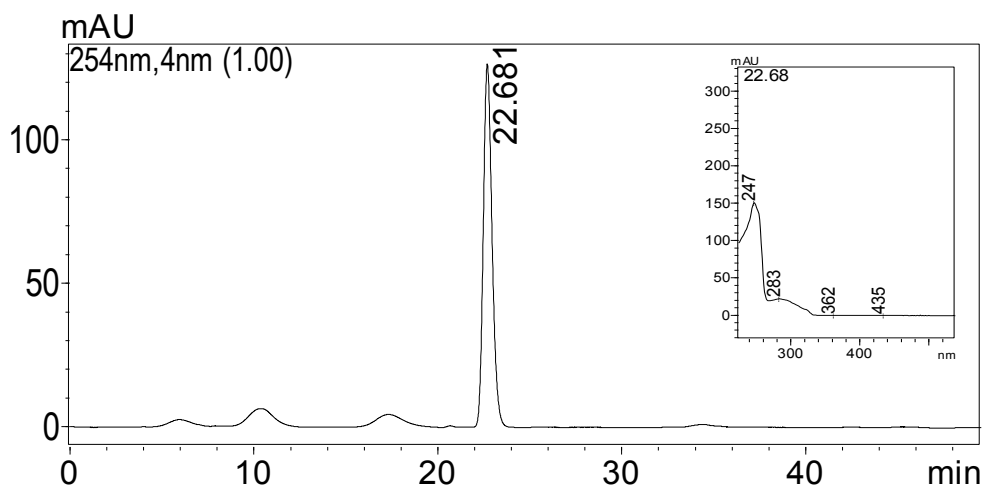
Figura 14 - Cromatograma da mistura racêmica de 1 e espectros no UV**Figura 15 - Cromatograma do enantiômero 1.1**

Figura 16 - Cromatograma do enantiômero **1.2**

De acordo com Batista Junior e colaboradores (2011b) o primeiro pico a eluir na análise por CLAE (**1.1**, $t_R = 19,34$ min) foi determinado como (+)-(S)-enantiômero, seguido (-)-(R)-enantiômero (**1.2**, $t_R = 22,06$ min), ambos com rotação específica de $[\alpha]_D^{25} = 21$ deg ($\text{g}^{-1} \text{dm}^{-1} \text{cm}^3$) em CHCl_3 . A presença desses enantiômeros traz questionamentos importantes do ponto de vista biossintético, sugerindo a presença de dois sistemas enzimáticos dedicados a formação de cada enantiômero, como na biossíntese dos monoterpenos enantioméricos (DEWICK, 2009), ou uma ciclização por catálise química do derivado geranilado do ácido benzoico, que seria o precursor imediato de **1** (LOPES et al., 2007).

4.3 Isolamento e caracterização da substância **2**

Buscando um melhor entendimento da etapa de ciclização que ocorre durante a biossíntese do ácido gaudichaudiânico, algumas frações obtidas na separação cromatográfica do extrato das folhas de *Piper gaudichaudianum* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM). Observou-se a presença de três picos com m/z de interesse que poderiam ser atribuídos a três precursores propostos (Figura 17). O primeiro pico na fração 5, em $t_R = 30,78$ min, que foi chamado de P4, de $m/z = 341,22$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, seria um derivado do ácido *p*-hidroxibenzoico geranilado na posição C-3 e prenilado em C-5 (Figura 17 (A)). O segundo pico encontrado na mesma fração 5, em $t_R = 30,19$ min, com $m/z = 357,32$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ pode ser correlacionado ao derivado epoxidado na posição C-2' e C-3' do

precursor A (Figura 17 (B)), e por fim, o pico da fração 9 em $t_R = 24,27$ min, com $m/z = 273,39 [M+H]^+$ que seria atribuído ao precursor derivado do ácido *p*-hidroxibenzoico geranilado apenas na posição C-3 (Figura 17 (C)).

Os cromatogramas e os espectros de massas das frações 5 e 9 estão apresentados a seguir nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 17 - Estrutura química dos precursores propostos para 1

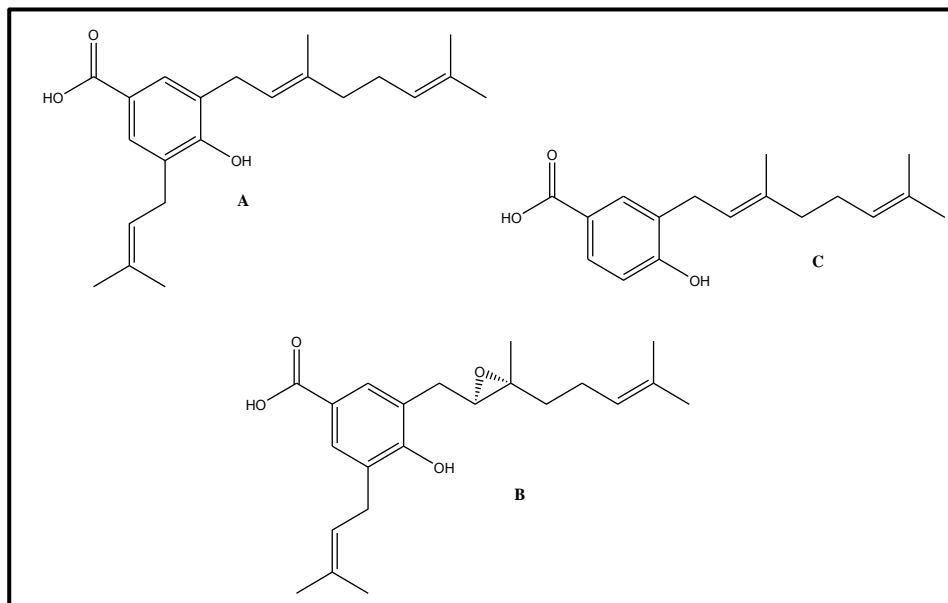
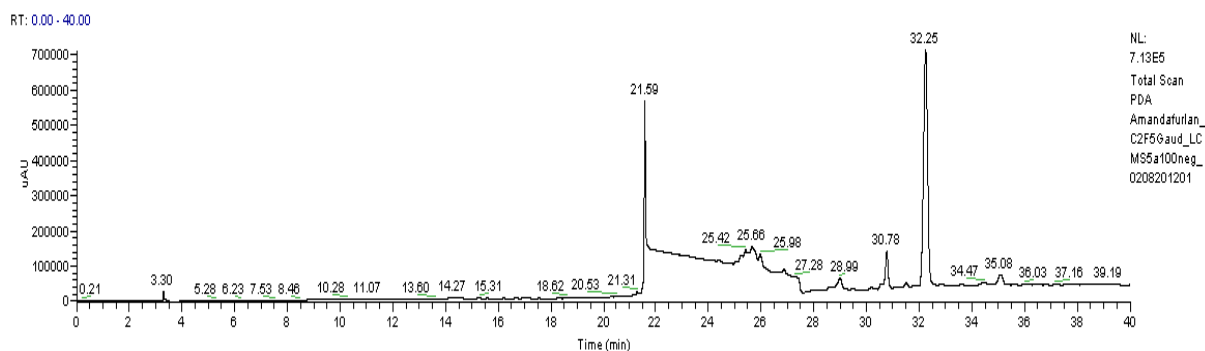


Figura 18 - Cromatograma da Fração F5 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 30,78 min.

Amandafurlan_C2F5Gaud_LCMS5a100neg_02...

02-08-2012 20:52:35



Amandafurlan_C2F5Gaud_LCMS5a100neg_0208201201#1810 RT: 30.78 AV: 1 NL: 1.23E2
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

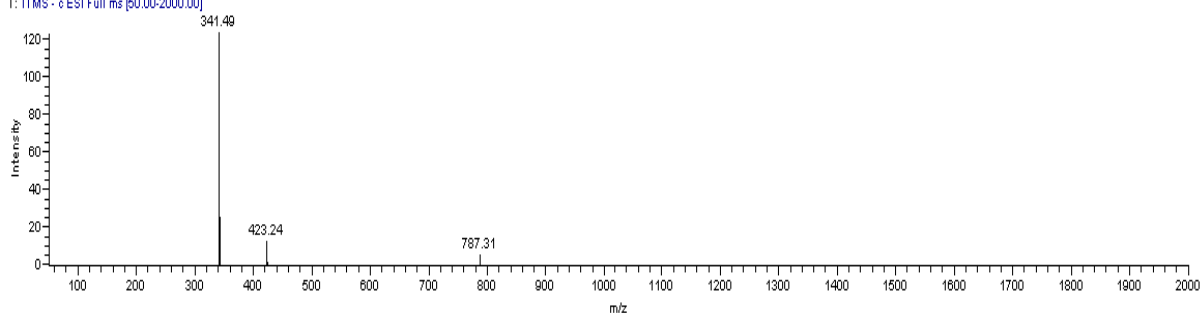
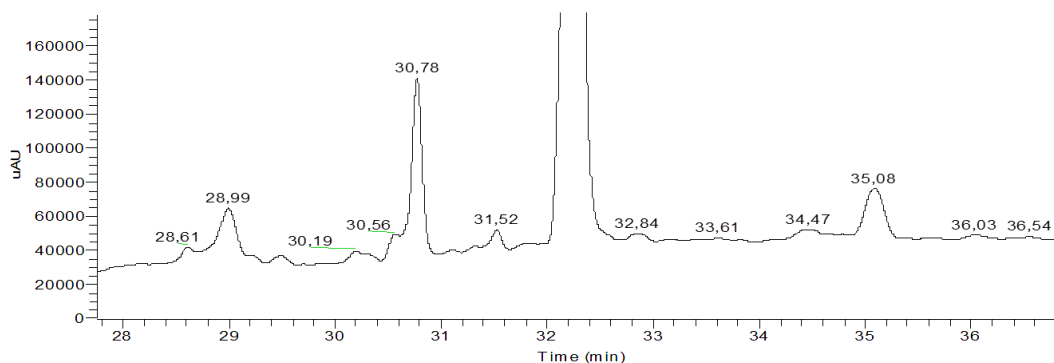


Figura 19 – Ampliação do cromatograma da Fração F5 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 30,19 min.

Amandafurlan_C2F5Gaud_LCMS5a100neg_02...

2/8/2012 20:52:35

RT: 27,75 - 36,89



NL:
7,13E5
Total Scan
PDA
Amandafurlan_
C2F5Gaud_LC
MS5a100neg_
0208201201

Amandafurlan_C2F5Gaud_LCMS5a100neg_0208201201 #1775 RT: 30,18 AV: 1 NL: 3,01

T: ITMS - c ESI Full ms [50,00-2000,00]

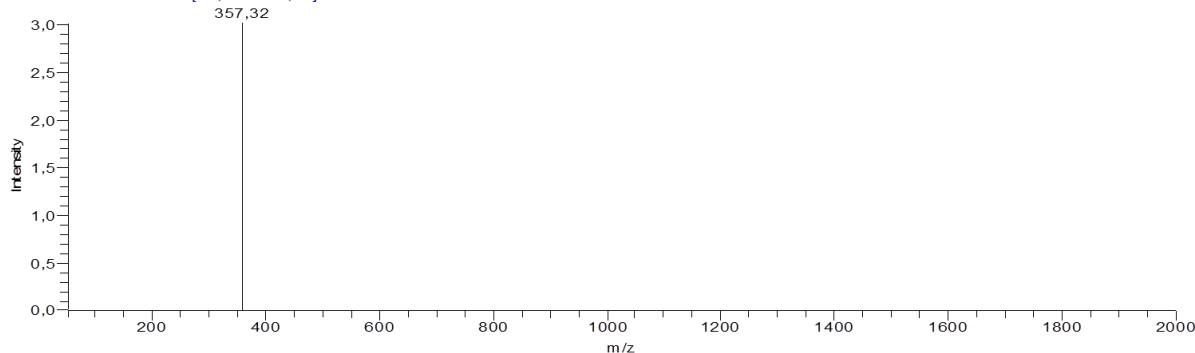
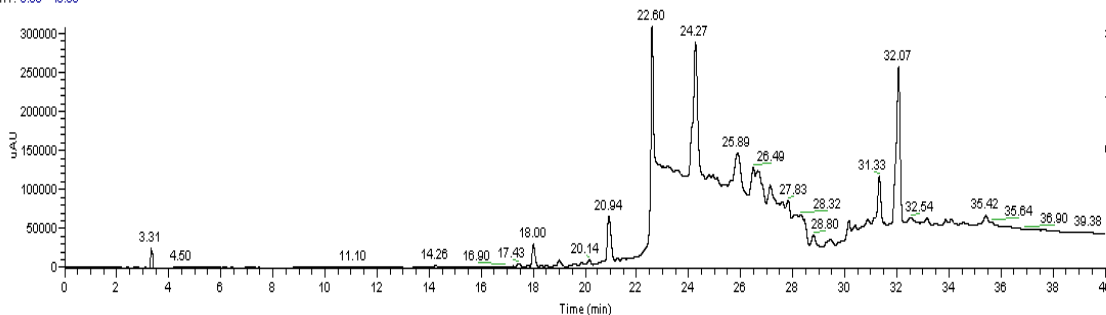


Figura 20 - Cromatograma da Fração F9 e espectro de massas (IES, modo negativo) do pico 24,27 min.

Amandafurlan_C2F9Gaud_LCMS5a100neg_02...

02-08-2012 19:00:40

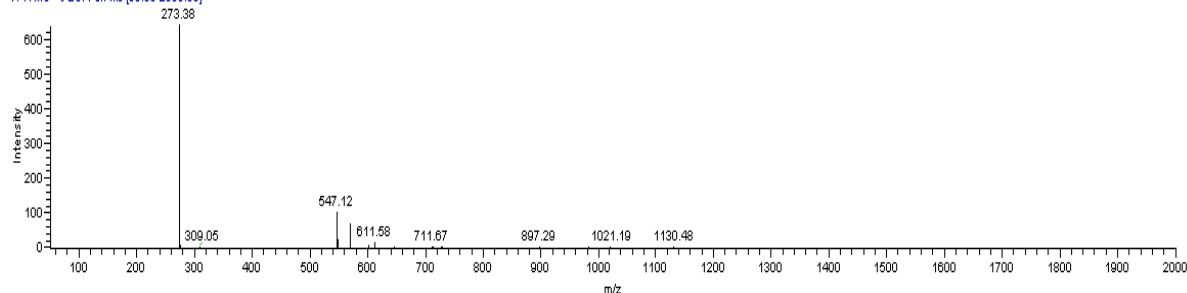
RT: 0.00 - 40.00



NL:
3,08E5
Total Scan
PDA
Amandafurlan_
C2F9Gaud_LC
MS5a100neg_
0208201201

Amandafurlan_C2F9Gaud_LCMS5a100neg_0208201201 #1427 RT: 24,26 AV: 1 NL: 6,39E2

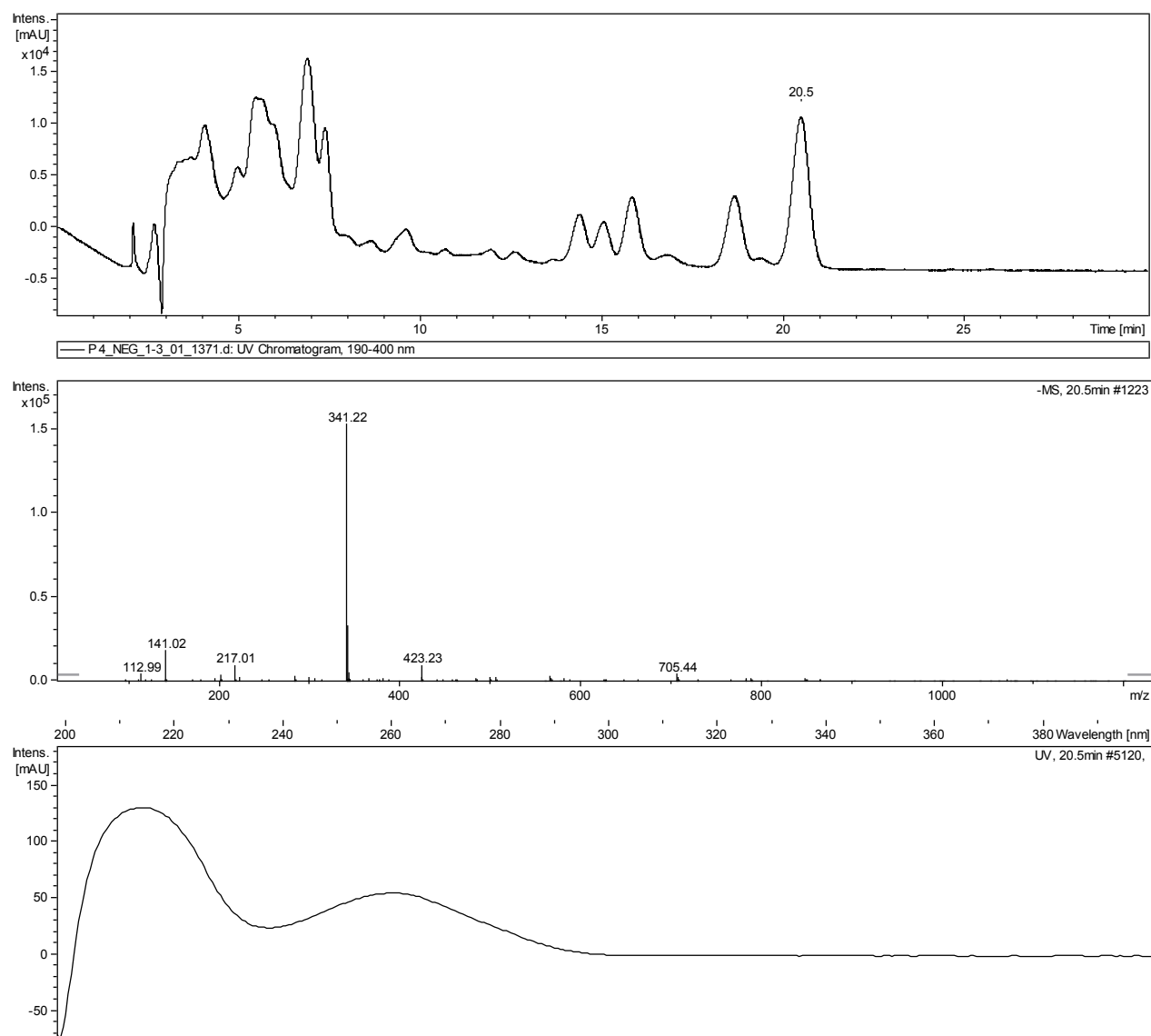
T: ITMS - c ESI Full ms [60,00-2000,00]



