

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
t: 19.119

CADASTRO DE LIVROS
19.119
2000

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Biossíntese de Neolignanas
Benzofurânicas em *Piper regnellii*
(Piperaceae)

Patrícia Sartorelli

Tese de Doutorado

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Orientador

São Paulo

-1^o/09/2000-

DEDALUS - Acervo - CQ



30100003027

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sartorelli, Patricia
S249b Biossíntese de neolignanas benzofurânicas em *Piper
regnellii* (Piperaceae) / Patricia Sartorelli. -- São Paulo,
2000.
136p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química de Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Neolignana : Química orgânica. I. T. II. Kato,
Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

"Biossíntese de Neolignanas Benzofurânicas em
Piper regnellii (Piperaceae)".

PATRÍCIA SARTORELLI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica.

Aprovada por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ - USP

Prof. Dr. HELENA MARIA CRVALHO FERRAZ
IQ - USP

Prof. Dr. MÁRCIA REGINA BRAGA
IB - SP

Prof. Dr. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
IQ - UNESP - ARARAQUARA

SÃO PAULO
01 DE SETEMBRO DE 2000.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes,
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Fernando Pessoa

*A meus pais Luiz e Maria Inês
Pelo carinho, dedicação e estímulo.
A meus irmãos Luiz Jr. e Mônica.*

*Ao Márcio B. Figueiredo, por todos esses anos
de amor, carinho e companheirismo.*

Agradecimentos

Ao Prof. Massuo J. Kato pela orientação e oportunidade de realizar um trabalho pioneiro no Laboratório de produtos Naturais do IQ-USP.

À Ana Paula Danelutte por seus conselhos, ajudas, paciência e amizade.

Ao Leandro R. Latorre por todas ajudas, pela atenção e por sua amizade.

Ao Prof. Paulo R. H. Moreno, pela valiosa colaboração na purificação enzimática.

Ao Ricardo M. Ellensonb, pela colaboração nas sínteses de precursores.

Ao Prof. Pio Colepicolo, e seus alunos, em especial ao Nani Pinto Jr. e à Patricia Lopes pela assistência nos ensaios enzimáticos.

À Mara B. Costantin e ao Roberto Carlos C. Martins pelas discussões do trabalho e pelos agradáveis momentos de descontração.

Ao Paulo Benevides por suas dicas durante o trabalho experimental.

A Fernanda S. Knudsen pela obtenção dos espectros de EPR, e pelo interesse.

Ao Lab. do Prof. Walter Terra pelo empréstimo do equipamento para purificação de proteínas.

A Prof. Pierina Sueli Bonato (FCF-RP) pelas cromatografias quirais iniciais.

Aos funcionários da central analítica pela obtenção dos espectros.

A todos os colegas do Laboratório de PN pelo agradável convívio.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

Sumário

Abreviaturas e símbolos	VIII
Resumo	XI
Abstract	XII
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XV
1. Introdução	01
1.1. A família Piperaceae	04
1.1.1. Ácidos benzóicos (derivados)	07
1.1.2. Alcalóides e amidas	11
1.1.3. Alilbenzenos	16
1.1.4. Flavonóides	18
1.1.5. Lignanas e Neolignanas	20
1.1.6. Terpenos	25
1.2. <i>Piper regnellii</i>	40
1.3. Biossíntese de lignóides	43
1.3.1. Lignanas/Neolignanas	48
1.3.2. Neolignanas benzofurânicas	51
2. Objetivos	53
3. Materiais e Métodos	
3.1. Equipamentos e Materiais utilizados	54
3.2. Purificação dos padrões de <i>P. regnellii</i>	56
3.3. Dados físicos das substâncias isoladas	60
3.4. Espectros obtidos	65
3.5. Estudo Biossintético	74

3.5.1. Preparação de Reagentes e Precusores	74
3.5.2. Doseamento da PAL	85
3.5.3. Ensaio Biossintéticos.....	87
3.5.4. Quantificação da conversão de <i>p</i> -hidróxi-propenil-benzeno	89
3.5.5. Otimização do ensaio biossintético	91
3.5.6. Análise das neolignanas por cromatografia quiral.....	92
3.5.7. Especificidade da fração enzimática aos substratos	94

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas	97
4.2. Estudo Biossintético	106
4.2.1. Doseamento de PAL	106
4.2.2. Ensaio biossintéticos	109
4.2.3. Quantificação da conversão.....	113
4.2.4. Otimização do ensaio.....	114
4.2.5. Estudo da enantiosseletividade da enzima	117
4.2.6. Especificidade da fração enzimática aos substratos	119

5. Considerações finais.....

121

6. Referências Bibliográficas.....

124

Abreviaturas e Símbolos

Act - atividade

Act esp. – atividade específica

BSA – Albumina sérica bovina

CAD - álcool cinamílico desidrogenase

C3H – cumarato 3-hidroxilase

C4L - cinamato 4-hidroxilase

4CL - 4-cinamoil ligase

CC - cromatografia em coluna

CCR - cinamoil coenzima A redutase

CG – cromatografia gasosa

CG/EM - cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CPC - cromatografia planar comparativa

CPP - cromatografia planar preparativa

CS – Conocarpano sintase

d – dubleto

DC – dicroísmo circular

dd - duplo dubleto

d. i. – diâmetro interno

DTT - ditioneitol

dq – duplo quarteto

E-I – Composto I

E-II - Composto 2

EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético

ee- excesso enantiomérico

EM - Espectro de massas

EPR- Ressonância do elétron paramagnético

ES-EM – Espectro de massas modo eletronspray

F-5H – ferulato 5-hidroxilase
Gu - guaiacila (4-hidroxi-3-metoxifenila)
HP - Hewlett Packard
IV - infra-vermelho
K-Pi – Tampão fosfato
m – múltiplo
m/z - relação massa / carga
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
OMT - O-metiltransferase
PAF – fator de agregação plaquetária
PAL – Fenilalanina amônia liase
Phe - fenilalanina
p. i. – padrão interno
Pi - piperonila (3,4-metilenodioxifenila)
PM – peso molecular
PND – espectro de carbono desacoplado do próton
PVPP – Polivinilpolipirrolidona
Py - piridina
RMN-¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN-¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze
s – singleto
SDS –dodecil sulfato de sódio
s/ - singleto largo
t – tripleto
T. A. – temperatura ambiente
TAL – tirosina amônia liase
THF - tetraidrofurano
TMS – tetrametilsilano
Tris – tris(hidroximetil)aminoetano
Ve - veratril (3,4-dimetoxifenila)

α - rotação específica

δ - deslocamento

λ - comprimento de onda

θ – rotação molecular

Resumo

O trabalho descreve o estudo do metabolismo secundário de *Piper regnellii*. Os principais metabólitos de *Piper regnellii* são 3 fenilpropanóides, 4 neolignanas di-hidrobenzofurânicas, entre as quais conocarpano, *epi*-conocarpano e regnellina; 3 neolignanas benzofurânicas: eupomatenóide-6, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-3, e 3 dinor-neolignanas: decurrenal, *epi*-decurrenal e um éster metílico. Com base nas substâncias isoladas, foi proposta uma rota biossintética, onde o fenilpropanóide *p*-hidróxi-propenil-benzeno é sugerido como o precursor da neolignana conocarpano. Esta rota biossintética foi avaliada, utilizando-se preparações enzimáticas de folhas de *P. regnellii*, onde foi observada a conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano com rendimento de 21%. O conocarpano enzimaticamente produzido foi analisado por cromatografia quiral, que mostrou a conversão enantiosseletiva (85% ee) para a formação do (+)-conocarpano e 100% ee para a formação do (-)-*epi*-conocarpano. A fração enzimática responsável pela conversão foi também avaliada quanto à especificidade ao substrato, utilizando-se o ácido *p*-cumárico, álcool *p*-cumárico e *E*-isoeugenol. Somente no caso deste último foi observada sua conversão não específica em licarina-A, que pode ser considerada artefato biossintético. Observou-se que a fração enzimática é específica para propenil-fenóis, não convertendo fenilpropanóides com C-9 oxidado. Esta é a primeira demonstração de uma enzima específica envolvida na biossíntese de uma neolignana como dímero de propenilfenol.

Abstract

This present work describes the biosynthetic study of secondary metabolism in *Piper regnellii* (Piperaceae). The isolation and structural determination of major secondary compounds carried out in roots of *P. regnellii* yielded three phenylpropanoids (apiol, dillapiol and myristicin), four dihydrobenzofuran neolignans, including conocarpan and *epi*-conocarpan, three benzofuran neolignans: eupomatenoid-6, eupomatenoid-5 and eupomatenoid-3, and three *dinor*-neolignans: decurrenal, *epi*-decurrenal and a methyl ester. Since *p*-hydroxypropenylbenzene was considered to be the precursor of the dihydrobenzofuran neolignan conocarpan, such conversion was evaluated by an enzyme preparation obtained from leaves. A membrane fraction was capable to convert unlabelled *p*-hydroxypropenylbenzene to conocarpan (21%), in a enantiosseletive manner since the (+)-conocarpan produced showed 85% ee and (-)-*epi*conocarpan 100% ee. The substrate specificity of this enzyme was evaluated against *E*-isoeugenol, *p*-coumaric acid and *p*-coumaric alcohol, but no conversion could be observed. The soluble fraction was able to catalyse the dimerization of *E*-isoeugenol to the racemic licarin-A, which can be considered an artefact since this neolignan is not a natural product of *P. regnellii*. The occurrence of benzofuran neolignans in *P. regnellii* is determined by the presence of a highly enantioselective and substrate specific enzyme which is capable to dimerize *p*-hydroxypropenyl-benzene to (+)-conocarpan. To date, this is the first demonstration of a specific enzyme involved in biosynthesis of neolignan as a dimer of propenylbenzene.