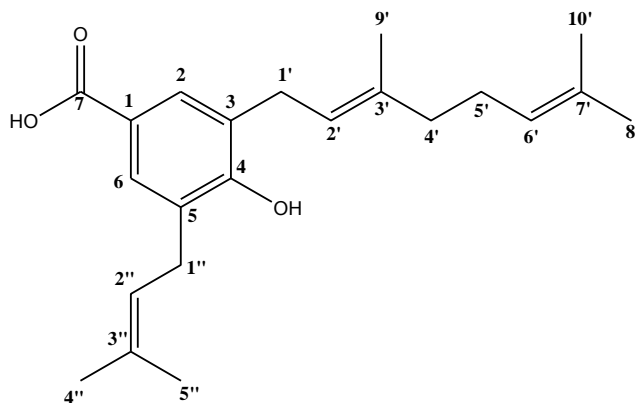
Após a análise dos dados optou-se por isolar a substância de m/z 341,22 (**2**) por apresentar melhor resolução cromatográfica e conter maior massa da fração de interesse. Além disso, a substância **2** facilitaria a análise dos ensaios enzimáticos, pois sua ciclização formaria o próprio ácido gaudichaudiânico.

O isolamento deste possível precursor de **1** seguiu o procedimento descrito no item 3.6 (pg. 35), no qual foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência 510 mg da fração 5, obtendo-se 25,5 mg da substância de interesse (P4). Ao injetá-la novamente para confirmar sua pureza observou-se a presença de um cromatograma complexo contendo outras substâncias. Essa amostra foi, então, analisada por CL-EM a fim de identificar novamente o pico que continha a m/z do possível precursor. Feito isso, o isolamento seguiu até a obtenção da substância **2** (5 mg). O cromatograma obtido nessa análise, bem como o espectro de massas relacionado a substância de interesse estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Cromatograma de P4, espectros de massas (IES, modo negativo) e no ultravioleta da substância selecionada para isolamento ($t_R = 20,5$ min).



Após o isolamento da substância **2**, a mesma foi enviada para análises de RMN de ^1H (Figuras 22-24) e ^{13}C (Figuras 25-27), nas quais confirmou-se a estrutura química de **2**.



As análises dos espectros de RMN podem ser comparadas aos dados previamente realizados por Dong e colaboradores (1999), no qual o autor caracteriza o ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil)benzoico, composto isolado das folhas de *Myrsine seguinii* com estrutura idêntica ao precursor proposto neste trabalho.

A presença do anel aromático é evidenciada pelo sinal em δ 7,75 (s, 2H), no espectro de ^1H , referente a H-2 e H-6 que caracteriza um anel com quatro substituintes e com hidrogênios aromáticos em ambientes químicos muito similares. Os sinais em δ 5,32 (t*, 2H) e δ 5,08 (m, 1H) podem ser atribuídos aos hidrogênios olefínicos, H-2', H-2'' e H-6', respectivamente, característicos das unidades isoprênicas da estrutura proposta. Os hidrogênios metilênicos H-1' e H-1'' são representados pelo sinal δ 3,38 (m, 2H) característicos de hidrogênios benzílicos. O hidrogênio H-5', mais distante do anel aromático e, por isso mais blindado, é representado pelo sinal em δ 2,10 (m, 2H). Apesar do excesso de sinais na região mais blindada do espectro, é possível inferir os sinais dos 5 grupos metílicos pertencentes as porções prenila e geranila, em δ 1,77, 1,73, 1,68, 1,69 e 1,60, referentes a H-9', H-5'', H-4'', H-8' e H-10', respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C destaca-se a presença do sinal em δ 171,2 referente a carboxila ligada ao anel aromático em C-7. Além disso, o sinal em δ 158,1 pode ser atribuído ao C-4, carbono aromático ligado ao grupo -OH. O núcleo aromático foi confirmado pela presença dos sinais δ 131,7, 130,6, 127,7, 127,2 e 124,0 referentes aos carbonos C-2, C-6, C-3, C-5 e C-1. Já as unidades isoprênicas são caracterizadas pelos sinais δ 139,3, 135,1, 132,2 referentes aos carbonos olefínicos quaternários C-3', C-3'' e C-7', δ 124,2, 121,5 e 121,4 atribuídos aos carbonos olefínicos terciários C-6', C-2' e C-2'', δ 39,9, 29,9, 29,5 e 26,0 referentes aos carbonos metilênicos C-1', C-1'', C-4' e C-5', além dos sinais δ 25,9, 25,0, 18,1, 17,9 e 16,4 atribuídos aos carbonos metílicos C-4'', C-5'', C-8', C-9' e C-10'. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **2** em CDCl_3

Posição	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ δ (ppm)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ δ (ppm), multipl., J (Hz)
1	124,0	-
2	131,7	7,75 (s, 2H)
3 ou 5	127,7	-
4	158,16	-
3 ou 5	127,2	-
6	130,6	7,75 (s, 2H)
7	171,2	-
1'	29,9	3,38 (m, 4H)
2'	121,4	5,32 (t*, 2H)
3'	139,3	
4'	39,9	2,10 (m, 2H)
5'	26,0	2,10 (m, 2H)
6'	124,2	5,08 (m, 1H)
7'	132,2	
8'	25,0	1,66
9'	16,4	1,77
10'	17,9	1,60
1''	29,5	3,38 (m, 4H)
2''	121,5	
3''	135,1	
4''	25,9	1,73 ou 1,68
5''	18,1	1,73 ou 1,68

^a75 MHz; ^b300 MHz

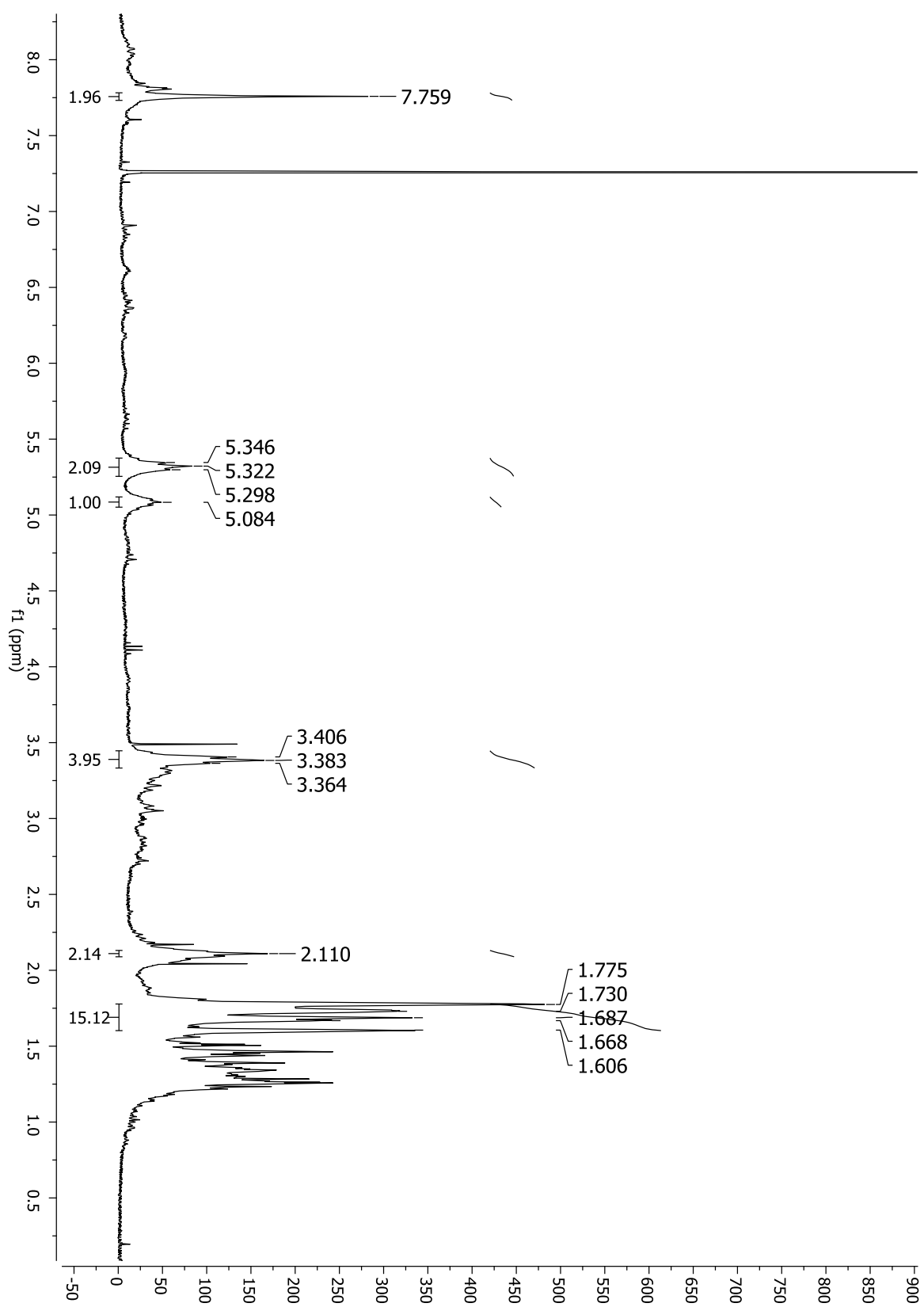
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2**

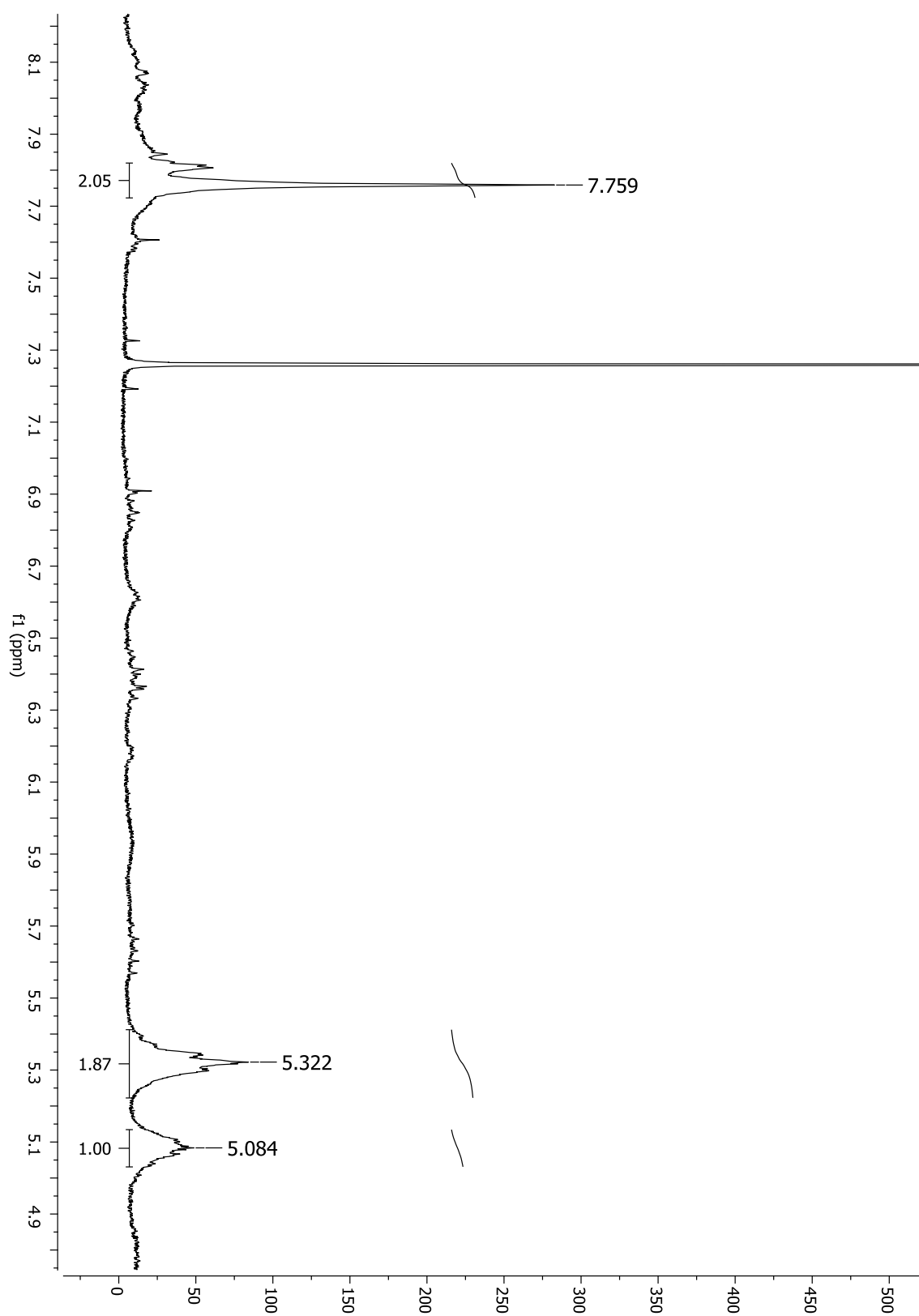
Figura 23 - Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2**

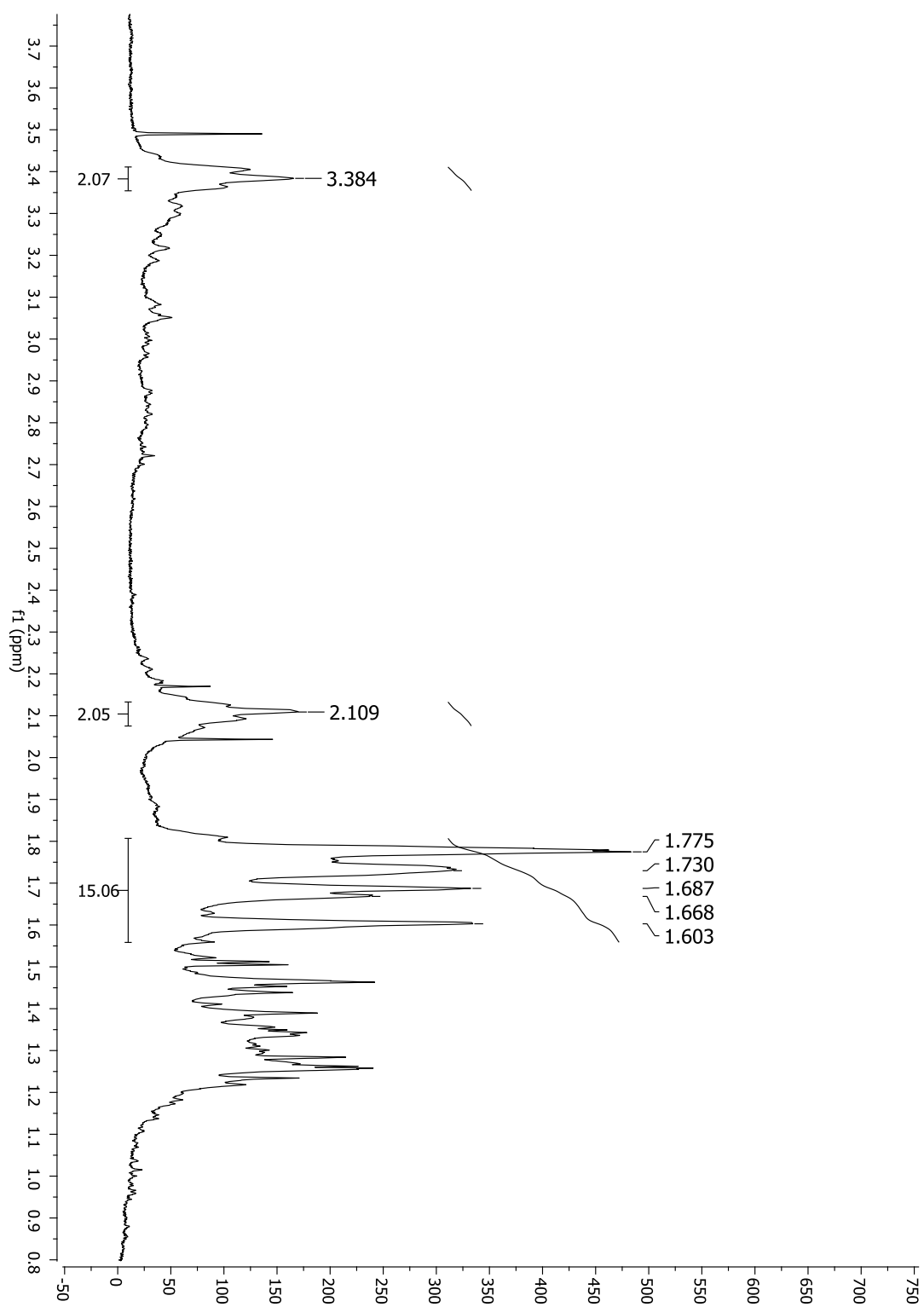
Figura 24 - Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2**

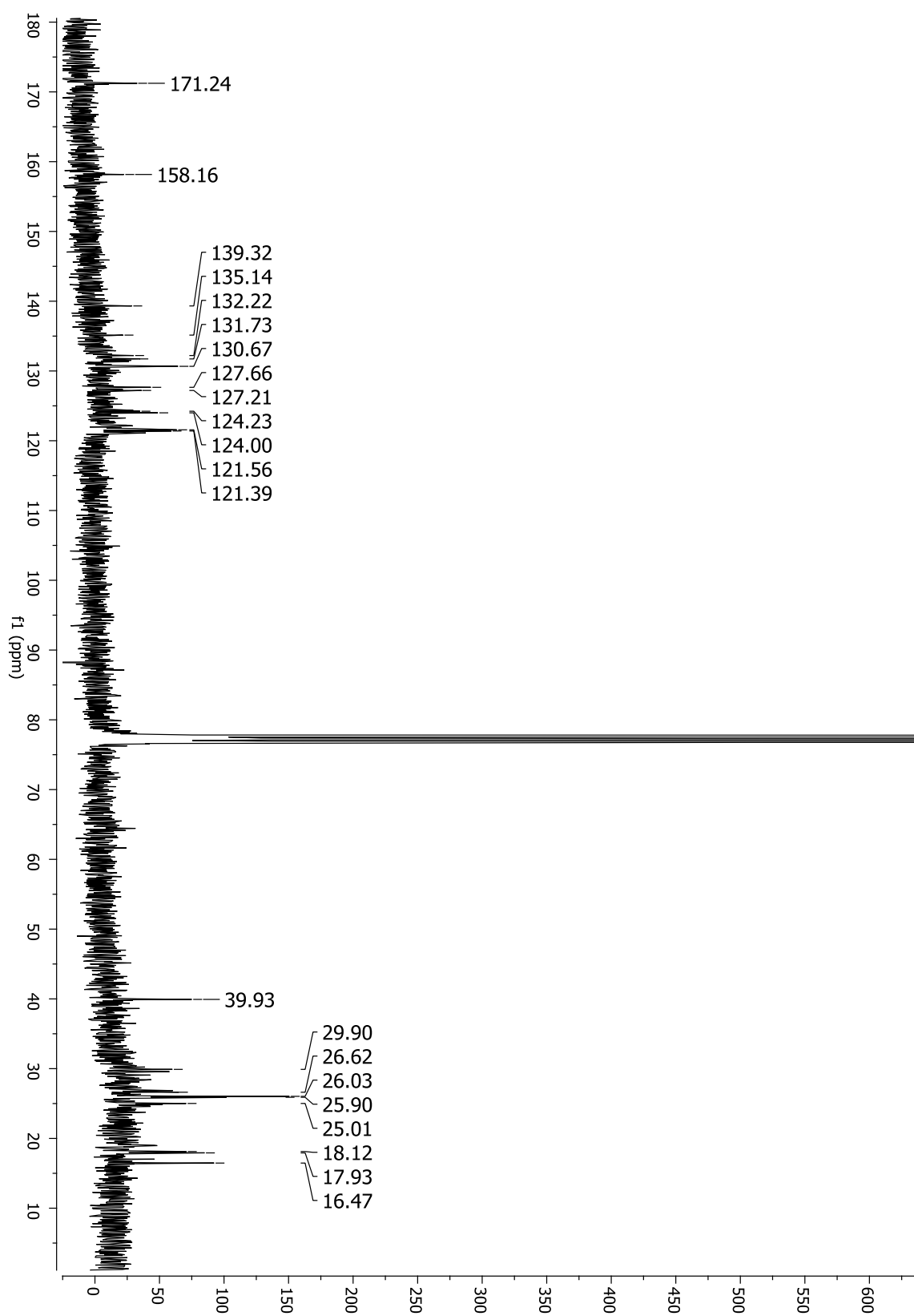
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2**

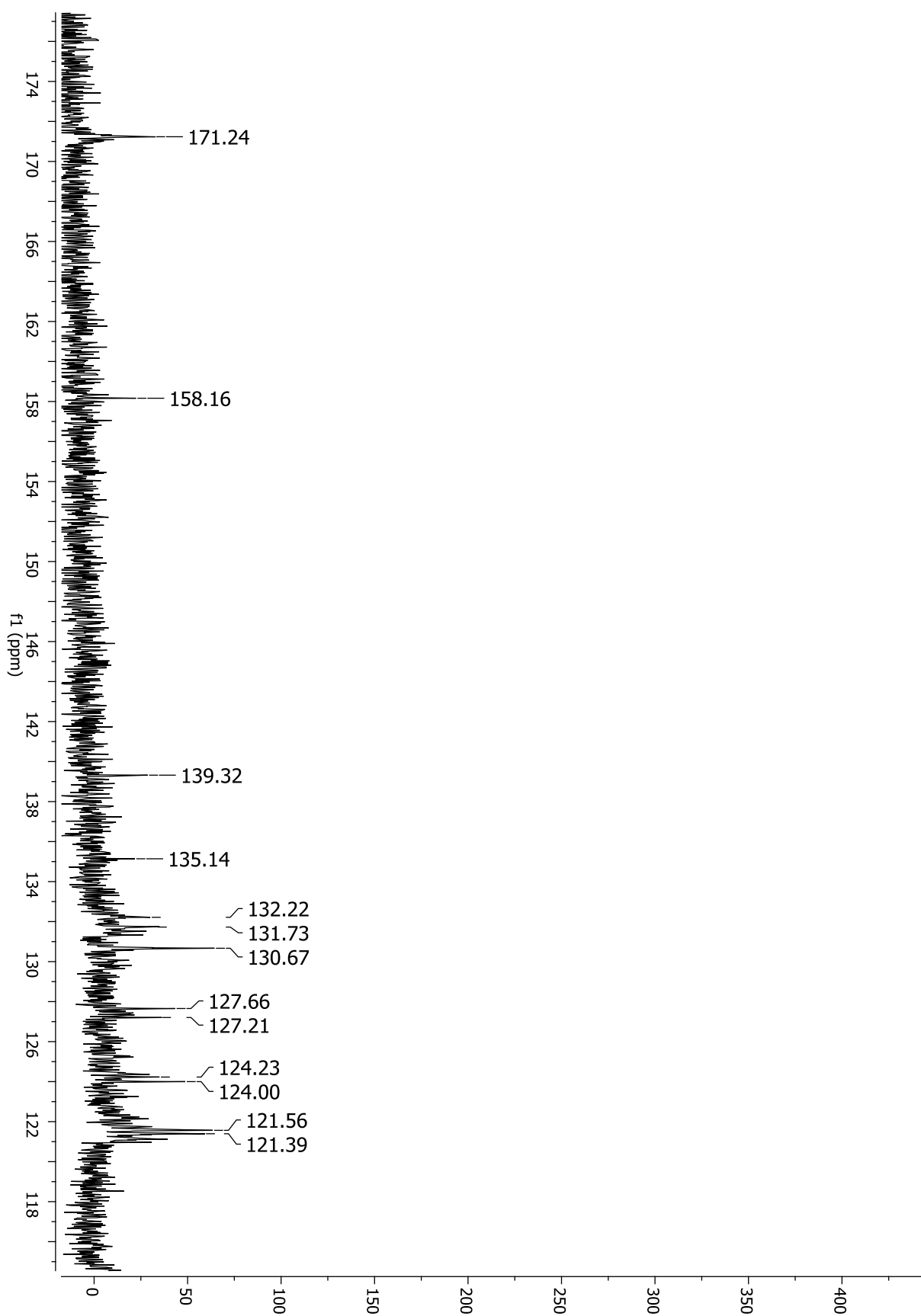
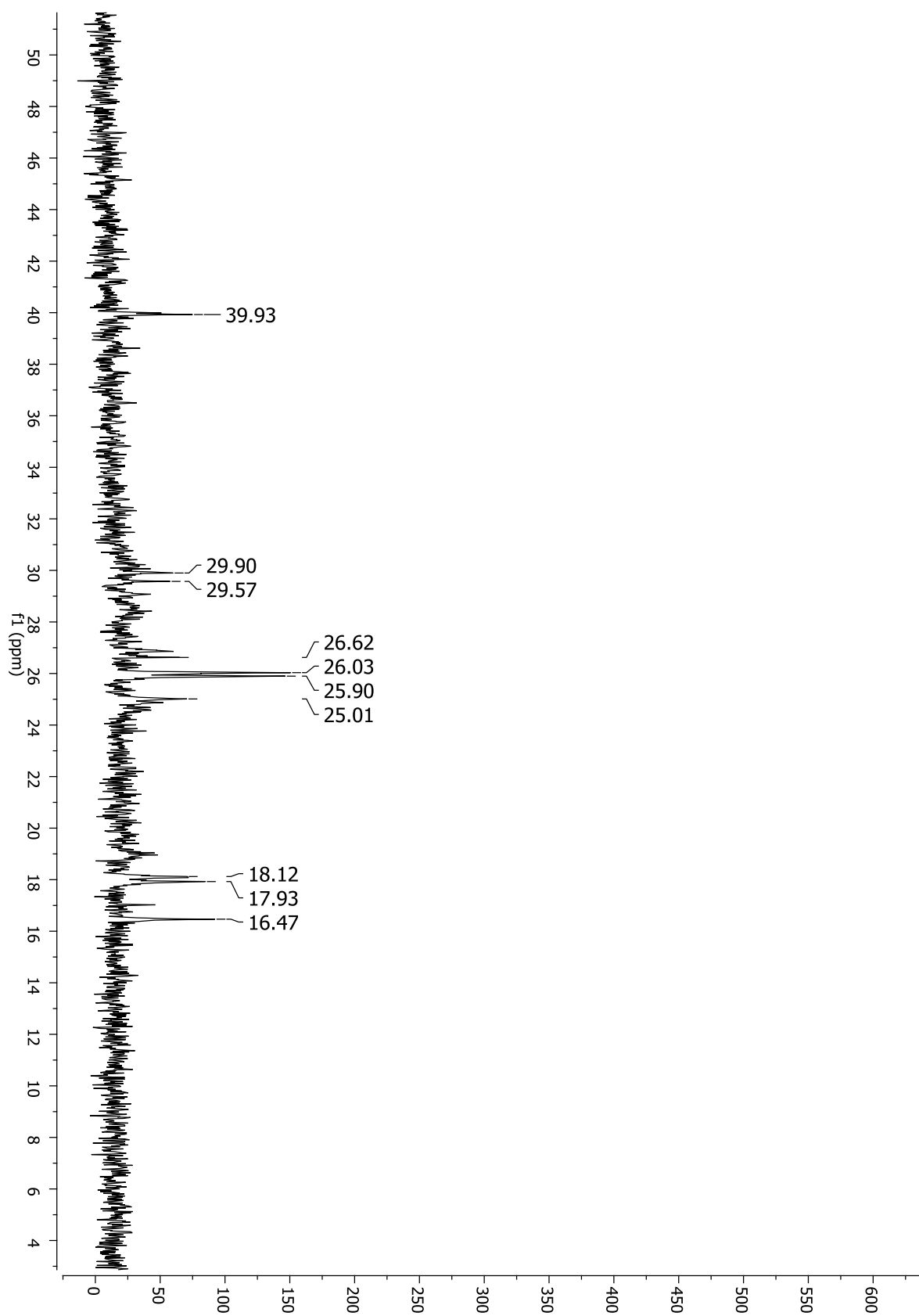
Figura 26 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2**

Figura 27 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2**

A identificação do metabólito **2**, nas frações do extrato AcOEt das folhas de *P. gaudichaudianum*, pode indicar que a biossíntese do ácido gaudichaudiânico segue a primeira rota da proposta de Lopes e colaboradores (2007) apresentada no item 1.4 (pg. 25), em que a prenilação do derivado geranilado do ácido *p*-hidroxibenzoico ocorre antes da ciclização e formação do anel cromeno. Uma forma de se comprovar essa hipótese é a realização de ensaios químicos e enzimáticos, que busquem compreender a sequência da biossíntese de **1**.

4.4 Obtenção de 2 a partir da fração hexânica do extrato etanólico dos frutos de *Myrsine cuneifolia*

O baixo rendimento na purificação de **2** de *P. gaudichaudianum* tornou necessária a busca por novas alternativas para a obtenção desse provável precursor em maior quantidade para a realização dos testes químicos e enzimáticos, e culminou no estabelecimento de uma parceria com o Prof. Antônio Carlos Severo Menezes, da Universidade de Goiás. O Prof. Menezes trabalha com a espécie *Myrsine cuneifolia*, que possui em seus frutos grande quantidade do ácido myrsinoico A, a substância de interesse (**2**).

Após a realização das etapas de purificação de **2**, descritas no item 3.7 (pg. 37), a fração obtida foi analisada por ressonância magnética nuclear de ^1H (Figuras 28-30) e de ^{13}C (Figuras 31-33), e apresentou sinais semelhantes aos encontrados na literatura para o ácido myrsinóico (DONG et al., 1999) e aos dados descritos no item 4.3.

Na região mais desblindada do espectro de RMN de ^1H é possível observar a presença de um simpleto em δ 7,78 referente aos dois hidrogênios do anel aromático, H-2 e H-6. Em δ 5,33 e 5,10 encontram-se dois tripletos aparentes referentes aos hidrogênios H-2' e H-2'', e H-6', respectivamente. Por sua vez, os hidrogênios H-1' e H-1'' se apresentam no espectro como duplos dupletos coalescido em δ 3,40. Na região mais blindada do espectro é possível observar os sinais das metilas presentes nas cadeias laterais da molécula, como o simpleto em δ 2,12 que se refere aos hidrogênios H-4' e H-5'; o simpleto em δ 1,79 referente aos hidrogênios H-9', H-4'' e H-5''; além do sinal em δ 1,62 que corresponde ao hidrogênio H-10'.