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas dos metabólitos secundários utilizados como fármacos.....	03
Figura 2: Estrutura da piperina.....	04
Figura 3: Kava-pironas isoladas de <i>P. methysticum</i>	05
Figura 4: Especimen de <i>P. regnellii</i> no IQ-USP.....	41
Figura 5: Folha de <i>P. regnellii</i>	42
Figura 6: Estruturas dos ácidos cinâmílicos.....	44
Figura 7: Biossíntese de lignanas de espécies de <i>Forsythia</i>	47
Figura 8: Exemplos de lignanas segundo IUPAC / neolignanas segundo Gottlieb.....	49
Figura 9: Exemplos de neolignanas segundo a IUPAC e Gottlieb	49
Figura 10: Esquema de formação de lignanas/neolignanas	50
Figura 11: Possível precursor do conocarpano.....	52
Figura 12: Esquema de fracionamento cromatográfico de raízes de <i>P. regnellii</i> ..	58
Figura 13: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de FP-1+FP-2.....	66
Figura 14: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de FP-3.....	67
Figura 15: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Ne-1+Ne2	68
Figura 16: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Ne-3.....	69
Figura 17: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Ne-4.....	70
Figura 18: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Ne-6.....	71
Figura 19: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Ne-7.....	72
Figura 20: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de DN-1+DN-2.....	73
Figura 21: Esquema de desmetilação do anetol	74
Figura 22: Estrutura da difenilfosfina.....	75
Figura 23: Reação de obtenção do ácido <i>p</i> -cumárico.....	76
Figura 24: Espectro de EM da difenilfosfina.....	78
Figura 25: Espectro de EM do <i>p</i> -hidróxi-propenil-benzeno.....	79
Figura 26: Espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, acetona) do <i>p</i> -hidróxi-.....	81
Figura 27: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, acetona) do ácido <i>p</i> -cumárico	82

Figura 28: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, acetona) do cumarato de metila	83
Figura 29: Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, acetona) do álcool <i>p</i> -cumárico	84
Figura 30: Estrutura da canelina-A.....	90
Figura 31: Esquema de biossíntese do conocarpano	95
Figura 32: Fenilpropanóides isolados de <i>P. regnellii</i>	97
Figura 33: Neolignanas di-hidrobenzofurânicas isoladas de <i>P. regnellii</i>	98
Figura 34: Neolignanas benzofurânicas isoladas de <i>P. regnellii</i>	98
Figura 35: Dinor-neolignanas isoladas de <i>P. regnellii</i>	99
Figura 36: Análise por CLAE do ensaio da PAL A: t = 30 min, B: t = 0	107
Figura 37: Curva padrão da BSA para o ensaio de Bradford.....	107
Figura 38: Perfil cromatográfico do extrato de folhas de <i>P. regnellii</i>	109
Figura 39: Estrutura de Triton X-100.....	110
Figura 40: Análise por CLAE de A: produto de dimerização enzimática do <i>p</i> -hidróxi-propenil-benzeno, B: ensaio em branco	113
Figura 41: Curva de calibração do conocarpano+p. i.....	113
Figura 42: Curva de pH da conocarpano sintase	115
Figura 43: Curva de saturação do substrato	115
Figura 44: Cinética da conversão do <i>p</i> -hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano.....	116
Figura 45: Cromatograma obtido em CLAE-quiral do A: conocarpano <i>trans</i> e B: conocarpano <i>cis</i>	118
Figura 46: Análise do produto de dimerização enzimática através de CLAE-quiral, A:conocarpano sintético, B: conocarpano natural, C: conocarpano enzimaticamente produzido.....	118
Figura 47: Produto de dimerização do álcool <i>p</i> -cumárico	119
Figura 48: Cromatograma em CLAE-fase reversa de A: álcool <i>p</i> -cumárico, B: produto de dimerização do álcool <i>p</i> -cumárico.....	119
Figura 49: Purificação parcial da CS por filtração em gel (Sephacril S 200 HR) .	120
Figura 50: Biossíntese de neolignanas benzofurânicas e fenilpropanóides em <i>P. regnellii</i>	123

Lista de Tabelas

Tabela 1: Derivados de ácidos benzóicos e cromenos isolados de espécies de <i>Piper</i>	07
Tabela 2: Amidas e Alcalóides isolados de espécie de <i>Piper</i>	11
Tabela 3: Alilbenzenos isolados de espécies de <i>Piper</i>	16
Tabela 4: Flavonóides isolados de espécies de <i>Piper</i>	18
Tabela 5: Lignanas/neolignanas isoladas de espécies de <i>Piper</i>	20
Tabela 6: Terpenos isolados de espécies de <i>Piper</i>	25
Tabela 7: Fracionamento cromatográfico de raízes de <i>P. regnellii</i>	57
Tabela 8: Dados obtidos nos espectros de RMN- ¹ H dos precursores sintetizados	80
Tabela 9: T _R dos padrões isolados.....	101
Tabela 10: Dados obtidos (δ, multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ¹ H dos fenilpropanóides	102
Tabela 11: Dados obtidos (δ, multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ¹ H das neolignanas Ne-1 a Ne-4.....	103
Tabela 12: Dados obtidos (δ, multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ¹ H das neolignanas Ne-5 a Ne-7.....	104
Tabela 13: Dados obtidos (δ, multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ¹ H das neolignanas DN-1 a DN-3.....	105

1. Introdução

Desde tempos remotos as plantas vêm sendo utilizadas com fins medicinais. Sabe-se que o conhecimento da medicina popular tem servido como base para o desenvolvimento de fármacos de grande importância, como por exemplo a diosgenina, que é um precursor de várias drogas esteroidais e é extraída de espécies de *Discorea* (Accatino *et al.* 1998, Rojas *et al.* 1999); o paclitaxel, mais conhecido comercialmente como Taxol®, que é extraído da casca de *Taxus brevifolia* (Kingston *et al.* 1990; Wagner *et al.* 1994; Stull *et al.* 1995); a pilocarpina, utilizada no tratamento do glaucoma, extraída de *Pilocarpus microphyllus* (Link *et al.* 1972, Hoffman *et al.* 1999); etoposídeo, que é o derivado semi-sintético obtido a partir da podofilotoxina, originalmente encontrada na espécie *Podophyllum peltatum* (Jackson e Dewick, 1985). Exemplos destes metabólitos secundários de grande importância na indústria farmacêutica são mostrados na figura 1. Neste contexto os metabólitos secundários de origem vegetal apresentam um grande valor do ponto de vista social e econômico. Como exemplo, na década de 80, foram identificados 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, as quais têm sido empregadas com fins terapêuticos nos países ocidentais. Do ponto de vista econômico, pode-se citar os alcalóides indólicos terpenoídicos vincristina e vinblastina (utilizados no tratamento de leucemia) extraídos de *Catharanthus roseus*, os quais têm seus valores de mercado estimados em U\$6.000/g e U\$12.000/g, respectivamente (Maraschin e Verpoorte, 2000).

Além do alto valor econômico que algumas substâncias de origem vegetal apresentam, esta área apresenta um grande potencial no que concerne ao desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que a diversidade química, associada à diversidade biológica encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos, é um importante aspecto a ser considerado em processos de desenvolvimento de novos fármacos. Como estimativa, cerca de 110.000 compostos foram identificados até o presente, sendo que deste total os

terpenóides constituem o maior grupo (cerca de 33.000 compostos), seguido pelos alcalóides (cerca de 16.000 compostos) (Hegnauer, 1992). Anualmente, 4.000 novos compostos de origem vegetal são descritos, com uma tendência de crescimento. Como característica geral, tais metabólitos secundários mostram um padrão de ocorrência restrita em alguns grupos taxômicos, não sendo considerados essenciais ao metabolismo basal da célula vegetal, sendo por isso denominados de metabólitos secundários (Mann, 1987). No aspecto de interação planta/ambiente desempenham um papel importante, garantindo a sobrevivência das espécies no ecossistema (Whittaker e Fenny, 1971; Harborne, 1993). Além disso, os metabólitos secundários isolados de plantas têm assumido grande importância no cotidiano, devido à diversidade de funções biológicas e as aplicações na agricultura (produção de inseticidas), na perfumaria (produção de aromatizantes) e na indústria alimentícia (Hamburger e Hostettman, 1991).

Os produtos naturais apresentam uma grande variedade estrutural, e isso é resultado de um processo evolutivo. Atualmente, tem se explorado muito o potencial farmacológico desses produtos naturais. Muitas substâncias utilizadas clinicamente vêm de plantas, e ainda hoje procura-se em extratos vegetais metabólitos secundários biologicamente ativos para o tratamento de diversos males, entre os quais a malária, o câncer e a aids (McLaughlin *et al.* 1991).