No espectro de RMN de ^{13}C destaca-se a presença dos sinais característicos da carboxila, C-7, em δ 171,7 e do carbono aromático ligado ao grupo $-\text{OH}$, C-4, em δ 157,8. O núcleo aromático foi confirmado pela presença dos sinais δ 130,2; 131,8; 121,1; 123,5; 127,2 referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-5 e C-6. Já as unidades isoprênicas são caracterizadas pelos sinais δ 138,9; 134,7 referentes aos carbonos olefínicos quaternários C-3' e C-3''; e C-7', os sinais em δ 126,7; 120,8 e 120,9 atribuídos aos carbonos olefínicos terciários C-6', C-2' e C-2'', além dos sinais em δ 39,5; 29,1; 29,5 e 26,1 referentes aos carbonos metilênicos C-4', C-1', C-1'' e C-5', e por fim os sinais δ 25,6; 25,5; 17,7; 17,5; 16,0 atribuídos aos carbonos metílicos C-4'', C-8', C-5'', C-9' e C-10'. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **2** em CDCl_3

Posição	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ δ (ppm)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ δ (ppm), multipl., J (Hz)
1	130,2	-
2	131,8	7,78 (s, 2H)
3	121,1	-
4	157,8	-
5	123,5	-
6	127,2	7,78 (s, 2H)
7	171,7	-
1'	29,1	3,40 (ddc, 6,0, 4H)
2'	120,8	5,33 (t*, 7,5, 2H)
3'	138,9	
4'	39,5	2,12 (s, 4H)
5'	26,1	2,12 (s, 4H)
6'	126,7	5,10 (t*, 1H)
7'	134,7	
8'	25,5	1,70 (s, 3H)
9'	17,5	1,79 (s, 9H)
10'	16,0	1,62 (s, 3H)
1''	29,5	3,40 (t, 6,0,4H)
2''	120,9	
3''	138,9	
4''	25,6	1,79 (s, 9H)
5''	17,7	1,79 (s, 9H)

^a75 MHz; ^b300 MHz

Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2** aislado a partir de *M. cuneifolia*

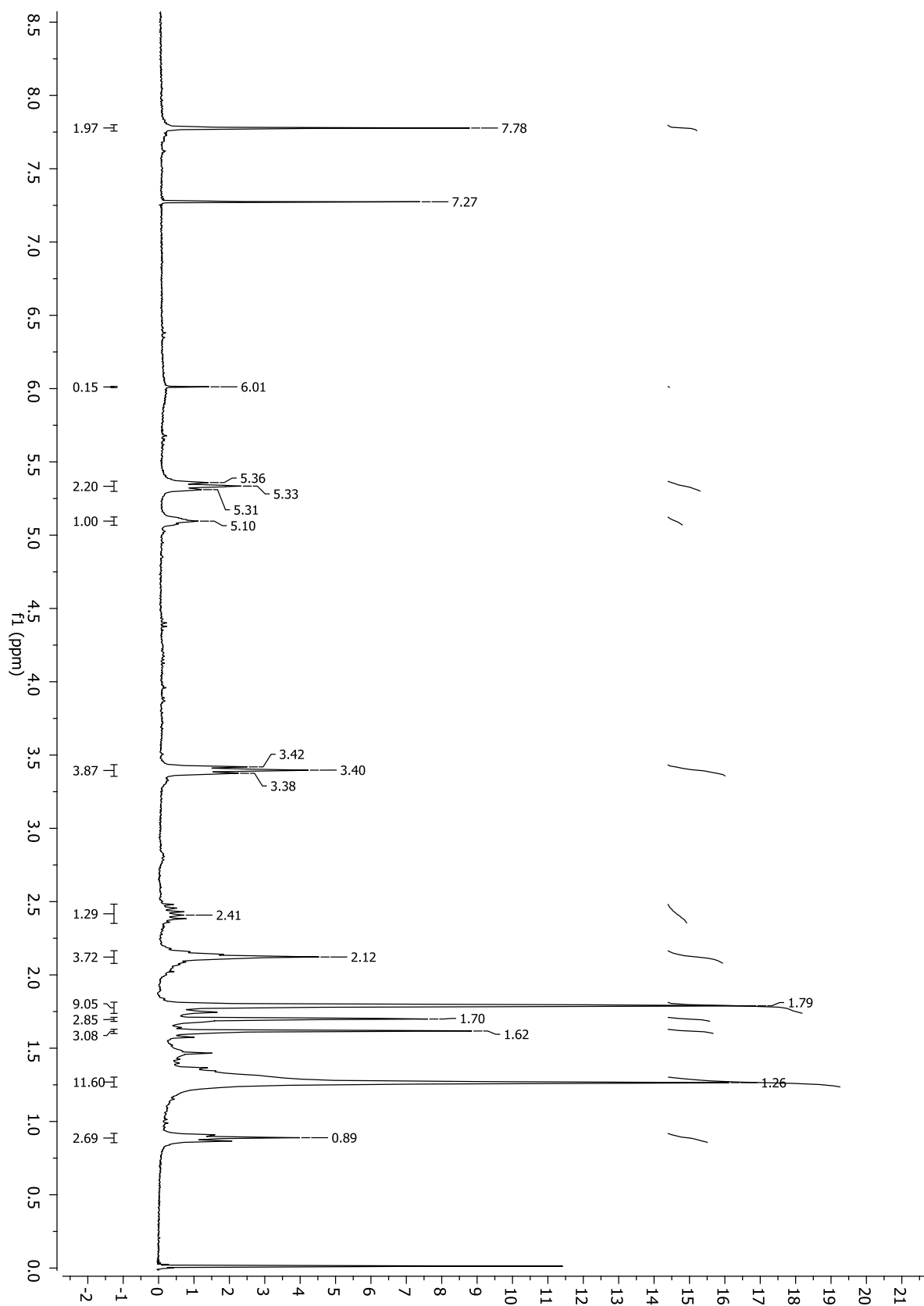


Figura 29 - Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2** isolado a partir de *M. cuneifolia*

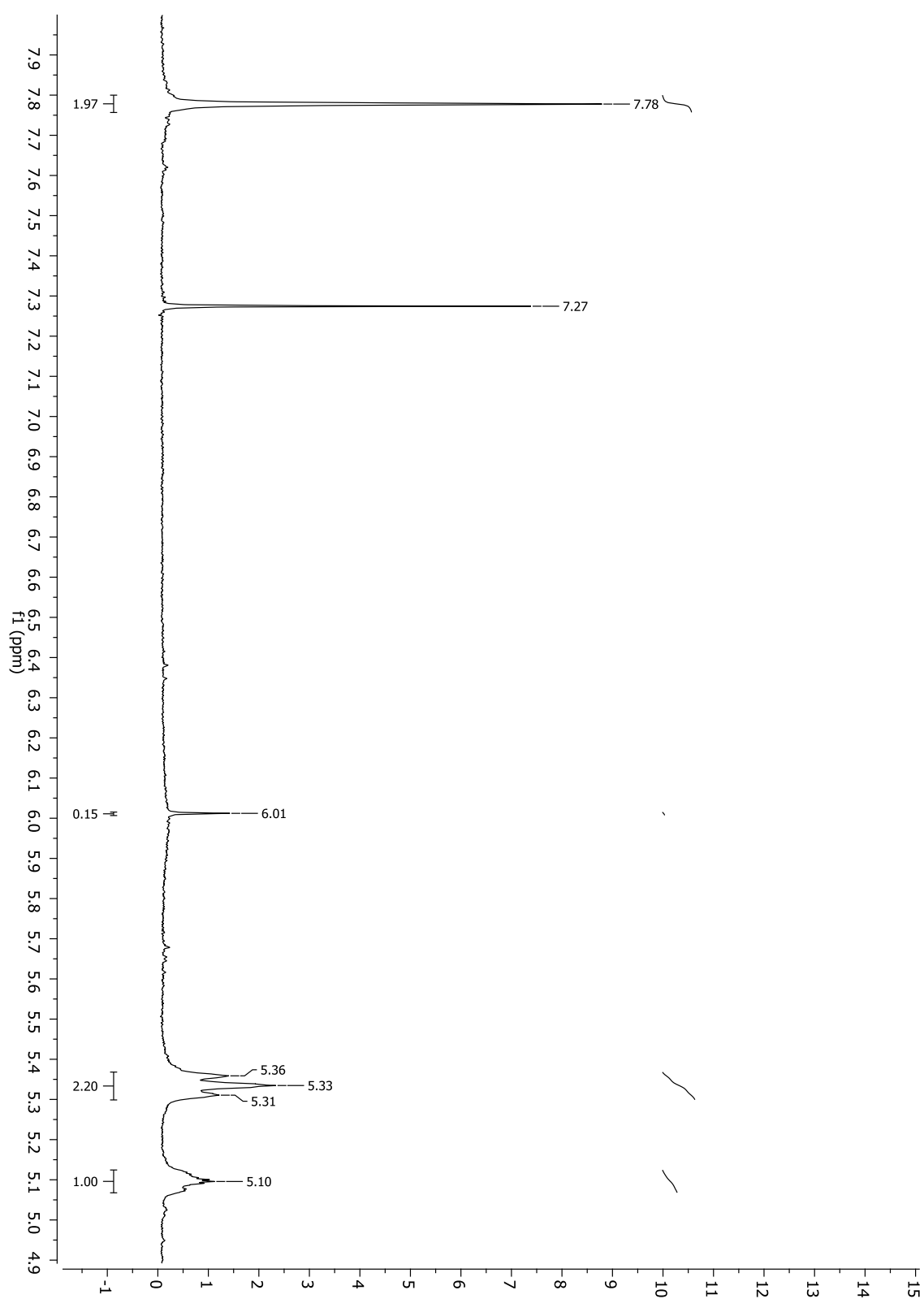


Figura 30 - Ampliação do espectro de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **2** isolado de *M. cuneifolia*

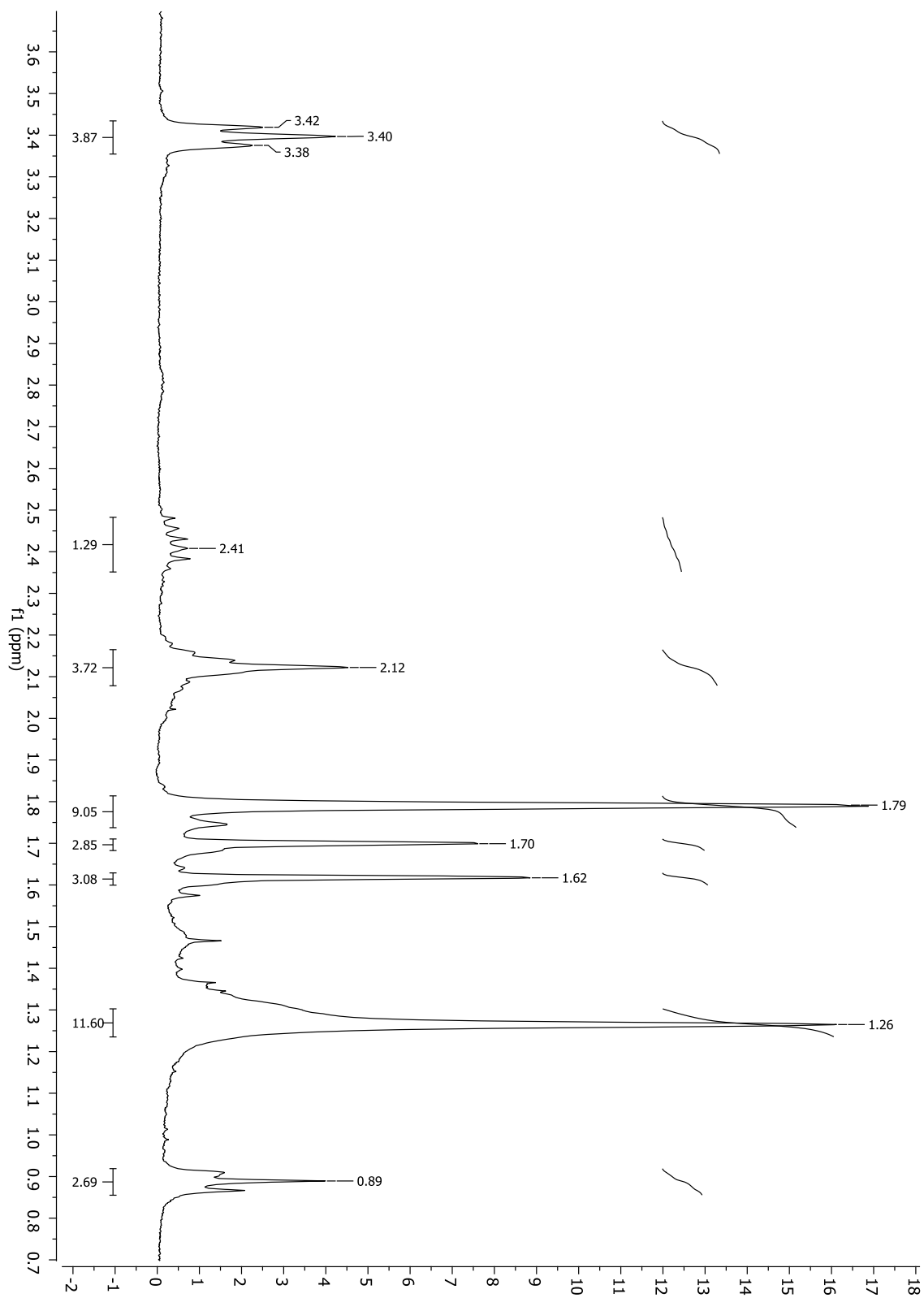


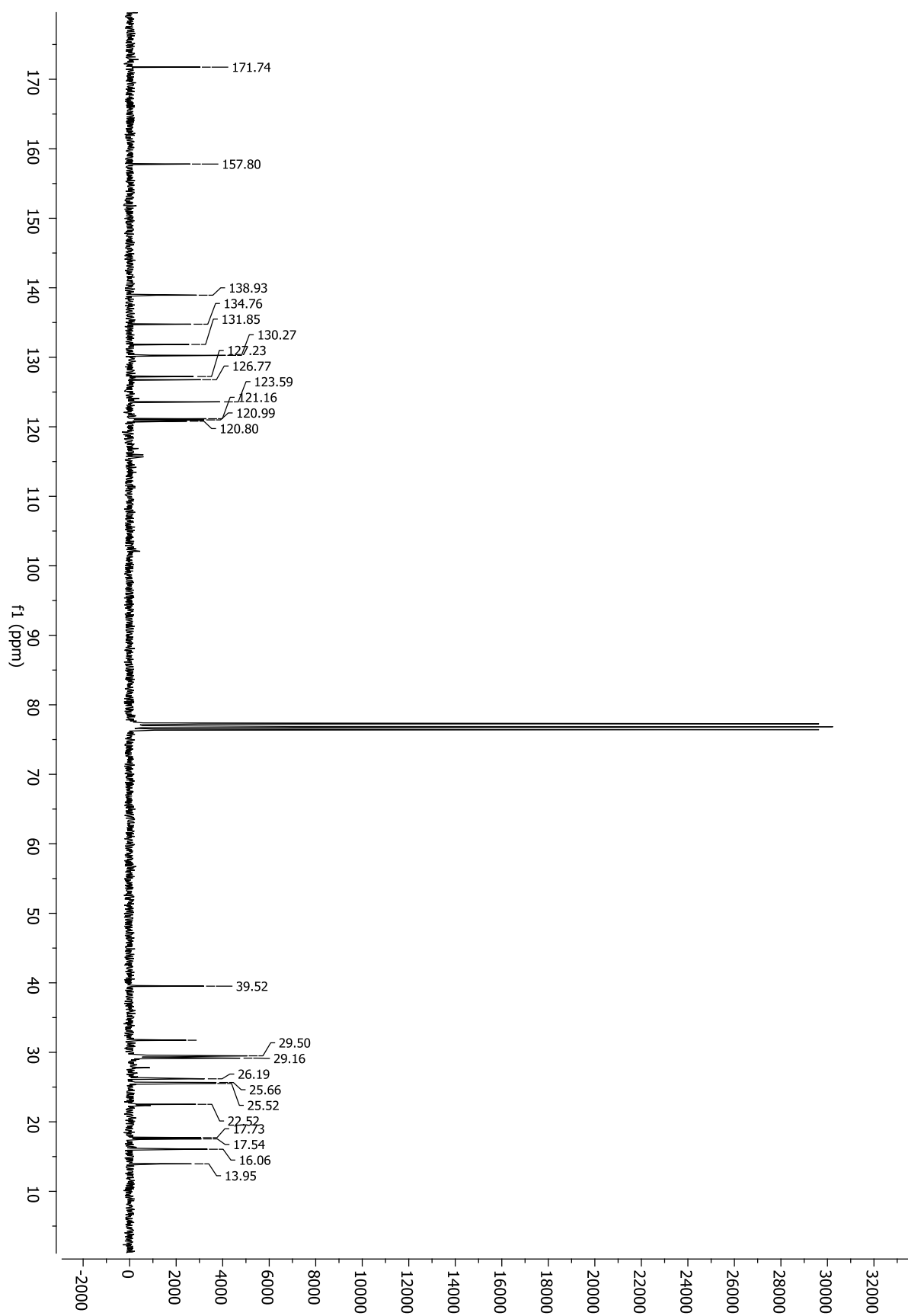
Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2** isolado de *M. cuneifolia*