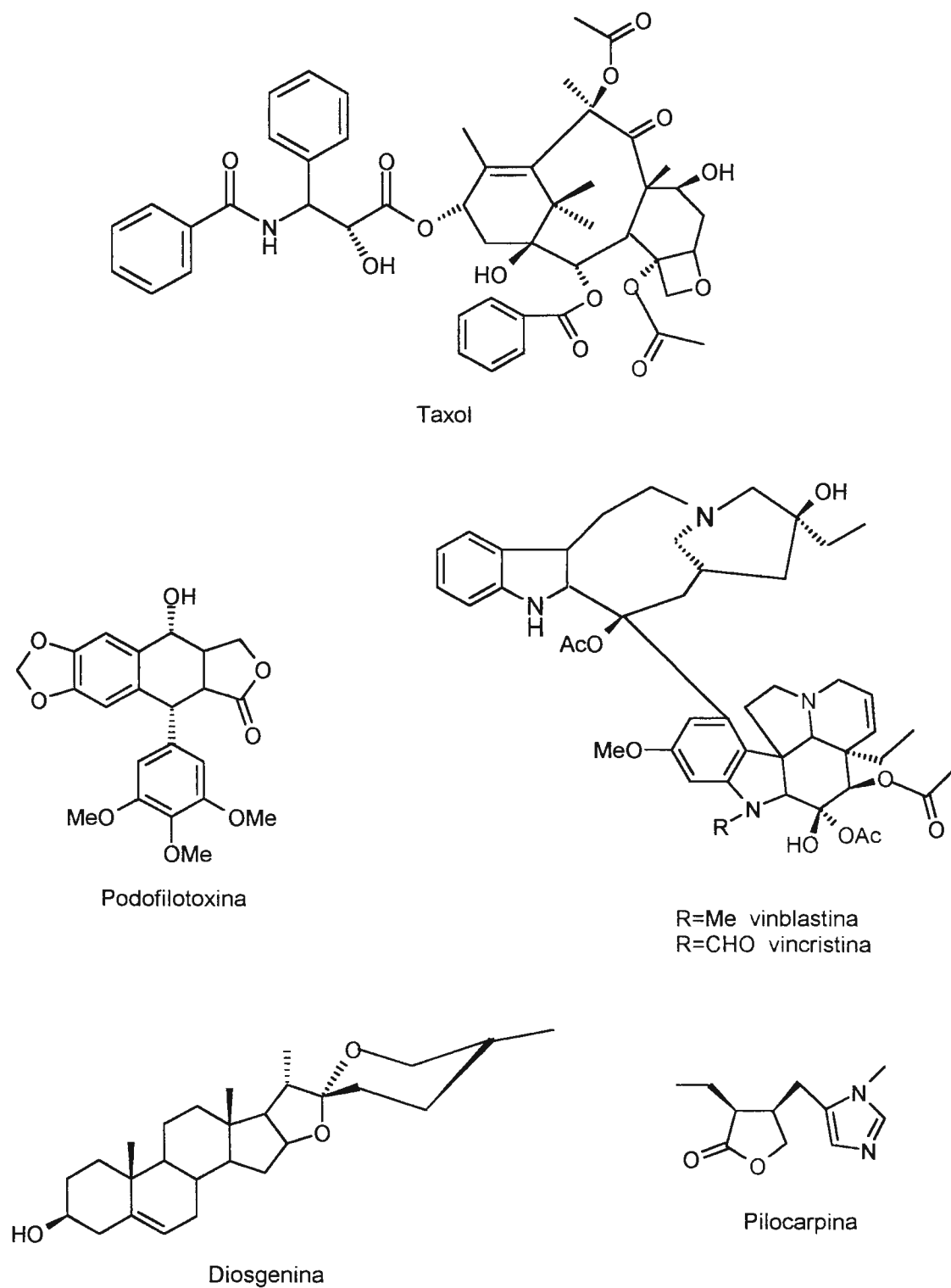


Figura 1: Estruturas de metabólitos secundários utilizados como fármacos

1.1. Família Piperaceae

A família Piperaceae pode ser classificada, juntamente com a família Chlorantaceae, dentre as mais primitivas Angiospermae, podendo ser considerada um fóssil vegetal vivo (Taylor e Hickey, 1992). Esta família possui cerca de 1200 espécies, distribuídas em ambos os hemisférios, e compreende cerca de 10 a 12 gêneros, entre os quais: *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe* e *Macropiper* (Joly, 1985). Destes gêneros, o mais importante do ponto de vista econômico e comercial é o gênero *Piper*, principalmente pela pimenta obtida a partir da espécie *P. nigrum* (os frutos maduros de *P. nigrum* são a fonte da pimenta branca, enquanto o fruto verde da mesma espécie é a fonte da pimenta negra). Os princípios picantes da pimenta-do-reino são devidos à piperina, uma amida presente em *P. nigrum* (Kiuchi *et al.* 1988, Siddiqui *et al.* 1997) e *P. puberullum* (Wu *et al.* 1997) (Figura 2). A biossíntese da piperina foi investigada em brotos de *P. nigrum*, e foi descrita uma nova aciltransferase, que catalisa a síntese de piperina na presença de piperoil-CoA e piperidina (Geisler e Gross, 1990). Este constitui um dos raros trabalhos de biossíntese envolvendo espécies de Piperaceae.

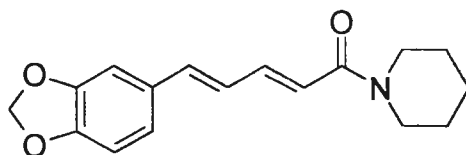


Figura 2: Estrutura da piperina

Outra espécie bastante importante do ponto de vista comercial é *P. methysticum*, vulgarmente conhecida como kava-kava nas ilhas Oceânicas do Pacífico Sul, onde ocorre. São descritos nesta espécie kava-pironas que atuam no sistema nervoso central como uma substância anestésica e hipnótica (Singh *et al.* 1992). Exemplos de kava-pironas são methisticina e kavaína (Figura 3).

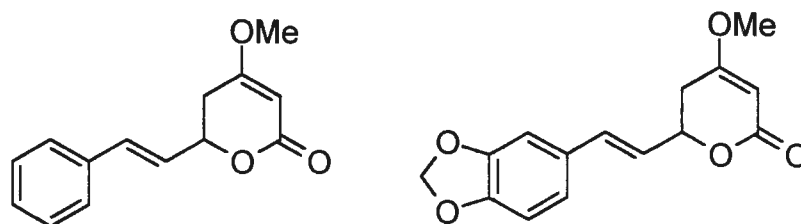


Figura 3: Kavaína e methisticina (Kava-pironas de *P. methysticum*)

Outras classes de metabólitos secundários isolados de espécies de *Piper* são as neolignananas, isoladas de *P. decurrens* (Chauret *et al.* 1996), *P. argyrophyllum* (Singh *et al.* 1996) e *P. solmsianum* (Moreira *et al.* 1995). Espécies aromáticas de Piperaceae possuem fenilpropanóides como principais constituintes da fração volátil como, por exemplo, *P. aduncum* (Diaz *et al.* 1984) e *P. marginatum* (Alencar *et al.* 1994). A espécie *Piper aduncum* acumula ainda em suas folhas, derivados de ácidos benzóicos com atividade antimicrobiana e moluscicida (Orjala *et al.* 1993a; Orjala *et al.* 1993b). Estão também descritos terpenos como constituintes dos óleos essenciais em *P. angustifolium* (Tirillini *et al.* 1996), *P. acutifolium* (Lognay *et al.* 1996) e *P. betle* (Garg *et al.* 1996); lignanas em *P. cubeba* (Badheka *et al.* 1986) e *P. longum* (Koul *et al.* 1988) e flavonóides em *P. caninum* (Ahmad *et al.* 1997) e *P. aduncum* (Orjala *et al.* 1994). Nas Tabelas seguintes, pode-se observar diversas classes de produtos naturais isolados de espécies de *Piper* de 1997 a 1999. A revisão completa cobrindo os períodos de 1908 a 1997 foi realizada por Parmar *et al.* (1997). A maioria desses produtos naturais é derivada da via do ácido chiquímico.

Dentre as vias derivadas da via do ácido chiquímico, a via fenilpropanoídica é de particular interesse, devido à grande diversidade de lignanas/neolignananas produzidas por diversas espécies de Piperaceae. Entre as diversas atividades biológicas, destacam-se as lignanas antitumorais podofilotoxina e seus derivados semi-sintéticos (etoposídeo e tenoposídeo), que constituem a base de potentes anti-cancerígenos *in vitro*, ainda utilizados clinicamente (Jackson e Dewick, 1985);

outras lignanas relacionadas à podofilotoxina apresentaram atividade imunossupressora (Gordazila *et al.* 1997); são ainda descritas lignanas antifúngicas (Sartorelli *et al.* 1998), lignanas com atividade cardiovascular (Ghisalberti *et al.* 1997) e lignanas com atividade anti-PAF e anti-HIV (MacRae e Towers, 1984, Pan *et al.* 1987, Gottlieb e Yoshida, 1989).

Este potencial de espécies de Piperaceae em acumular lignóides biologicamente ativos ainda não foi devidamente investigado.

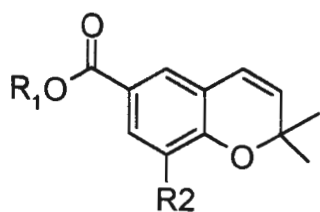
1.1.1. Ácidos Benzóicos (derivados)

Muitas espécies de *Piper* acumulam derivados de ácidos benzóicos e cromenos, produtos de origem biossintética mista, sendo que vários apresentam atividades biológicas. Os ácidos benzóicos 2, 3 e 7 isolados de *P. elongatum*, apresentam forte atividade antioxidante, mais alta que α -tocoferol (Masuoka *et al.* 1997). Os cromenos isolados de *P. dilatatum* (11, 12 e 13) apresentam atividade anti-fúngica (Terreaux *et al.* 1998). Os derivados de ácido benzóico isolados de *P. guanacastensis* (6, 18 e 19) apresentam atividade inseticida contra larvas de *Aedes atropalpus* (Pereda-Miranda *et al.* 1997). Da mesma forma que as amidas, esta classe de metabólitos secundários representa grande potencial para a descoberta de novos inseticidas. As substâncias desta classe de metabólitos secundários descritas em espécies de *Piper* estão na Tabela 1.

Tabela 1: Ácidos benzóicos e cromenos isolados de espécies de *Piper*

Composto	Planta	Referência
ácido 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico (1)	<i>P. aduncum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> 1999
ácido 3-(3',7'-dimetil-2'-6'-octadienil)-4-metoxi-benzóico (2)	<i>P. aduncum</i> <i>P. elongatum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> 1999 Masuoka <i>et al.</i> 1997
ácido 3-geranil-4-hidróxi-benzóico (3)	<i>P. elongatum</i>	Masuoka <i>et al.</i> 1997
ácido (E)-4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo)2',6'-octadienil-benzóico (4)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
ácido (Z)-4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo)2',6'-octadienil-benzóico (5)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
ácido 4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil)-benzóico (6)	<i>P. guanacastensis</i>	Pereda-Miranda <i>et al.</i> 1997
ácido nervogênico (7)	<i>P. elongatum</i>	Masuoka <i>et al.</i> 1997
ácido piperóico (8)	<i>P. arieianum</i>	Green <i>et al.</i> 1999
ácido tabogânico (9)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998

arieianal (10)	<i>P. arieianum</i>	Green <i>et al.</i> 1999
2,2,-dimetil-6-carboxicroman-4-ona metil éster (11)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
2,2-dimetil-3-hidroxi-6- carboxicromano-metil éster (12)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
2,2-dimetil-6-carboxicromeno-metil éster (13)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
2,2-dimetil-6-carboxil-8-prenil cromeno (14)	<i>P. elongatum</i>	Masuoka <i>et al.</i> 1997
2-2-dimetil-2H-1-cromeno-6- carboxilato de metila (15)	<i>P. aduncum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> 1999
2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2H-1- cromeno-6-carboxilato de metila (16)	<i>P. aduncum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> 1999
8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6- carboxilato de metila (17)	<i>P. aduncum</i>	Baldoqui <i>et al.</i> 1999
4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil)- benzoato de etila (18)	<i>P. guanacastensis</i>	Pereda-Miranda <i>et al.</i> 1997
4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil)- benzoato de metila (19)	<i>P. guanacastensis</i>	Pereda-Miranda <i>et al.</i> 1997
3-(2'-hidroxi-3'-metil-3'-butenil)-4- hidroxi-benzoato de metila (20)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
lhotzcromeno (21)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
metil taboganato (22)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
sargaquinal (23)	<i>P. arieianum</i>	Green <i>et al.</i> 1999

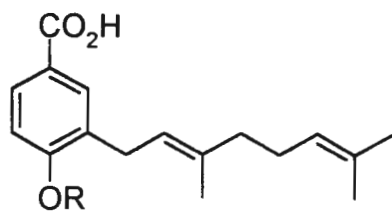


$R_1=R_2=H$ (1)

$R_1=Me$; $R_2=CH_2CH_2=C(CH_3)$ (16)

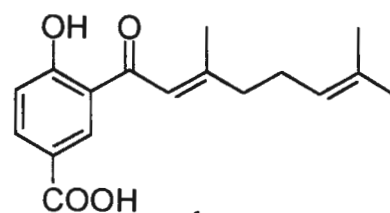
$R_1=Me$; $R_2=H$ (15)

$R_1=Me$; $R_2=OH$ (17)

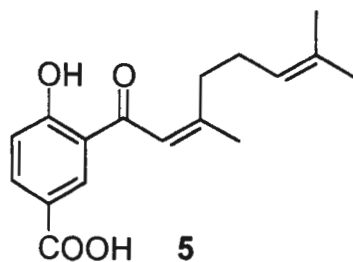


$R=H$ (2)

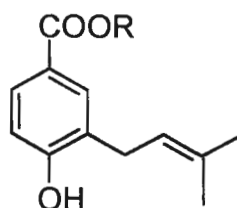
$R=Me$ (3)



4



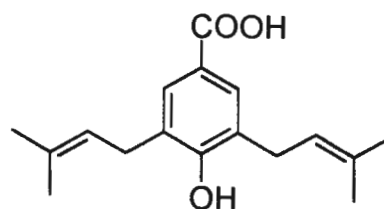
5



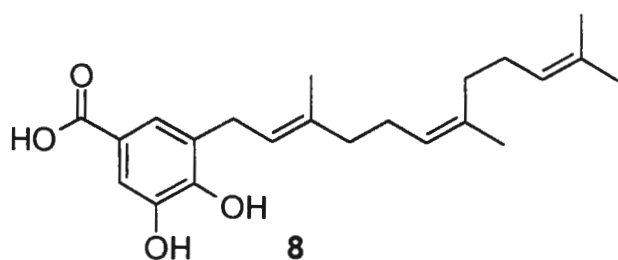
$R = CH_3$ (19)

$R = CH_2CH_3$ (18)

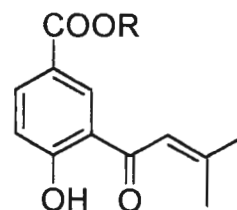
$R = H$ (6)



7

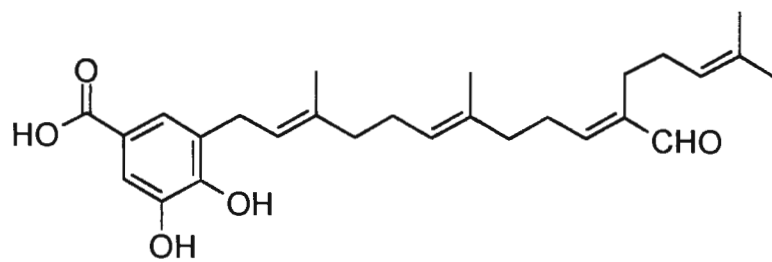


8

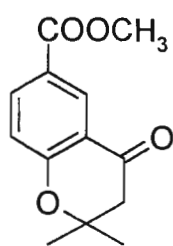


$R = H$ (9)

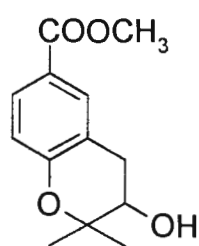
$R = CH_3$ (22)



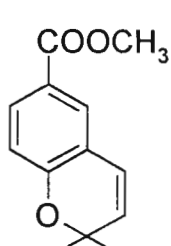
10



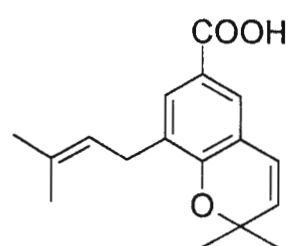
11



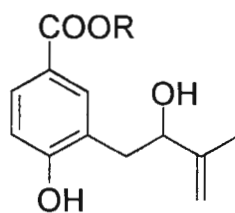
12



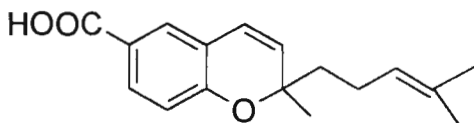
13



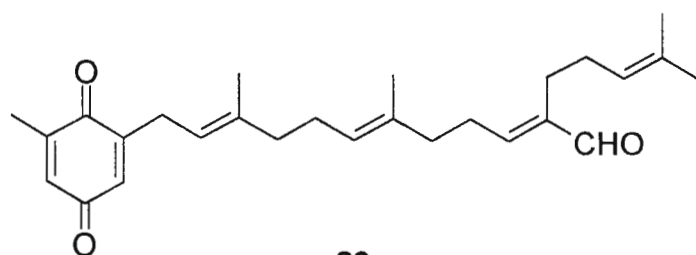
14



20



21



23

1.1.2. Alcalóides e Amidas

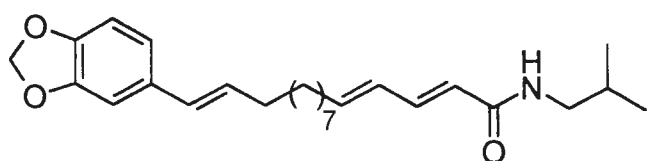
Alcalóides e amidas são as as classes de metabólitos secundários mais frequentes em espécies de *Piper*, e também as mais estudadas (Tabela 2). A piperina (41) é a amida mais comum, tendo sido isolada de nove espécies de *Piper*. Os derivados da piperina, a pipertina (39), piperdardina (38) e a piperina S (42) também têm sido isolados de outras espécies (Araújo *et al.* 1997, Siddiqui *et al.* 1997). As amidas isoladas de *P. hispidum* (34) e (35) apresentaram atividade anti-fúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* (Alécio *et al.* 1998). As amidas descritas em *P. nigrum* mostraram atividade larvicida contra o segundo estágio da larva de *Toxocara canis*. Essas amidas terciárias possuem uma cadeia de nove átomos de carbono entre o anel aromático e o grupamento amina (Kiuchi *et al.* 1988). Os alcalóides mais comuns descritos em espécies de *Piper* são os piperidínicos (38) e os piperidônicos, também conhecidos como alcanidas (42), (43) e (48).