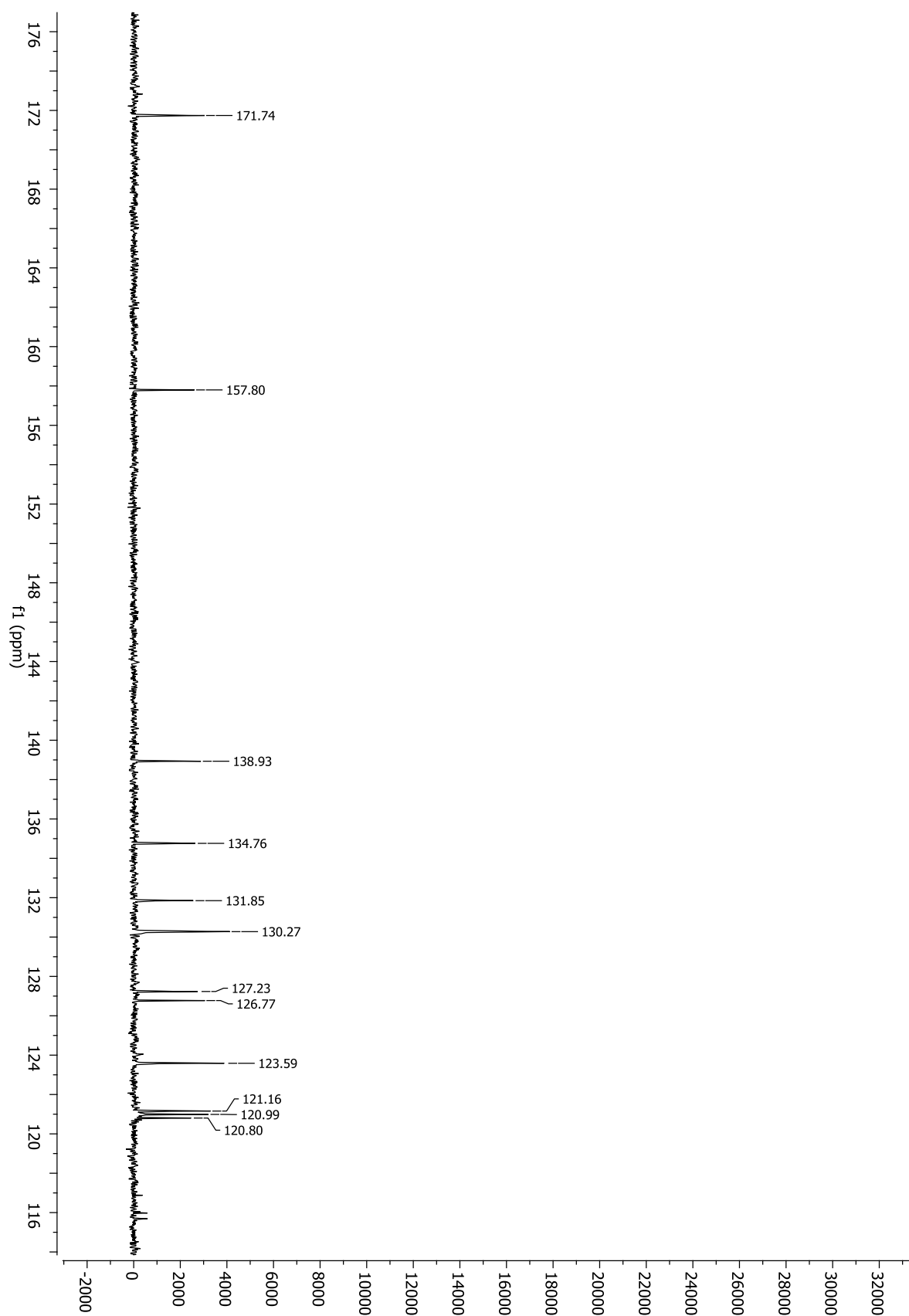
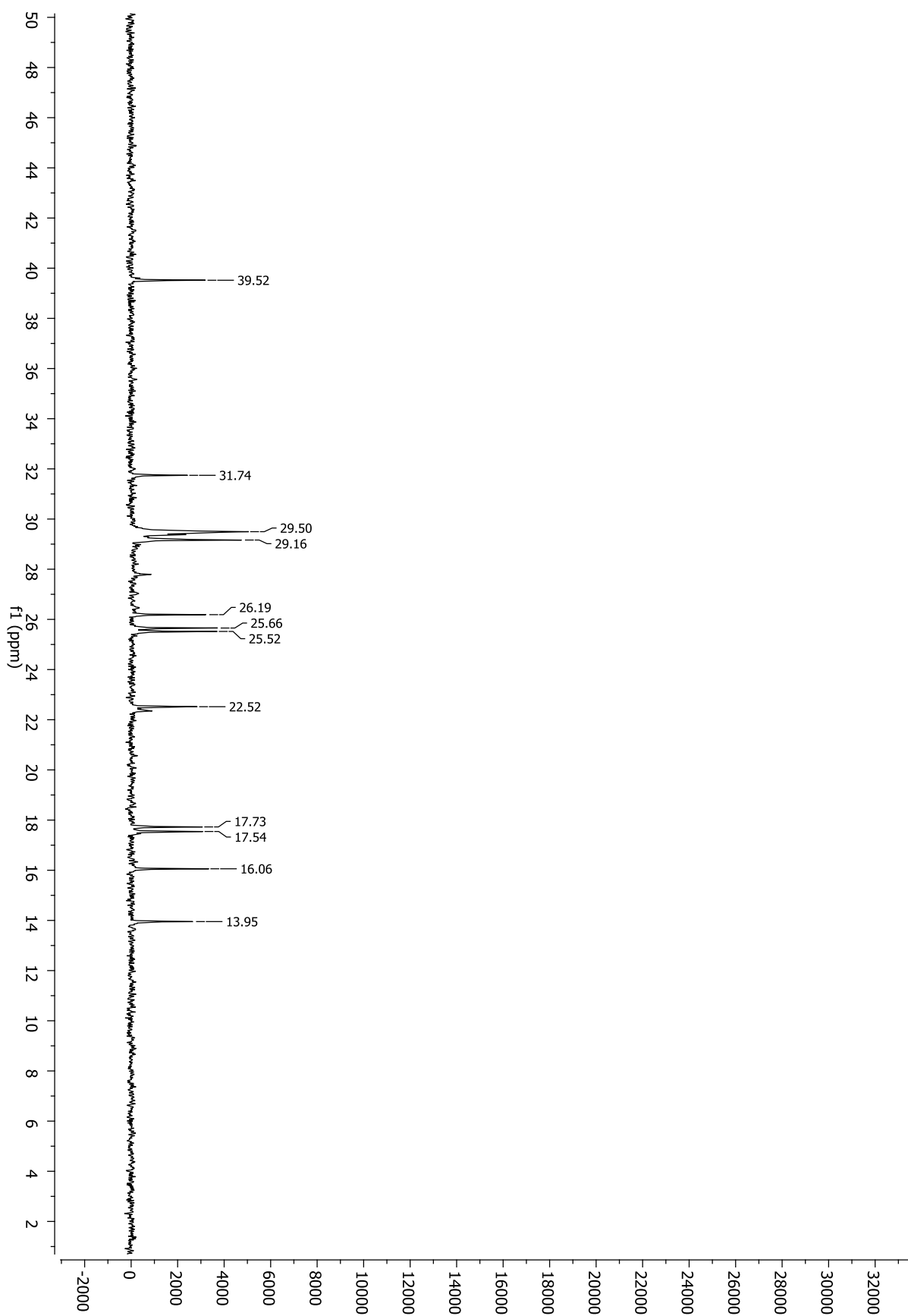
Figura 32 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2**

Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **2** isolado de *M. cuneifolia*



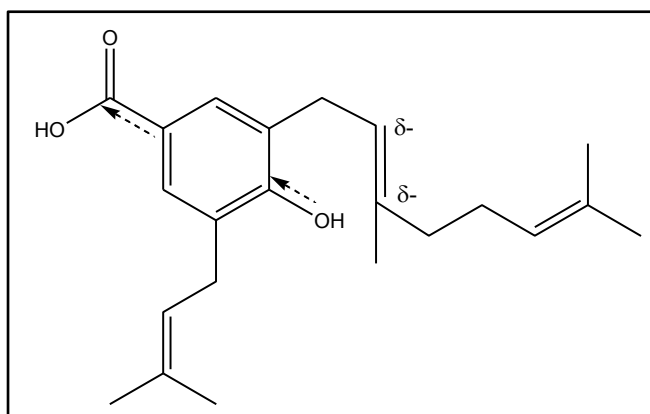
No processo de purificação foram obtidos 119 mg de **2** que foram utilizados para a realização dos testes químicos e enzimáticos.

4.5 Avaliação da ciclização por catálise química

Reações de ciclização ou fechamento de anéis heterocíclicos são comumente encontradas na literatura. Isso ocorre pois o heteroátomo pode facilmente ser usado como nucleófilo em uma reação de substituição intramolecular (CLAYDEN et al., 2012). Porém, para que esse tipo de reação aconteça é necessário o cumprimento de alguns pré-requisitos, tais como, a presença de um bom nucleófilo e um bom grupo abandonador.

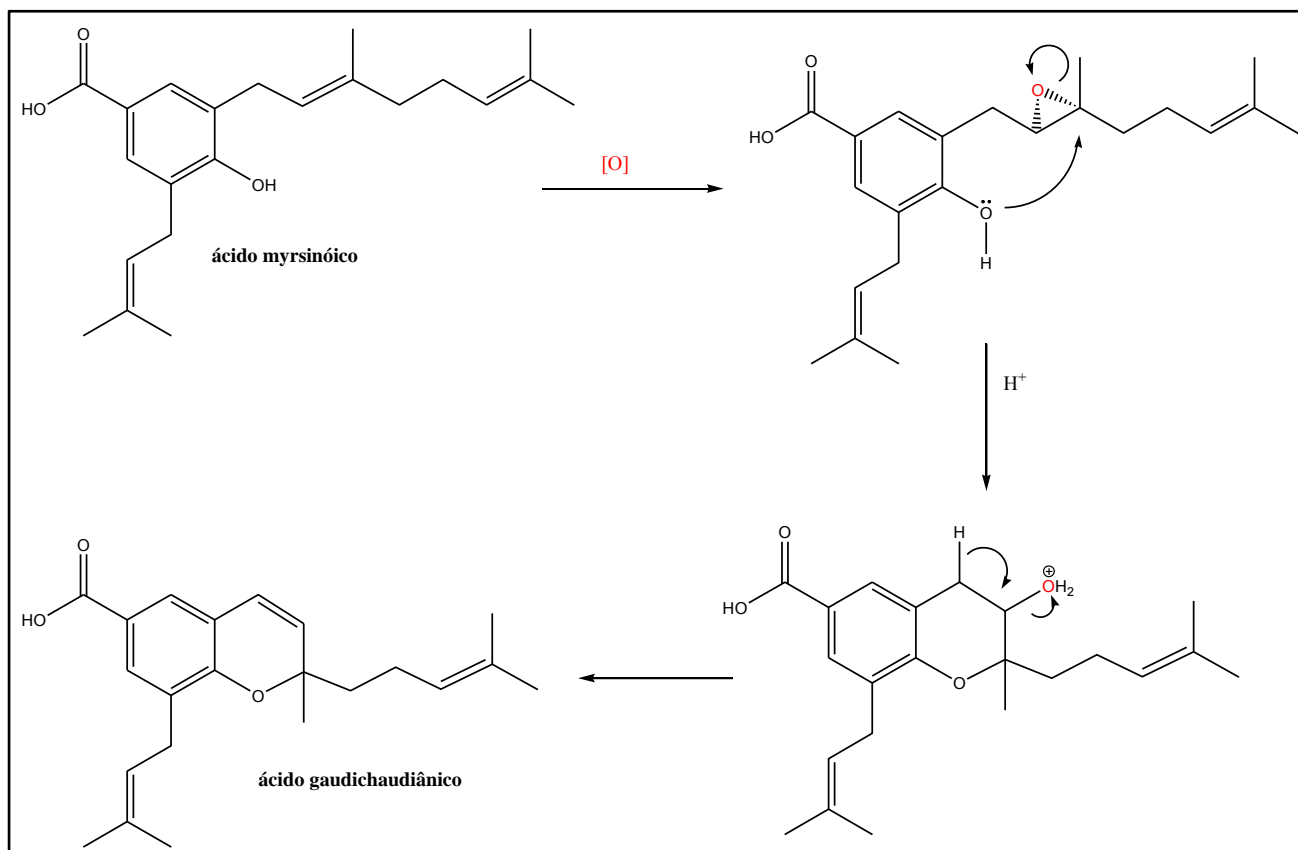
Nesse contexto, o ácido myrsinoico, eleito o precursor do ácido gaudichaudiânico no presente estudo, possui em sua estrutura um oxigênio (posição C-4) que poderia atuar como nucleófilo. Entretanto, a ressonância do anel aromático e a presença de um grupo retirador de elétrons diminuem a densidade eletrônica do oxigênio, enfraquecendo seu poder nucleofílico. Além disso, os carbonos C-2' e C-3', os mais propensos a sofrerem o ataque, não possuem caráter eletrofílico suficiente pois a dupla ligação aumenta a densidade eletrônica sobre eles, ou seja, nesse caso a reação de ciclização não pode ocorrer sem o auxílio de algum agente externo que modifique ao menos uma dessas características descritas acima. Na Figura 34, está representado o ácido myrsinóico e a densidade eletrônica em seus grupos substituintes.

Figura 34 – Representação da densidade eletrônica do ácido myrsinóico.



Uma das propostas é a oxidação da ligação dupla entre os carbonos C-2' e C-3' com consequente formação de epóxido. Dessa forma os carbonos envolvidos tornam-se mais eletrofílicos e disponíveis para a reação. Na figura 35 está descrita a proposta de ciclização por catálise química do anel cromeno.

Figura 35 – Proposta de ciclização química do anel cromeno.



Como nos processos de isolamento e purificação de **1** não foram utilizadas condições que favoreceriam a formação de epóxidos, torna-se necessário verificar a possibilidade da ciclização química do ácido myrsinóico em outras condições. Para isso, foram testados dois fatores que poderiam influenciar a ocorrência dessa reação. São eles: meio ácido e temperatura. Abaixo estão os resultados dos experimentos (Figura 36 – 38) realizados de acordo com a descrição do item 3.8 (pg. 37).