Tabela 2: Amidas e Alcalóides isolados de espécies de *Piper*

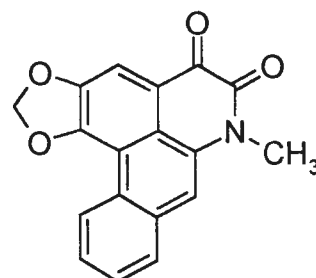
Composto	Planta	Referência
brachistamida-B (24)	<i>P. longum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i>	Das <i>et al.</i> 1998 c Zhang <i>et al.</i> 1999
cefaradiona-A (25)	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. betle</i> <i>P. pedicellosum</i> <i>P. thomsoni</i> <i>P. augustum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Parmar <i>et al.</i> 1998 Parmar <i>et al.</i> 1998 Parmar <i>et al.</i> 1998 Delgado <i>et al.</i> 1998
cefaradiona-B (26)	<i>P. augustum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i> <i>P. tuberculatum</i>	Delgado <i>et al.</i> 1998 Zhang <i>et al.</i> 1999 Araújo-Jr. <i>et al.</i> 1999
8,9-di-hidro-piplartina (27)	<i>P. puberullum</i>	Wu <i>et al.</i> 1997
3-(3,4-dimetoxifenil)propanoilpirrol	<i>P. brachystachyum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998

(28)		
furacridona (29)	<i>P. pedicellosum</i>	Parmar et al. 1998
futoamida (30)	<i>P. longum</i>	Das et al. 1998 b
guineensina (31)	<i>P. longum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i>	Parmar et al. 1998 Zhang et al. 1999
(E, E)-N-Isobutil-2,4-octadienamida (32)	<i>P. marginatum</i>	Santos et al. 1999
isopiperoleina (33)	<i>P. nigrum</i>	Srinivas et al. 1999
N-[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(Z), 4(Z)-heptadienoil]-pirrolidina (34)	<i>P. hispidum</i>	Alécio et al. 1998
N-[5-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(E)- pentadienoil]-pirrolidina (35)	<i>P. hispidum</i>	Alécio et al. 1998
pellitorina (36)	<i>P. pedicellosum</i> <i>P. longum</i>	Parmar et al. 1998 Das et al. 1998 a
pipercallosidina (37)	<i>P. piscatorum</i>	McFerren et al. 1998
piperdardina (38)	<i>P. tuberculatum</i>	Araújo-Jr. et al. 1997
piperettina (39)	<i>P. tuberculatum</i>	Araújo-Jr. et al. 1997
pipericina (40)	<i>P. nigrum</i>	Siddiqui et al. 1997
piperina (41)	<i>P. nigrum</i> <i>P. acutisleginum</i> <i>P. betle</i> <i>P. khasiana</i> <i>P. thomsoni</i> <i>P. tuberculatum</i> <i>P. retrofactum</i> <i>P. longum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i>	Siddiqui et al. 1997 Parmar et al. 1998 Parmar et al. 1998 Parmar et al. 1998 Parmar et al. 1998 Araújo-Jr. et al. 1997 Pande et al. 1997 Das et al. 1998 a Zhang et al. 1999
piperina S (42)	<i>P. puberullum</i>	Wu et al. 1997
piperlactama S (43)	<i>P. puberullum</i>	Wu et al. 1997
piperlongumina (44)	<i>P. acutisleginum</i>	Parmar et al. 1998

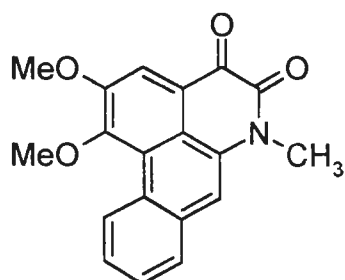
	<i>P. betle</i> <i>P. khasiana</i> <i>P. auritum</i> <i>P. longum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i>	Parmar et al. 1998 Parmar et al. 1998 Saez et al. 1998 Das et al. 1998 a Zhang et al. 1999
piperovatina (45)	<i>P. piscatorum</i>	McFerren et al. 1998
piplartina (46)	<i>P. puberullum</i>	Wu et al. 1997
piplartina dímero (47)	<i>P. puberullum</i>	Wu et al. 1997
puberulumina (48)	<i>P. puberullum</i>	Wu et al. 1997
retrofactamida (49)	<i>P. longum</i> <i>P. manii</i>	Parmar et al. 1998 Parmar et al. 1998



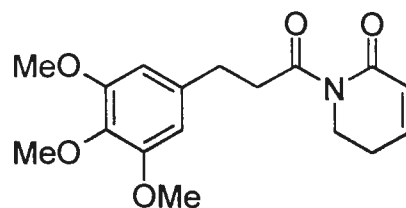
24



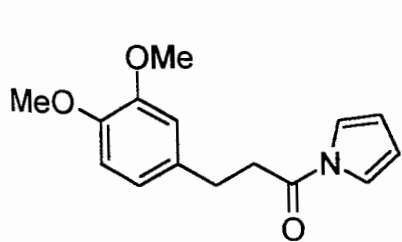
25



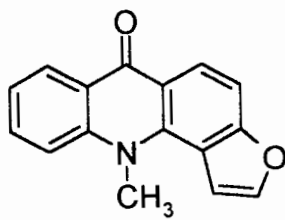
26



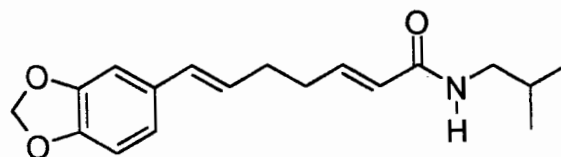
27



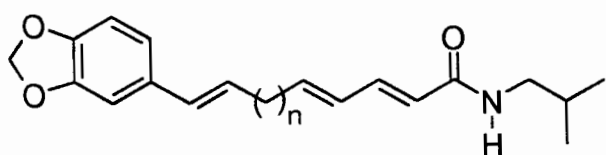
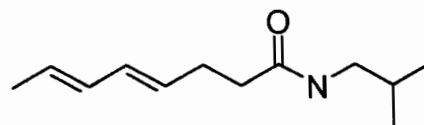
28



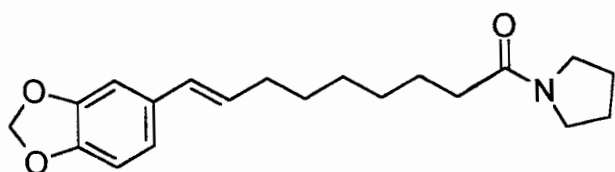
29



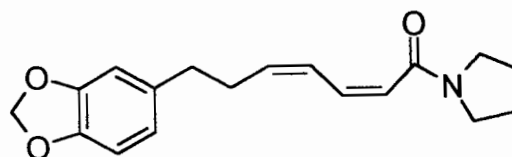
30

 $n=2$ (31) $n=6$ (49)

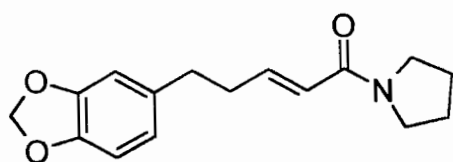
32



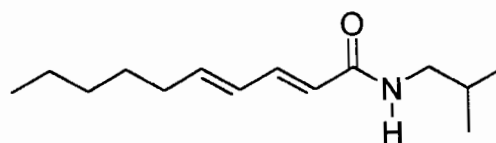
33



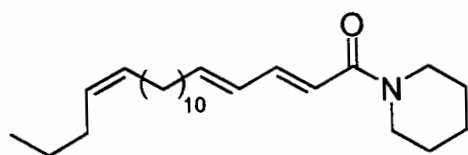
34



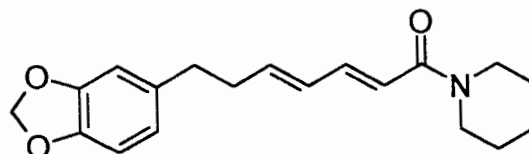
35



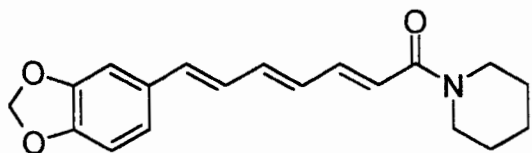
36



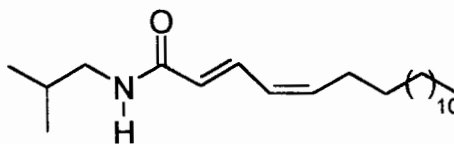
37



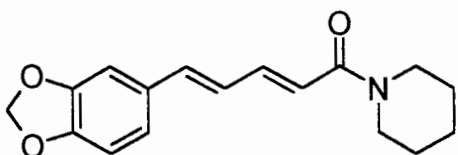
38



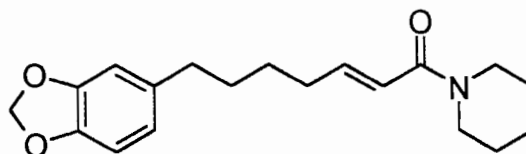
39



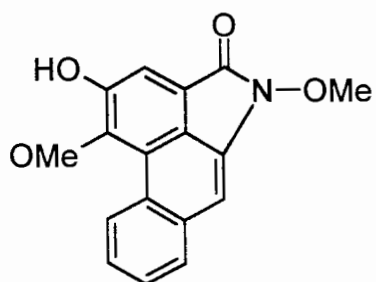
40



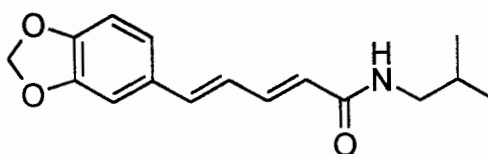
41



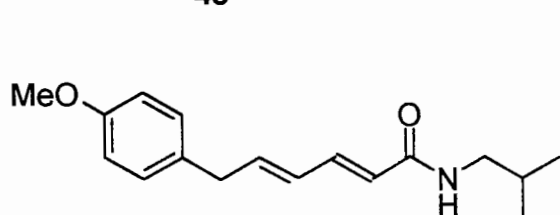
42



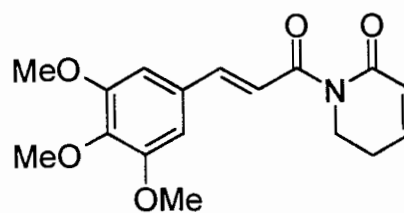
43



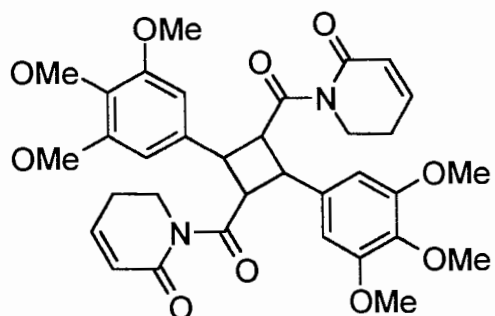
44



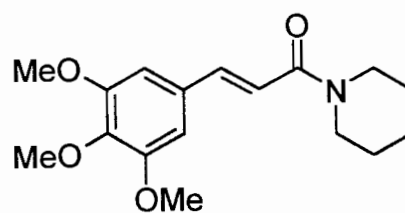
45



46



47



48

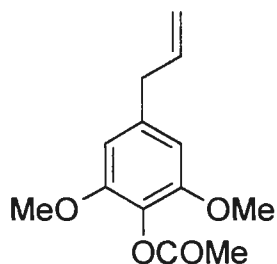
1.1.3. Fenilpropanóides e derivados

Fenilpropanóides são os principais constituintes de duas espécies de *Piper*: *P. marginatum* (Santos *et al.* 1997, Santos *et al.* 1998) e *P. aduncum* (Parmar *et al.* 1998), além de *P. regnellii* (Benevides *et al.* 1999). O safrol é o constituinte predominante de *Piper hispidinervium* (Maia *et al.* 1993), que está sendo cultivada como espécie sucedânea de *Ocotea pretiosa*, que encontra-se ameaçada de extinção em Santa Catarina. O safrol é matéria-prima ainda hoje utilizada para a síntese de heliotropina, que por sua vez é utilizada para a síntese do sinergista de inseticidas butóxido de piperonila. É bastante frequente o elevado grau de oxigenação nesses fenilpropanóides (Tabela 3).

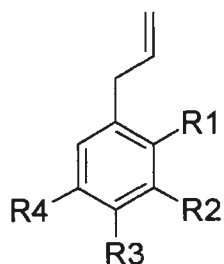
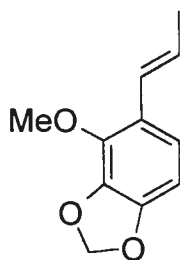
Tabela 3: Fenilpropanóides isolados de espécies de *Piper*

Composto	Planta	Referência
2-acetoxi-1,3-dimetoxi-5-(2-propenil)benzeno (50)	<i>P. aduncum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
apiol (51)	<i>P. aduncum</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. regnellii</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Santos <i>et al.</i> 1998 Benevides <i>et al.</i> 1999
croweacina (52)	<i>P. marginatum</i>	Santos <i>et al.</i> 1997
dilapiol (53)	<i>P. aduncum</i> <i>P. regnellii</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Benevides <i>et al.</i> 1999
2,6-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-1-(2-propenil)benzeno (54)	<i>P. marginatum</i>	Santos <i>et al.</i> 1998
2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)-fenol (55)	<i>P. aduncum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
elemicina (56)	<i>P. aduncum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
isoasarona (57)	<i>P. marginatum</i>	Santos <i>et al.</i> 1998
marginatina (58)	<i>P. marginatum</i>	Santos <i>et al.</i> 1998

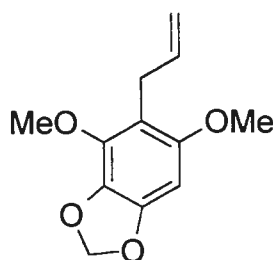
miristicina (60)	<i>P. aduncum</i> <i>P. regnellii</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Benevides <i>et al.</i> 1999
piper margina (61)	<i>P. marginatum</i>	Santos <i>et al.</i> 1998
safrol (62)	<i>P. aduncum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998



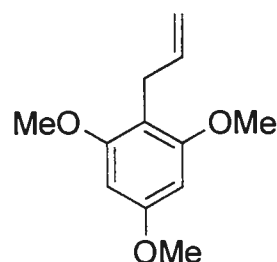
50

R₁=R₂=OMe; R₃+R₄=OCH₂O (53)R₁=H; R₂=OMe; R₃+R₄=OCH₂O (60)R₁=OMe; R₂=H; R₃+R₄=OCH₂O (59)R₁=R₂=H; R₃+R₄=OCH₂O (62)R₁=H; R₂=R₃=R₄=OMe (56)R₁=H; R₂=R₄=OMe; R₃=OH (55)R₁=R₄=OMe; R₂+R₃=OCH₂O (51)

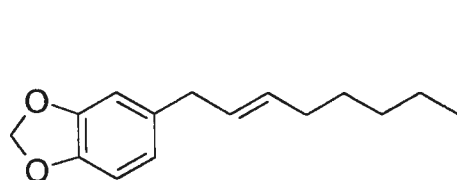
52



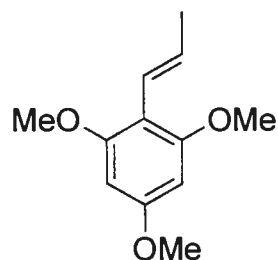
54



57



58



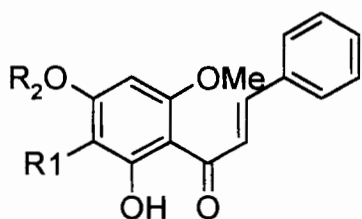
61

1.1.4. Flavonóides

Flavonóides pertencem a uma classe de metabólitos secundários de ocorrência relativamente restrita a poucas espécies de *Piper* (Tabela 4). Dentre as substâncias desta classe encontram-se as chalconas, as di-hidrochalconas, as flavonas e as flavononas (Parmar *et al.* 1997). A dimetil-flavona (67), presente em *P. caninum*, apresentou atividade anti-fúngica e anti-inflamatória (Ahmad *et al.* 1997).

Tabela 4: Flavonóides isolados de espécies de *Piper*

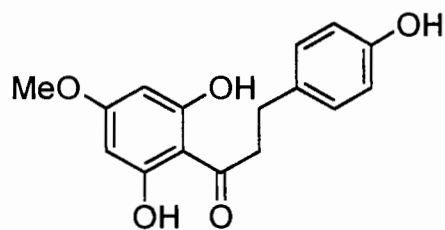
Composto	Planta	Referência
alpinetina (63)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
asebogenina (65)	<i>P. elongatum</i>	Masuoka <i>et al.</i> 1997
di-O-4',7-metil-apigenina (66)	<i>P. aduncum</i> <i>P. elongatum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Masuoka <i>et al.</i> 1997
O-4'-metil-di-hidro-chalcona (64)	<i>P. peepuloides</i> <i>P. manii</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998 Parmar <i>et al.</i> 1998
di-O-2',4'-metil-flavona (67)	<i>P. caninum</i>	Ahmad <i>et al.</i> 1997
flavokawina (68)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
tri-O-3',4',7-metil-luteolina (69)	<i>P. peepuloides</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
tri-O-3',4',6'-metil-chalcona (70)	<i>P. dilatatum</i>	Terreaux <i>et al.</i> 1998
tectochrisina (71)	<i>P. manii</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998



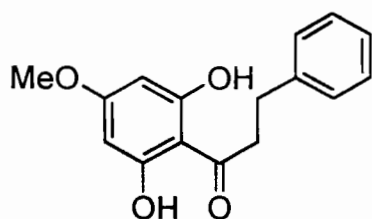
$R_1=H$; $R_2=CH_3$ (**68**)

$R_1=H$; $R_2=H$ (**63**)

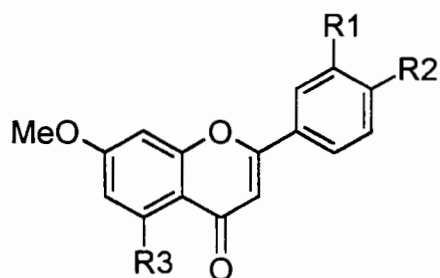
$R_1=OCH_3$; $R_2=CH_3$ (**70**)



66



65



$R_1=R_2=H$; $R_3=OMe$ (**67**)

$R_1=H$; $R_2=OMe$; $R_3=OH$ (**64**)

$R_1=R_2=H$; $R_3=OH$ (**71**)

$R_1=R_2=OMe$; $R_3=OH$ (**69**)

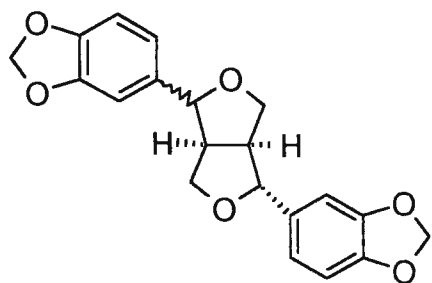
1.1.5. Lignanas e Neolignanas

Lignóides, principalmente as neolignanas, pertencem a uma classe de metabólitos secundários muito frequente em espécies de *Piper*. As neolignanas biciclooctânicas isoladas de *P. betle*, metilpiperbetol (92), pipertol (93), piperol A (94) e piperol B (95) apresentam atividade anti-PAF (Zeng *et al.* 1997). A neolignana asarisina (72) apresenta diversas atividades biológicas, tais como inseticida, tuberculostática e anti-inflamatória. Sua estrutura foi confirmada por análise de raios-x (Parmar *et al.* 1998). O conocarpano (73), que pertence à sub-classe de neolignanas di-hidrobenzofurânicas, é o principal constituinte de *P. regnellii* (Benevides *et al.* 1999), além de ter sido descrito em *P. aequale* (Maxwell *et al.* 1999) e *P. magnibacum* (Ahmad *et al.* 1998). Nestas três espécies são também descritos eupomatenóides (79), (80) e (81), que possuem esqueleto benzofurânico. As lignanas/neolignanas isoladas de espécies de *Piper* são descritas na Tabela 5.