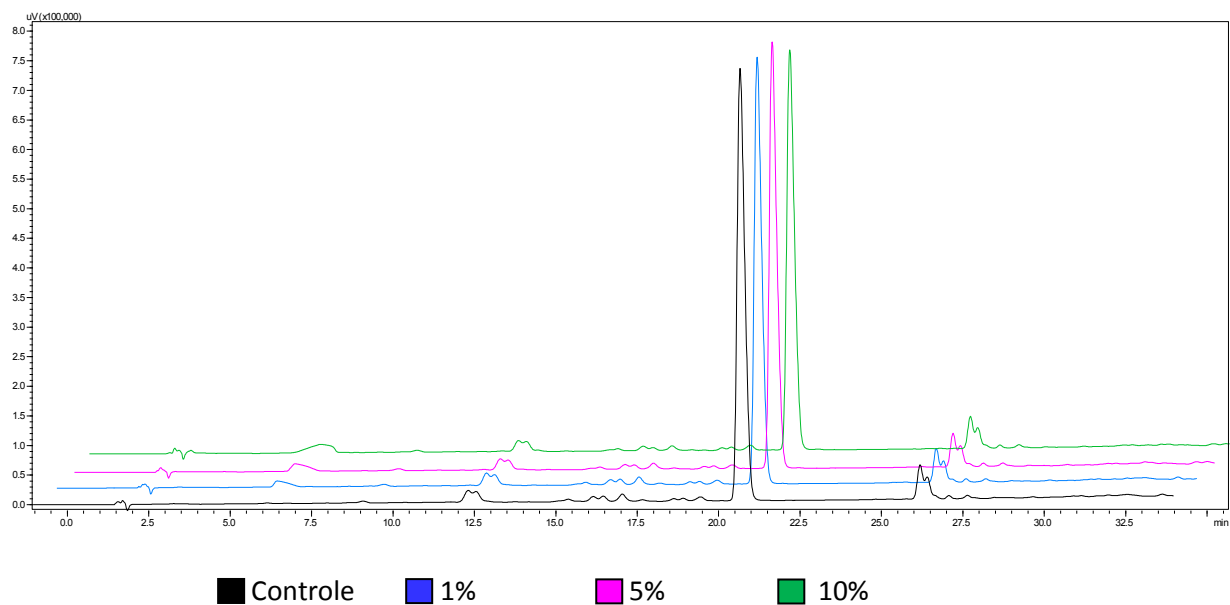
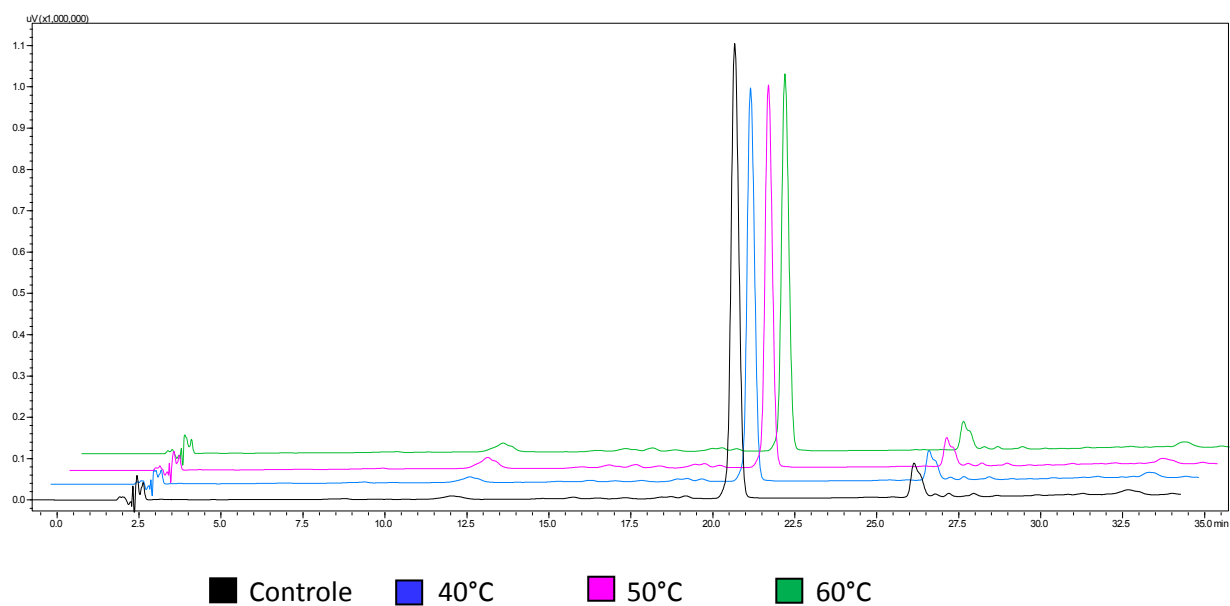
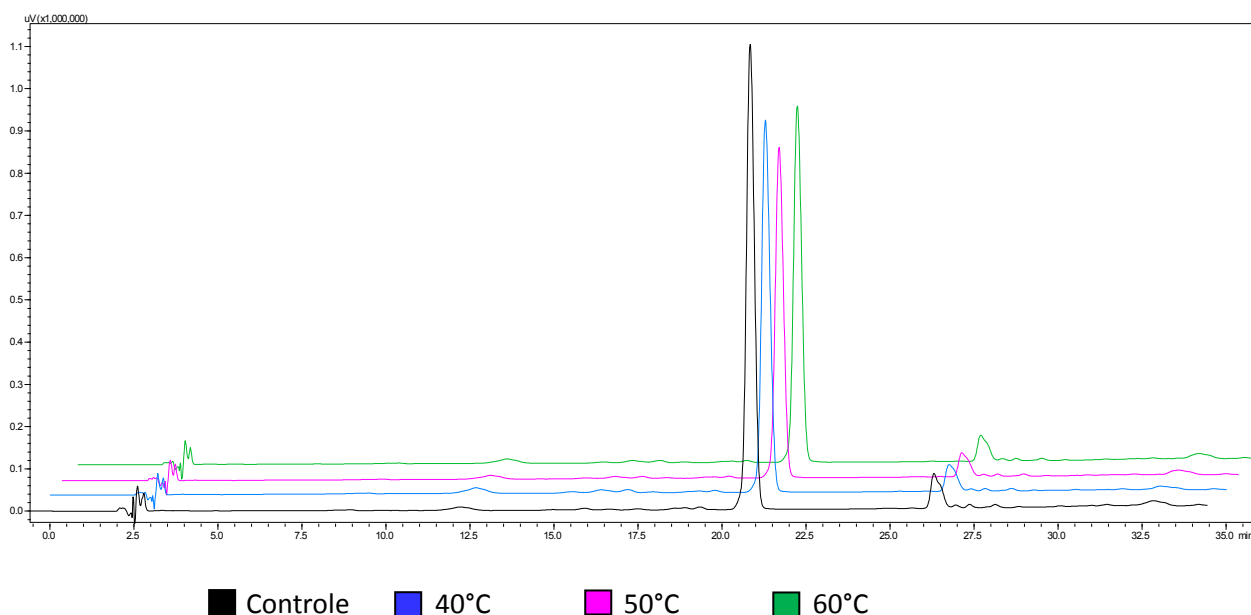
Figura 36 – Cromatogramas da avaliação do precursor 2 em Meio Ácido**Figura 37** – Cromatogramas da avaliação do precursor 2 em diferentes temperaturas (Solvente AcOEt)

Figura 38 – Cromatogramas da avaliação do precursor **2** em diferentes temperaturas (Solvente EtOH)



Pela observação dos cromatogramas pode-se inferir que não houve a conversão do ácido myrsinoico em ácido gaudichaudiânico ou qualquer degradação expressiva da substância testada em nenhuma das condições de análise. Os perfis cromatográficos de todos os testes são idênticos havendo, apenas, uma pequena diferença no início dos cromatogramas do teste em meio ácido (Figura 36), em aproximadamente 6,5 min. Entretanto o aparecimento de picos nessa região mais polar do cromatograma não pode ser associado à substância **1**, devido seu caráter mais apolar. Logo, de acordo com os resultados obtidos para a avaliação da ciclização por catálise química pode-se afirmar que a substância **2** não é convertida quimicamente em **1** nas condições testadas.

Dessa forma, a outra proposta de formação do ácido gaudichaudiânico, por ciclização enzimática, foi investigada nesse trabalho.

4.6 Perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional

Na busca pela compreensão da etapa de ciclização que ocorre durante a biossíntese do ácido gaudichaudiânico, outro passo importante foi determinar a presença da enzima responsável por essa etapa, considerando a hipótese de ciclização enzimática. Para isso, realizou-se o perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional do extrato das folhas de *P. gaudichaudianum*, seguindo

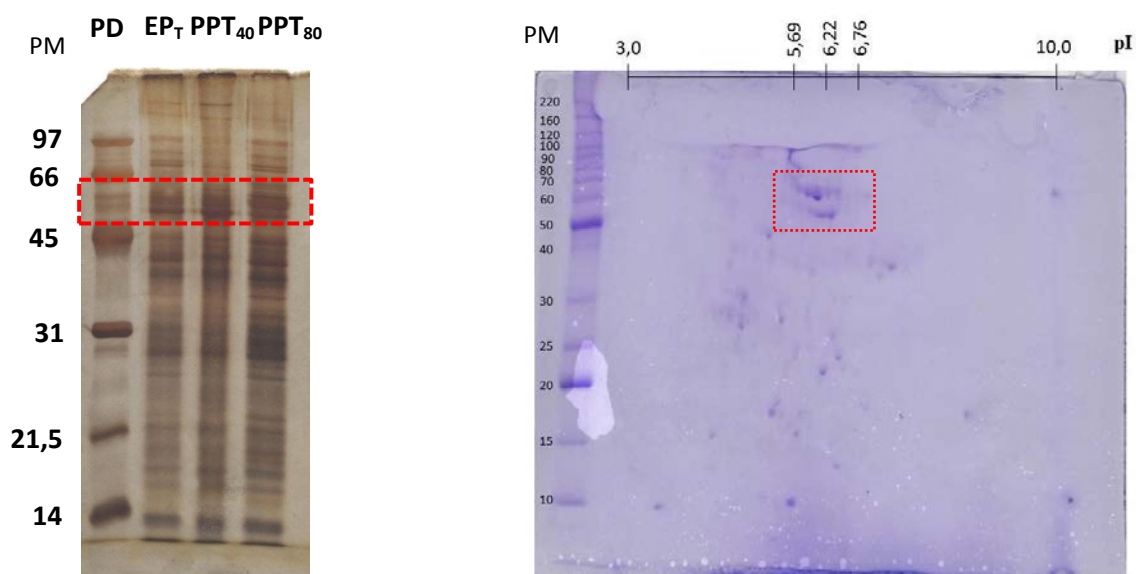
o protocolo proposto por López e colaboradores (2010). Os procedimentos realizados estão descritos no item 3.9 (pg. 38) deste trabalho e a análise do extrato e das frações estão apresentadas na Figura 39.

Para comparação selecionou-se a enzima tocoferol ciclase (TC) devido a mesma apresentar semelhança no mecanismo de ação proposto na biossíntese do ácido gaudichaudiânico. De acordo com Kumar e colaboradores (2005) o 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol (MPBQ) e o 2,3-dimetil-5-fetil-1,4-benzoquinol (DMPBQ) são convertidos em δ -tocoferol e γ -tocoferol, respectivamente, pela ação da TC, que forma o anel cromano da estrutura dos tocoferóis. Na literatura há relatos de que essa enzima é encontrada em diferentes espécies vegetais, além de cianobactérias e algas. Na Tabela 7 estão descritas algumas espécies vegetais que possuem essa enzima e suas principais características como peso molecular, ponto isoelétrico e número de aminoácidos (informações retiradas do banco de dados Uniprot – www.uniprot.org.br).

Tabela 7 - Principais características da enzima tocoferol ciclase encontrada em diferentes espécies vegetais.

Espécie	PM (kDa)	pI	Nº de AA
<i>Oryza stiva</i>	52,2	6,81	470
<i>Arabidopsis thaliana</i>	54,7	5,95	488
<i>Zea mays</i>	52,6	6,12	474
<i>Triticum aestivum</i>	52,0	6,77	467
<i>Helianthus annuus</i>	53,9	6,68	483
<i>Eucalyptus gunni</i>	56,7	6,78	515

Figura 39 - Perfil proteico por eletroforese mono e bidimensional da espécie *Piper gaudichaudianum*



Por meio da eletroforese monodimensional constatou-se a presença de bandas proteicas na região descrita na literatura, 50-70 kDa (região destacada em vermelho), que também podem ser visualizadas na eletroforese bidimensional. Além disso, o ponto isoelétrico encontrado para as proteínas em destaque (pI 5-7) está de acordo com os dados expostos na Tabela 4. Essas informações reforçam os indícios da presença de uma ou mais ciclases nos extratos vegetais estudados.

Essa faixa de peso molecular (50-70 kDa) abrange também as prenilttransferases (56-58 kDa) que conhecidamente estão presentes em espécies de *Piper* (LOPES et al., 2008a; LÓPEZ et al., 2010), e podem ser atribuídas a um dos conjuntos de proteínas encontrados na mesma região de pI e PM. Uma forma de se confirmar a presença dessa enzima nos extratos de *P. gaudichaudianum* é por meio do ensaio enzimático.

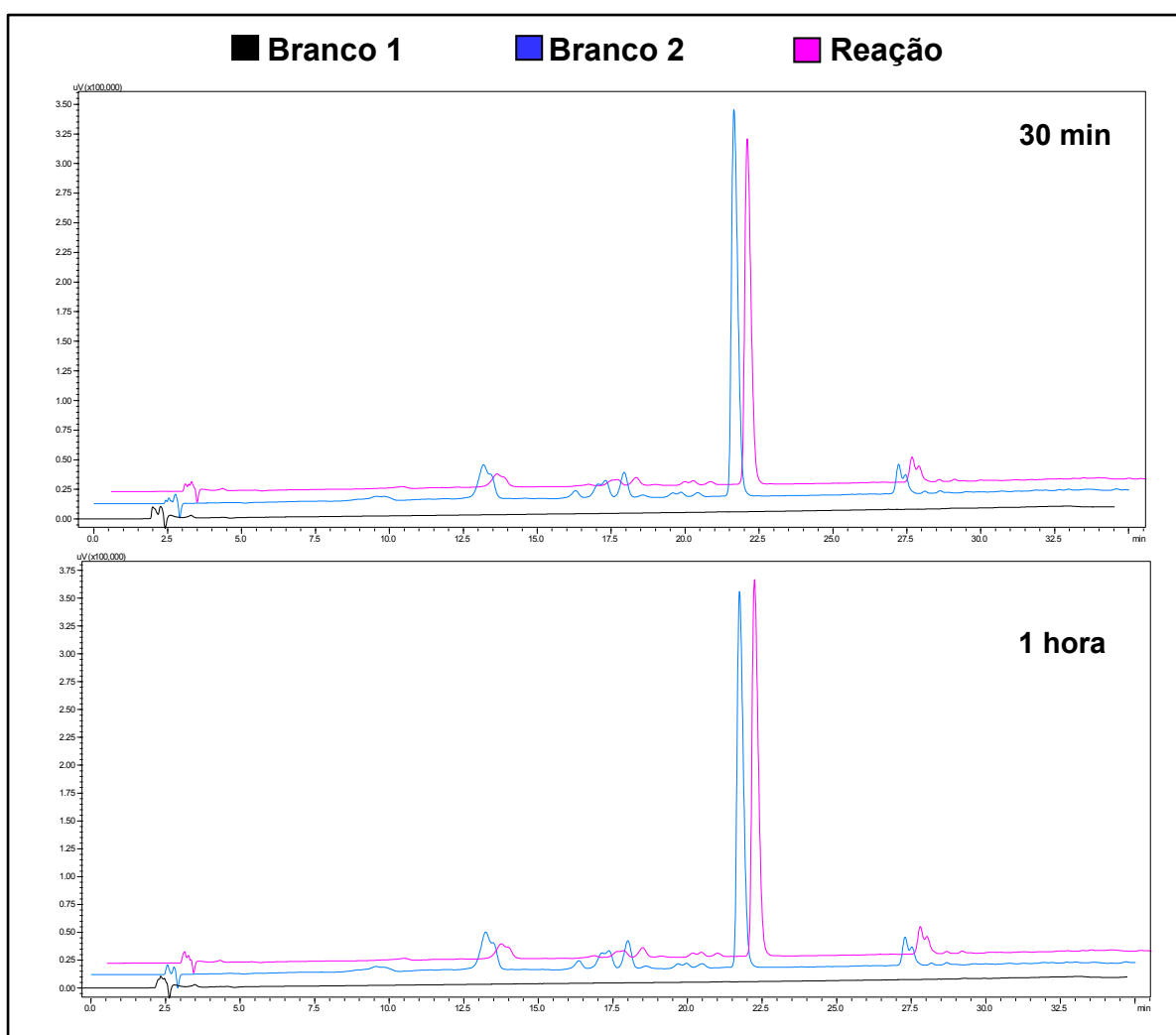
4.7 Ensaio enzimático utilizando a substância **2** como precursor do ácido gaudichaudiânico

O ensaio enzimático foi planejado baseando-se na literatura disponível que estabelece os ótimos reacionais para a enzima tocoferol ciclase (HOFFMANN LA ROCHE, 1992; KUMAR, et al., 2005). De acordo com a

literatura o pH ótimo dessa enzima é entre 7,0 e 8,0 e a temperatura ótima é entre 30 e 40°C. Com isso esse experimento foi realizado tendo como única variável o tempo de reação, em 0,5, 1, 12 e 24 horas.

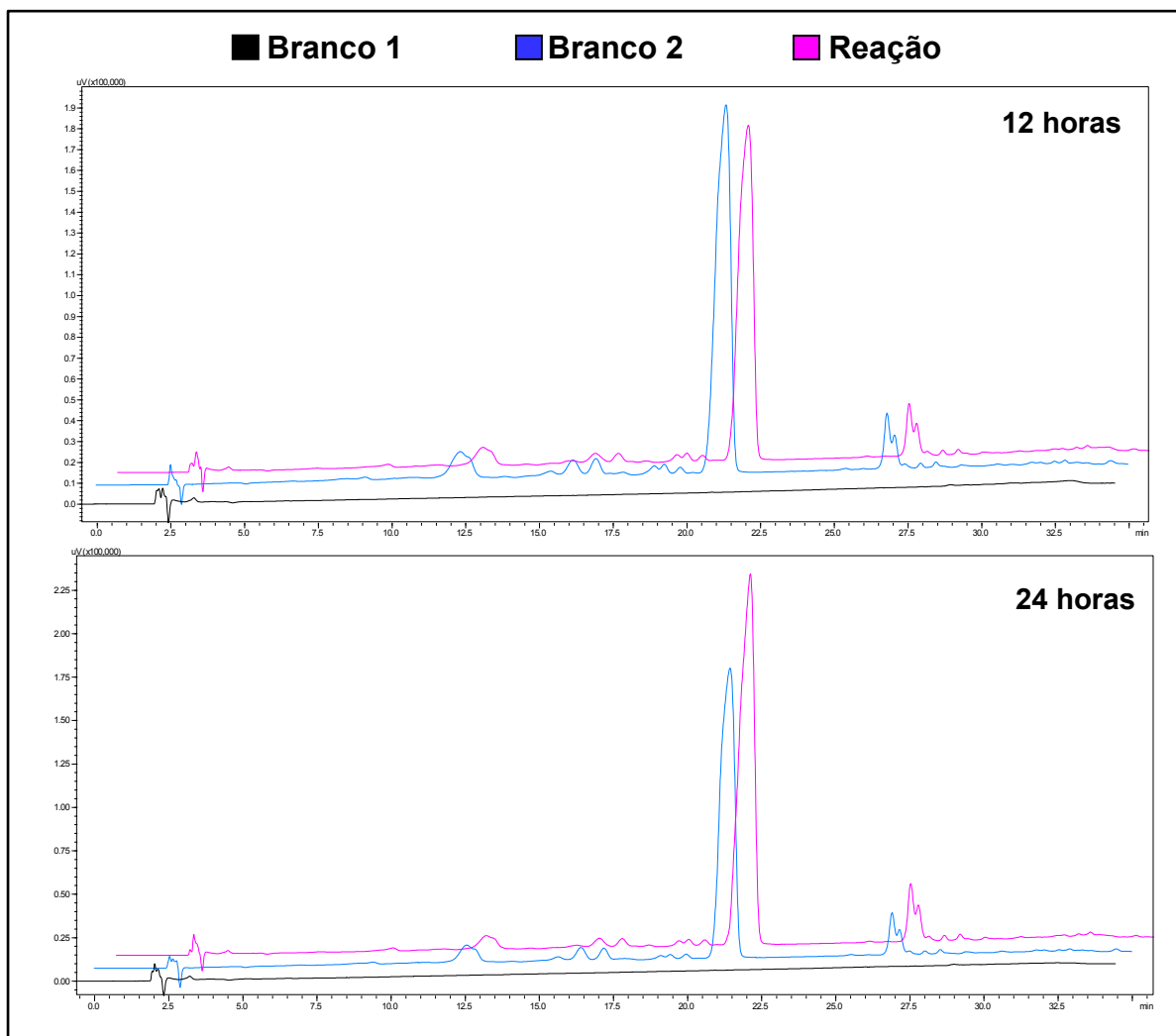
Primeiramente analisou-se o extrato de proteínas solúveis, preparado como descrito no item 3.10.1 (pg. 49) e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 40 e 41.

Figura 40 – Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático solúvel, avaliados nos tempos de 30 min e 1 hora.



(a) CLAE analítico, coluna Phenomenex Luna[®] C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), modo gradiente 70-100 % MeOH/H₂O em 30 min, 5 min a 100 % MeOH, V_i=40 μ L, vazão de 1 mL/min. Detecção no ultravioleta a 254 nm.

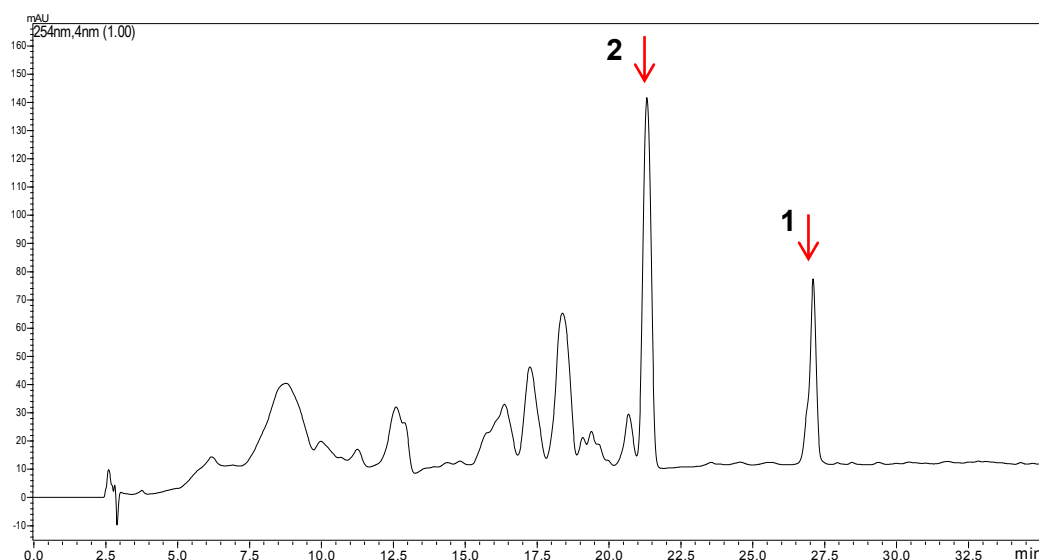
Figura 41 – Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático solúvel, avaliados nos tempos de 12 e 24 horas.



Condições cromatográficas (a)

Para fim de comparação realizou-se em um dos brancos 2 a inserção do padrão do ácido gaudichaudiânico na mesma concentração do precursor, afim de avaliar o efeito da matriz no perfil cromatográfico do produto desejado. O cromatograma obtido está apresentado abaixo (Figura 40):

Figura 42 – Cromatograma do Branco 2 com ácido gaudichaudiânico



Condições cromatográficas (a)

Por sua análise observa-se que o pico referente a substância **1** possui t_R muito próximo aos últimos picos, mais apolares, da amostra do precursor. Este fato pode prejudicar a observação da formação de produto pela enzima e ocasionar uma análise errônea dos dados. Porém a proporção entre o pico do precursor ($t_R \sim 21$ min) e do pico do possível produto ($t_R \sim 27,1$ min) se manteve a mesma em todos os cromatogramas, o que indica que não houve a transformação de **2** em **1**, e que os picos em aproximadamente $t_R = 27,1$ min é referente a alguma outra substância contida na fração enriquecida do precursor.

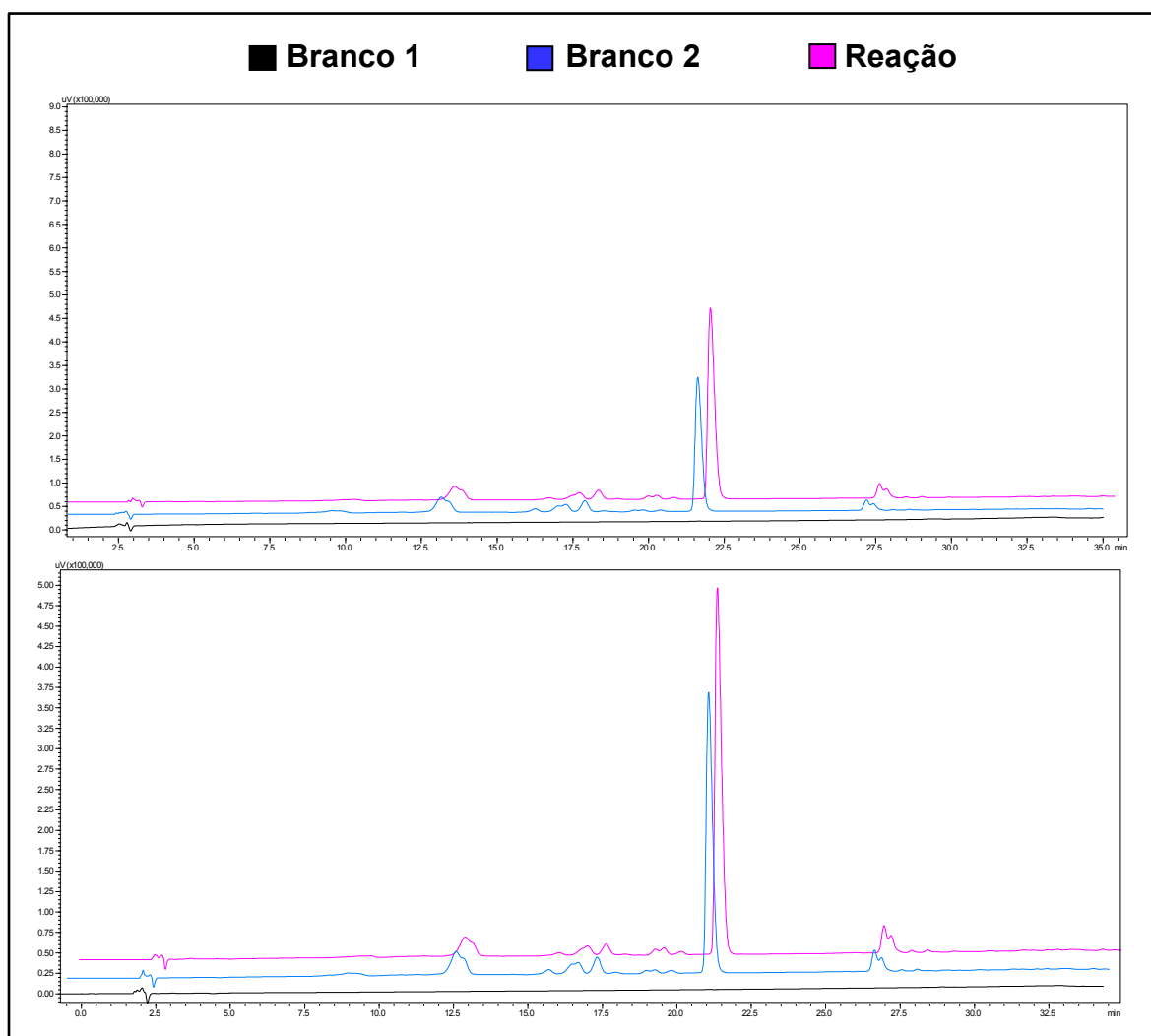
Além disso, todos os cromatogramas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico o que demonstra que o tempo de reação não foi uma variável determinante para que a reação ocorresse. É possível observar, também, que o Branco 2 possui o mesmo perfil observado para a Reação, indicando que não houve formação de nenhuma nova substância que fosse detectada pela cromatografia de alta eficiência. Exposto isso, é possível relatar que nas

condições testadas não foi observada a atividade de uma enzima que atuasse na ciclização do ácido myrsinoico.

Devido a não formação do produto nas reações utilizando o precursor e o extrato de proteínas solúveis considerou-se pertinente avaliar o extrato de proteínas microsossomais, pois há relatos na literatura de extração de enzimas ciclases nos plastídios e nos cloroplastos de espécies vegetais (KUMAR et al., 2005; TANG et al., 2011).

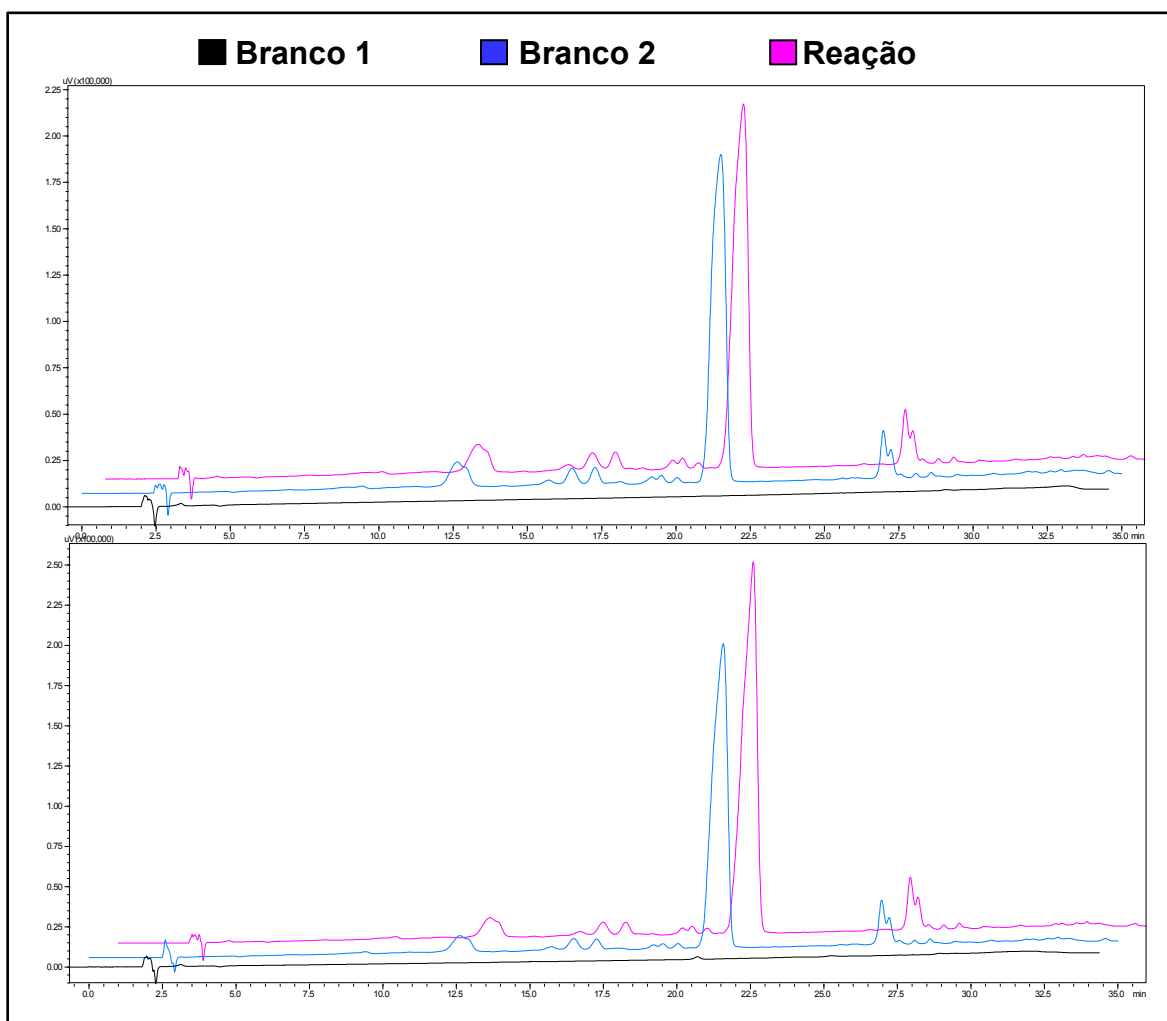
O extrato microsossomal foi realizado como descrito no item 3.10.2 e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 43 e 44.