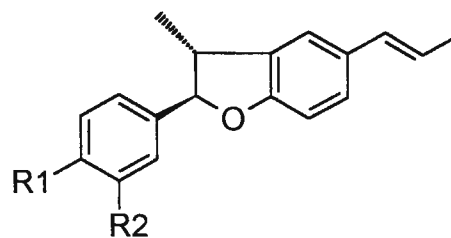
Tabela 5: Lignanas e Neolignanas isoladas de espécies de *Piper*

Composto	Planta	Referência
asarisina (72)	<i>P. brachystachyum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
	<i>P. longum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
conocarpano (73)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999
	<i>P. aequale</i>	Maxwell <i>et al.</i> 1999
	<i>P. magnibacum</i>	Ahmad <i>et al.</i> 1998
diaeudesmina (74)	<i>P. peepuloides</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
2,3-di-hidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)- 3-metil-5-(E)-propenilbenzofurano (75)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999
	<i>P. aequale</i>	Maxwell <i>et al.</i> 1999
decurrenal (76)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999
	<i>P. aequale</i>	Maxwell <i>et al.</i> 1999
<i>epi</i> -conocarpano (77)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999
<i>epi</i> -decurrenal (78)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999

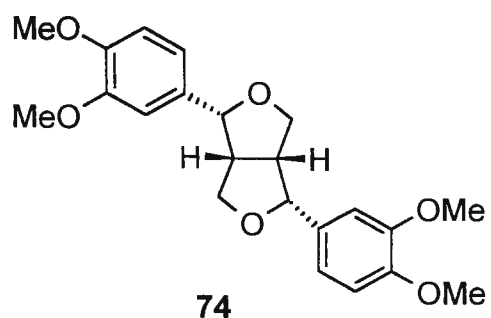
eupomatenóide-3 (79)	<i>P. regnellii</i> <i>P. aequale</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999 Maxwell <i>et al.</i> 1999
eupomatenóide-5 (80)	<i>P. regnellii</i> <i>P. aequale</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999 Maxwell <i>et al.</i> 1999
eupomatenóide-6 (81)	<i>P. regnellii</i> <i>P. aequale</i> <i>P. magnibacum</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999 Maxwell <i>et al.</i> 1999 Ahmad <i>et al.</i> 1998
galbegina (82)	<i>P. thomsoni</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
hookerinona-A (83)	<i>P. hookeri</i>	Pradhan <i>et al.</i> 1998
hookerinona-B (84)	<i>P. hookeri</i>	Pradhan <i>et al.</i> 1998
lancifolina-C (85)	<i>P. hookeri</i>	Pradhan <i>et al.</i> 1998
lancifolina-D (86)	<i>P. hookeri</i>	Pradhan <i>et al.</i> 1998
kadsurina-A (87)	<i>P. attenuatum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
kadsurina-B (88)	<i>P. attenuatum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
2-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(1,2-dihidroxiopropil)-3-metil-benzofurano (89)	<i>P. aequale</i>	Maxwell <i>et al.</i> 1999
2-(3,4-metilenodioxifenil)-3-metil-5-(2-oxopropil)benzofurano (90)	<i>P. aequale</i>	Maxwell <i>et al.</i> 1999
2-(4-metoxifenil)-3-metil-5-(E)-propenilbenzofurano (91)	<i>P. magnibacum</i>	Ahmad <i>et al.</i> 1998
metilpiperbetol (92)	<i>P. betle</i>	Zeng <i>et al.</i> 1997
piperbetol (93)	<i>P. betle</i>	Zeng <i>et al.</i> 1997
piperol-A (94)	<i>P. betle</i>	Zeng <i>et al.</i> 1997
piperol-B (95)	<i>P. betle</i>	Zeng <i>et al.</i> 1997
sesamina (96)	<i>P. brachystachyum</i>	Parmar <i>et al.</i> 1998
regnellina (97)	<i>P. regnellii</i>	Benevides <i>et al.</i> 1999



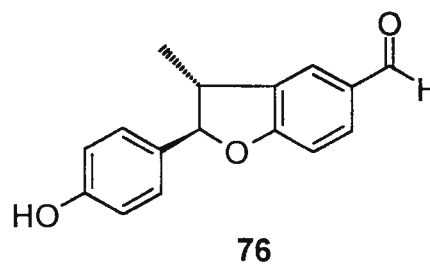
6 α (**96**)
6 β (**72**)



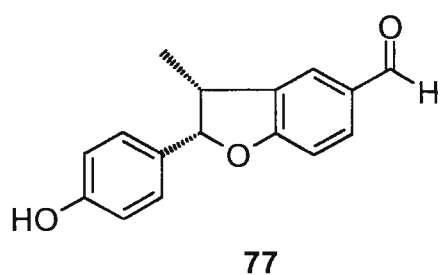
R₁ = OH; R₂ = H (**73**)
R₁+R₂ = OCH₂O (**97**)
R₁ = OH; R₂ = OMe (**75**)



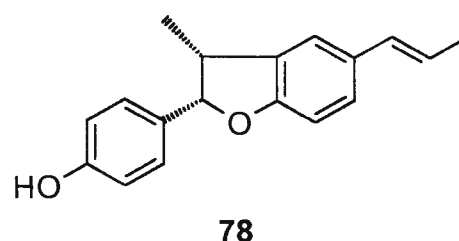
74



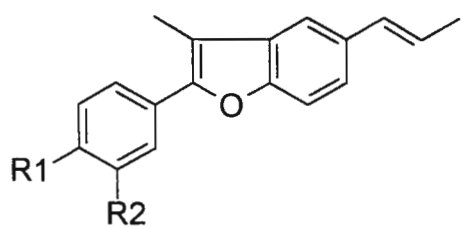
76



77



78

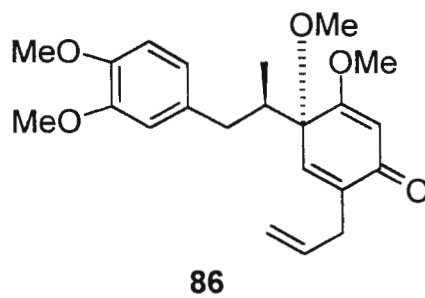
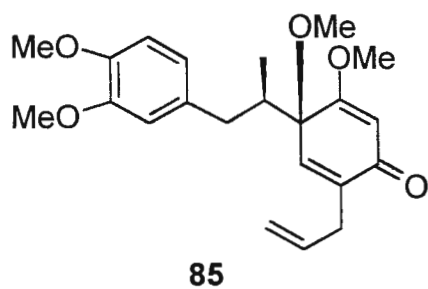
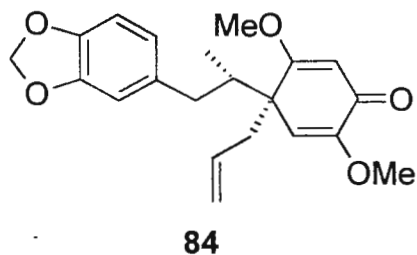
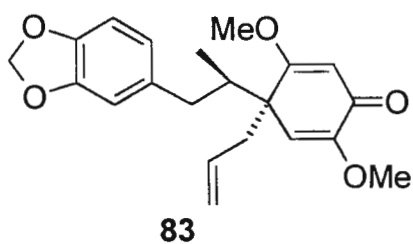
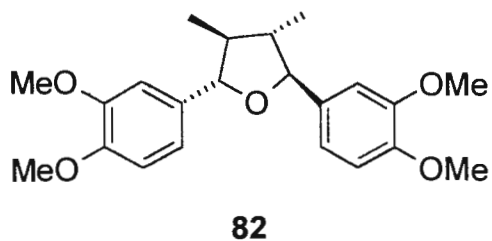


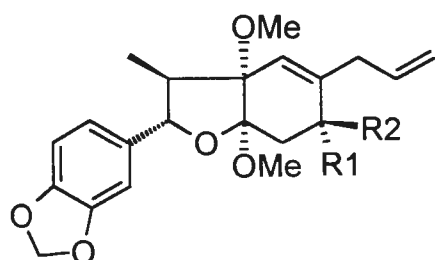
$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$ (**81**)

$R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$ (**79**)

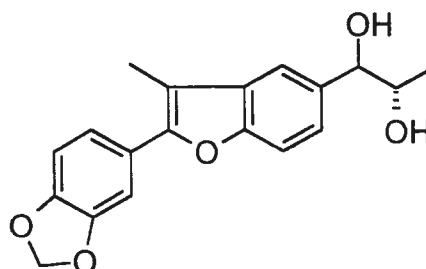
$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OMe}$ (**80**)