Figura 43 – Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático microsossomal, avaliados nos tempos de 30 min e 1 hora.



Condições cromatográficas (a)

Figura 44 – Cromatogramas dos ensaios enzimáticos realizados com o extrato enzimático microsossomal, avaliados nos tempos de 12 e 24 horas.



Condições cromatográficas (a)

Assim como encontrado para o extrato solúvel, o extrato microsossomal não apresentou a formação do produto desejado. Os perfis cromatográficos foram os mesmos para todos os diferentes tempos e o cromatograma da reação foi semelhante ao do Branco 2. Dessa forma, pode-se afirmar que nas condições testadas não se observou a atividade de enzimas responsáveis pela ciclização de **2**.

Os resultados obtidos para os ensaios enzimáticos foram importantes e trazem a luz novas possibilidades quanto a possível atuação dos precursores e das enzimas envolvidas nesse processo. Como as ciclases, enzimas que estão envolvidas na formação de novos esqueletos carbônicos, são, em geral, de natureza específica é esperado que essa benzopirano ciclase, que catalisa a

formação do núcleo benzopirano de **1**, presente seletividade quanto ao reconhecimento do precursor, além de ser totalmente desconhecida. Dessa forma, é possível que os métodos de extração utilizados neste trabalho não tenham sido eficientes na extração dessa enzima, e a benzopirano ciclase não tenha sido extraída.

Outra hipótese que deve ser considerada está relacionada a escolha do precursor. É possível que haja uma outra sequência de biossíntese que inclua a etapa de oxidação da ligação dupla da unidade geranila do ácido myrsinoico. Ou seja, sugere-se que o ácido myrsinoico seja primeiramente oxidado, por uma oxidorreductase ou uma epoxidase, como ocorre na biossíntese dos ácidos graxos (DEWICK, 2009) ou mesmo por catálise química, formando a substância B da Figura 17, que seria o substrato da(s) enzima(s) ciclase(s) presentes na espécie de estudo. Com isso, novos protocolos devem ser propostos para favorecer a oxidação (epoxidação) prévia de **2** ou a extração efetiva das enzimas relacionadas a esta etapa de ciclização. Outro ponto relevante que deve ser considerado é que o precursor pode ser o derivado do ácido *p*-hidróxibenzóico monogeranilado no carbono C-3 (Figura 17 (C), pg. 66), que, após epoxidação, sofre ciclização e posterior prenilação.

4.8 Avaliação da atividade antifúngica de **1**

O ácido gaudichaudiânico possui importantes atividades biológicas já descritas, como a atividade tripanocida frente às formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (BATISTA JUNIOR et al., 2008), que demonstraram, também, uma possível atividade sinérgica para os enantiômeros de **1**, uma vez que a mistura 50:50 apresentou atividade mais pronunciada que cada um dos enantiômeros separadamente (BATISTA JUNIOR et al., 2011b). Esse fato desperta o interesse na investigação do sinergismo da mistura racêmica de **1** frente a outros microrganismos patogênicos.

Nesse sentido, optou-se por testar a atividade fungicida de **1** contra fungos patogênicos humanos, baseando-se na potencialidade antifúngica dos cromenos frente a fitopatógenos do gênero *Cladosporium* (BALDOQUI et al., 1999 e LAGO et al., 2004) e no fato de não existirem estudos frente a fungos patogênicos humanos. A descrição do experimento está apresentada no item

3.11 deste trabalho, sendo testado inicialmente apenas a mistura racêmica de **1**.

Em contraste ao que ocorre com os fungos fitopatogênicos, o cromeno **1** não apresentou atividade antifúngica promissora, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de 250 $\mu\text{g/mL}$, para a maioria cepas testadas, podendo assim, ser considerada inativa, uma vez que se distanciam muito dos valores obtidos com as substâncias de referência anfotericina B (AMB) e o itraconazol. Os resultados da mistura racêmica e dos controles positivos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade antifúngica (CIM/CFM - $\mu\text{g/mL}$) do composto **1**

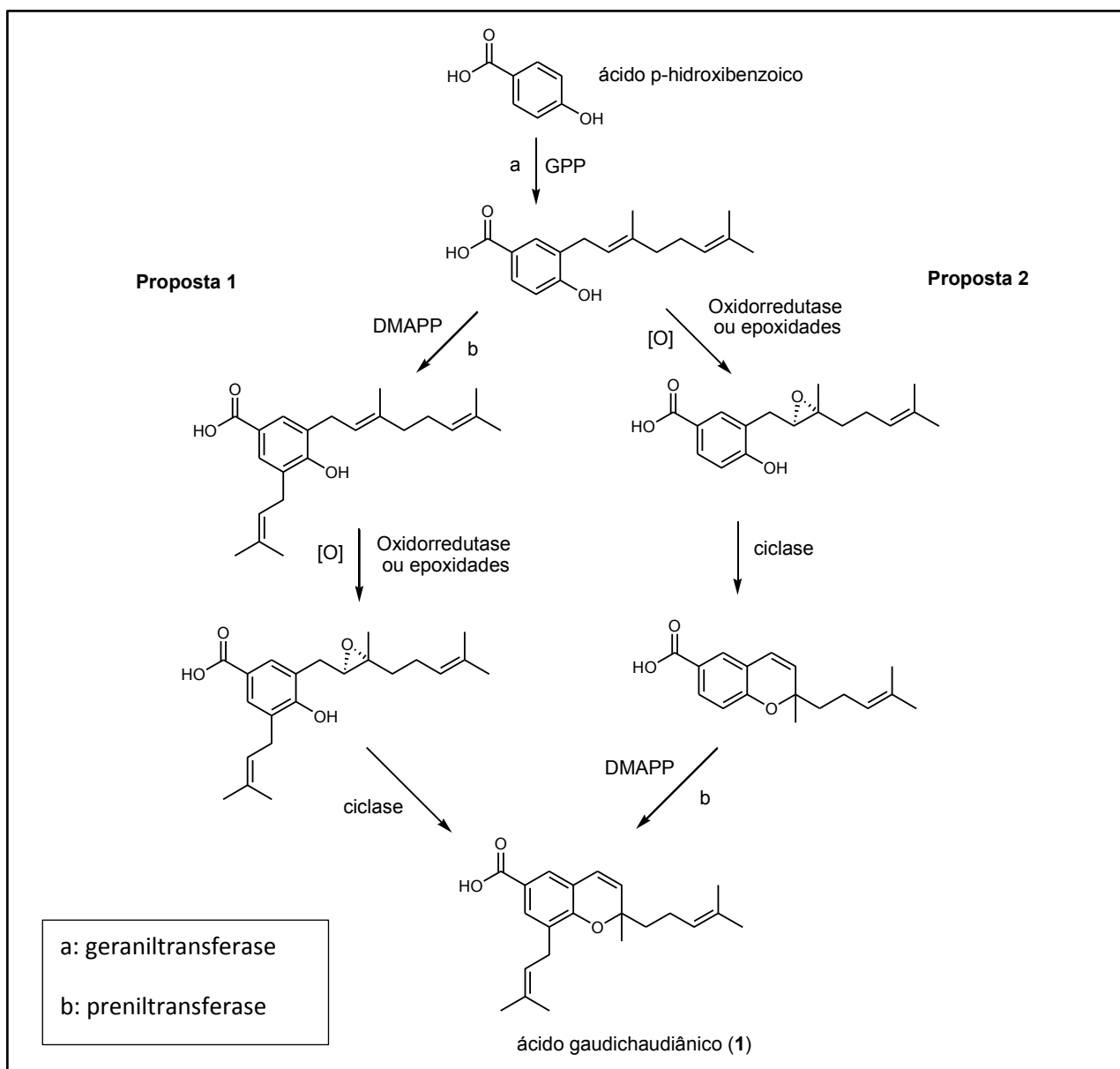
Substâncias	<i>Candida albicans</i> CIM*/CFM*	<i>Candida tropicalis</i> CIM*/CFM*	<i>Cryptococcus neoformans</i> CIM*/CFM*	<i>Aspergillus fumigatus</i> CIM*/CFM*	<i>Aspergillus niger</i> CIM*/CFM*
Mistura Racêmica	>250/>250	>250/>250	31,25/>250	>250/-	>250/-
AMB	2,0/2,0	0,5/0,5	0,5/0,5	-	-
Itraconazol	-	-	-	>16,00/-	>16,00/-

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu estudos com vista na determinação do mecanismo de formação do anel benzopirano do ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (**1**), ácido gaudichaudiânico, baseados em catálise química e enzimática. Essa pesquisa mostra relevância uma vez que o acúmulo de **1** como uma mistura racêmica, combinando as formas enantioméricas naturais (+)-*S* e (-)-*R*, pode trazer implicações quanto aos estudos de relação estrutura/atividade, principalmente porque o ácido gaudichaudiânico desempenha importantes atividades biológicas. Para o estabelecimento dos estudos das etapas de ciclização de **1**, o estudo fitoquímico dessa espécie foi realizado com vistas a identificar e isolar os possíveis precursores desse metabólito, o ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico, conhecido como ácido myrsinoico (**2**) (Figura 17(A)), o derivado do ácido myrsinoico epoxidado na posição C-2'' e C-3'' (Figura 17(B)), e o derivado monogeranilado do ácido *p*-hidroxibenzoico (Figura 17(C)), sendo que apenas a substância **2** foi isolada e caracterizada. Além disso, foi realizado o perfil proteômico das folhas de *P. gaudichaudianum* no qual se observou a presença de bandas proteicas referentes as ciclases e preniltransferases. Após o isolamento do possível precursor **2** e caracterização das proteínas iniciou-se a investigação da ciclização por catálises química e enzimática. A análise dos resultados obtidos quanto a possível racemização por catálise química corroborou com a hipótese de uma reação mediada por enzimas, pois não apresentou a formação do produto esperado em nenhuma das condições testadas. As reações enzimáticas inicialmente planejadas utilizando o extrato proteico e o precursor **2** não indicaram a formação do ácido gaudichaudiânico, mostrando que o protocolo inicialmente planejado para a extração da(s) ciclase(s) pode não ter extraído as enzimas necessárias para a ocorrência da reação. Pela análise dos precursores previamente identificados e pela avaliação dos ensaios químicos e enzimáticos propõe-se a inserção de uma nova etapa na biogênese de **1** (Figura 41), no qual o precursor **2** seja primeiramente oxidado por oxidoreductase (epoxidase), que catalisam as reações para a formação do epóxido, formando o intermediário B da figura 17, e este seja o substrato da ciclase envolvida nesta etapa biossintética (Proposta 1, Figura 41), ou ainda,

que o precursor da enzima ciclase seja o derivado do ácido *p*-hidróxibenzoico monogeranilado no carbono C-3 (Figura 17 (C)), que, após epoxidação, sofre ciclização e posterior prenilação (Proposta 2, Figura 41). Nesse caso, novos protocolos devem ser explorados e/ou novas reações enzimáticas devem ser planejadas para a incorporação do precursor epoxidado. As etapas concluídas abrem novas e importantes perspectivas que devem ser exploradas e contribuiram sobremaneira para a compreensão dos possíveis mecanismos químicos/enzimáticos envolvidos na biossíntese deste importante metabólito secundário.

Figura 45 – Novas propostas biossintéticas para formação de **1**.



REFERÊNCIAS

- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 2005.
- AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; BARBOSA JÚNIOR, N. L. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 448-454, 2007.
- 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.
- BARBOSA FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.109-139, 2006.
- BATISTA, A. N. L.; BATISTA JUNIOR, J. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BLANCH, E. W. Selective DMSO-Induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 20147-20152, 2013.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromenes derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 538-540, 2008.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 2603-2612, 2011a.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1154-1160, 2011b.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 6051-6054, 2012.

BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1406-1409, 2005.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: ancient mesopotamian medicine. **Drug News & Perspectives**, v. 15, p. 187-192, 2002.

BURGER, M. C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas da planta *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae)**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2009.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2012. 1234 p.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLSANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potencial anti-tripanososomal agents. **Medical Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CUNICO, M. M.; LOPES, A. R.; COCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. J.; PLOCHARSKI, R. B.; MIGUEL, M. D.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; MIGUEL, O. G. Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 184-188, 2007.

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

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

DONG, M.; NAGAOKA, M.; MIYAZAKI, S.; IRIYE, R.; HIROTA, M. 3-Geranyl-4-hydroxy-5-(3'-methyl-2'-butenyl)benzoic acid as an anti-inflammatory compound from *Myrsine seguinii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p.1650-1653, 1999.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. Guide to protein purification. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 285-300, 1990.

ESTEVEZ, Y.; CASTILHO, D.; PISANGO, M. T.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVIAN, M. Evolution of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 254-259, 2007.

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

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

FELIPPE, L. G.; BATISTA JUNIOR, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 4208-4214, 2012.

FIGUEREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 85, p. 455-460, 2000.

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

HOFFMANN LA ROCHE (Switzerland). F. Grueninger; E. Hochuli; P. K. Matzinger. **Tocopherol cyclase**. EP0531639, 26 May 1992, 17 Mar. 1993.

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

KUMAR, R.; RACLARU, M.; SCHUßELER, T.; GRUBER, J.; SADRE, R.; LUHS, W.; ZARHLOUL, K. M.; FRIEDT, W.; ENDERS, D.; FRENTZEN, M.; WEIER, D. Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1357-1364, 2005.

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

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

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161, 2009.

- LOPES, A. A. **Estudo químico, biológico e biossintético de *Piper gaudichaudianum* e *Piper crassinervium* (Piperaceae)**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 2053-2058, 2007.
- LOPES, A. A.; LOPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA, J. M.; AMBROSIO, D. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1040-1046, 2008.
- LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA JUNIOR, J. M.; FLAUSINO JUNIOR, O.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, 2010.
- MARQUES, J. V.; OLIVEIRA, A.; RAGGI, L.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1807-1813, 2010.
- MORANDIM, A. A.; LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.
- MORANDIM, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of *Piper* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6135-6139, 2010.
- MORI, K. Determination of structure including absolute configuration of bioactive natural products. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Boston: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 9.05, p.147-167.
- MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JUNIOR, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomida obtusifolia*. **Planta Medica**, v. 75, n. 6, p. 620-623, 2009.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-166, 2006.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

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

PUPPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; SIQUEIRA, J. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N.; ATHAYDE FILHO, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Plants with anticonvulsant properties – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

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

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

REGASINI, O. L.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n. 1B, p. 199-203, 2009b.

- RODRIGUES-SILVA, D.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G. In vitro antileishmanial activity of hydroalcoholic extracts, fractions, and compounds isolated from leaves of *Piper ovatum* vahl against *Leishmania amazonensis*. **Acta Protozoologica**, v. 48, n.1, p. 73-81, 2009.
- SAMAIN, S. M.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRÍGUES, F. J.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 677-688, 2010.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanossoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, v. 455-465, 2007.
- SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Plant diversity from brazilian cerrado and atlantic forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Boston: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.05 p. 95-133, 2010.
- SILVA, D. R. da; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G. In vitro antileishmanial activity of hydroalcoholic extracts, fractions, and compounds isolated from leaves of *Piper ovatum* vahl against *Leishmania amazonensis*. **Acta Protozoologica**, v. 48, n. 1, p. 73-81, 2009.
- SILVA, R. V. D. A.; NAVICKIENE, H. M. D.; MÉDA, C. I.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.
- SPRINGOB, K.; KUTCHAN, T. M. Introduction to the different classes of natural products. In: OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. (Org.). **Plant-derived natural products: synthesis, functions and application**. Dordrecht; New York: Springer, 2009. p. 3.
- STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 50-68, 1990.
- TANG, Y. L.; REN, W. W.; ZHANG, L.; TANG, K. X. Molecular cloning and characterization of a tocopherol cyclase gene from *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 693-702, 2011.
- TRENERRY, V. C.; ROCHFORD, S. J. Natural products research and metabolomics. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Boston: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 9.16, p. 595-628.

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

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, n. 1, p. 93-102, 2006.

YUNCKER, T. G. The Pieperaceae of Brazil. **Hoehnea**, v. 2, n. 19, p. 366, 1972.

ZÁRATE, R. Plant secondary metabolism engineering: methods, strategies, advances, and omics. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Boston: Elsevier, 2010. v. 3, cap. 3.18, p. 629-631.