$R_1 = \text{OMe}; R_2 = \text{H}$ (**91**)

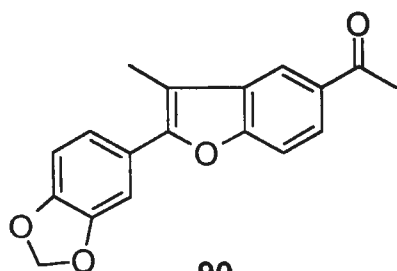




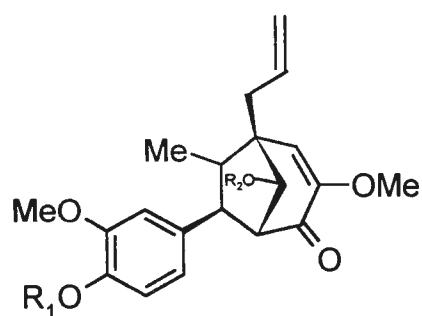
$R_1, R_2 = O$ (**87**)
 $R_1 = H, R_2 = OH$ (**88**)



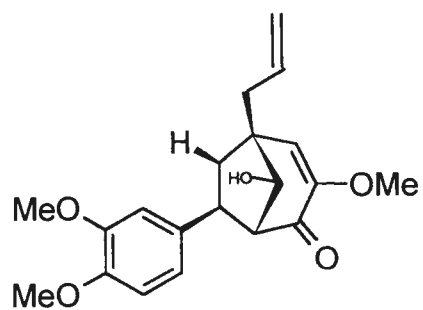
89



90



$R_1 = H; R_2 = Ac$ (**93**)
 $R_1 = Me; R_2 = Ac$ (**92**)
 $R_1 = Me; R_2 = H$ (**95**)



94

1.1.6. Terpenos

Os terpenos descritos em espécies de *Piper* são oriundos do óleo essencial. No trabalho de Martins *et al.* (1998) foi descrita a composição do óleo essencial de quatro espécies de *Piper*: *P. capense*, *P. guineense*, *P. nigrum* e *P. umbellatum*, sendo que os principais constituintes são os monoterpenos β -pineno (152), limoneno (144) e α -pineno (151). Mundina *et al.* (1998) também descreveram a composição do óleo essencial de três espécies de *Piper* que ocorrem no Panamá: *P. arboreum*, *P. fimbriatum* e *P. obliquum*, sendo que os principais constituintes identificados são δ -cadineno (106), β -cariofileno (113) e espatulenol (126), respectivamente. Em todos os trabalhos descritos, os componentes do óleo essencial foram identificados por técnicas de CG-EM e RMN-¹³C. Os constituintes desta classe de metabólitos secundários identificados em espécies de *Piper* são listados na Tabela 6.

Tabela 6: Terpenos isolados de espécies de *Piper*

Composto	Planta	Referência
acorenol (98)	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
allo-aromadendrano (99)	<i>P. capense</i>	Martins <i>et al.</i> 1998
	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
	<i>P. guineense</i>	Martins <i>et al.</i> 1998
	<i>P. umbellatum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998
aromadendrano (100)	<i>P. fimbriatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998
biciclogermacreno (101)	<i>P. arboreum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998
	<i>P. auritum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998
	<i>P. fimbriatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998
	<i>P. guineense</i>	Martins <i>et al.</i> 1998
β -bisaboleno (102)	<i>P. auritum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998
	<i>P. nigrum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998
	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997

α -bisabolol (103)	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997
bornileno (104)	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997
β -bouboneno (105)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. obliquum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998
cadina-1,4-dieno (106)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichadianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
γ -cadineno (107)	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
α -cadinol (108)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. pierrei</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997
<i>T</i> -cadinol (109)	<i>P. capeense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. umbelatum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Martins <i>et al.</i> 1998
canfeno (110)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capeense</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998

	<i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
cânfora (111)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. pierreii</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997
Δ^3 -careno (112)	<i>P. solmsianum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
β -cariofileno (113)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capeense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. pierreii</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
9- <i>epi</i> -cariofileno (114)	<i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. solmsianum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998
carotol (115)	<i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. pierreii</i> <i>P. solmsianum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Moreira <i>et al.</i> 1998
<i>p</i> -cimeno (116)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capeense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998

	<i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
cipereno (117)	<i>P. auritum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998
α -copaeno (118)	<i>P. arboreum</i> <i>P. capeense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. pierreii</i> <i>P. regnellii</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclercq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998
α -cubebeno (119)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capeense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. obliquum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998
cubenol (120)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. obliquum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998
epi-cubenol (121)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. fimbriulatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998

	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997
α -curcumeno (122)	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997
γ -curcumeno (123)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
β -elemeno (124)	<i>P. arboreum</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998
β -elemol (125)	<i>P. capense</i> <i>P. nigrum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
espatulenol (126)	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998
α -eudesmol (127)	<i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. nigrum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
β -eudesmol (128)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
α -farneseno (129)	<i>P. pierrei</i> <i>P. solmsianum</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997 Moreira <i>et al.</i> 1998
β -farneseno (130)	<i>P. arboreum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbellum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
α -felandreno (131)	<i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. guineense</i>	Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998

	<i>P. nigrum</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
β -felandreno (132)	<i>P. arboreum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
germacreno-A (133)	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
germacreno-B (134)	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. solmsianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998
germacreno-D (135)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998
globulol (136)	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. pierreii</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997
guaiol (137)	<i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. solmsianum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998
α -gurjuneno (138)	<i>P. arboreum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998

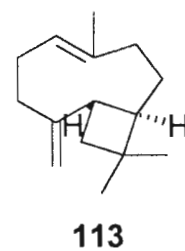
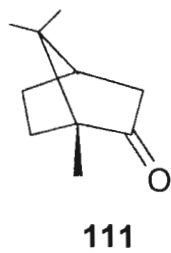
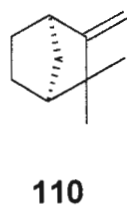
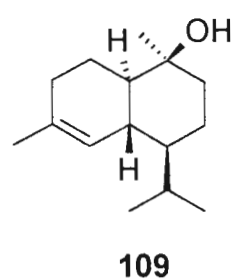
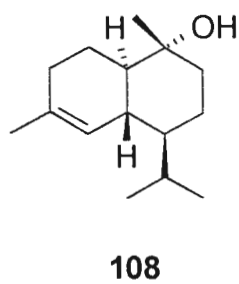
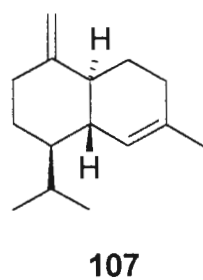
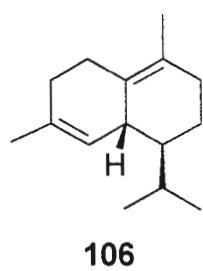
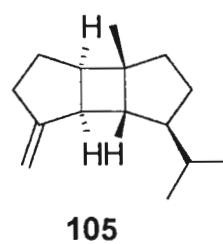
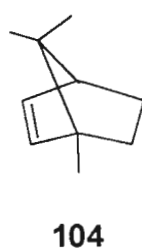
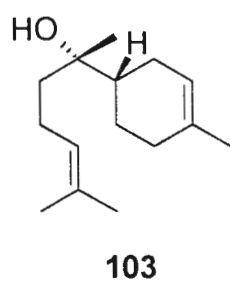
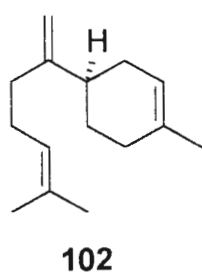
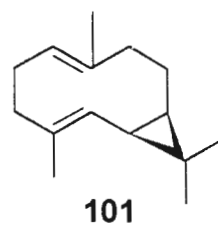
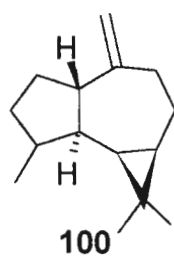
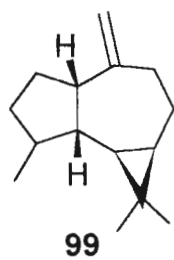
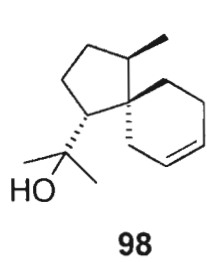
	<i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998
α -himacheleno (139)	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
hinesol (140)	<i>P. lhotzkyanum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
α -humuleno (141)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. pierreii</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclercq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
humuleno epóxido II (142)	<i>P. gaudichaudianum</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
isoterpinoleno (143)	<i>P. solmsianum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998
limoneno (144)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
linalool (145)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998

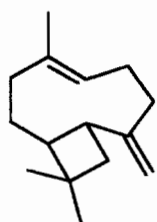
	<i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. umbelatum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
mirceno (146)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
α -muuroleno (147)	<i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. umbelatum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
γ -muuroleno (148)	<i>P. arboreum</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. solmsianum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Moreira <i>et al.</i> 1998
nerolidol (149)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998

	<i>P. lhotzkyanum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. umbelatum</i>	Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclercq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
ocimeno (150)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
α -pineno (151)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
β -pineno (152)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
sabineno (153)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998

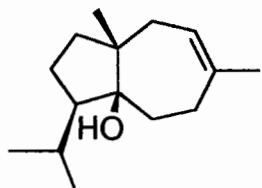
	<i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
α -santaneno (154)	<i>P. pierrei</i>	Leclerq <i>et al.</i> 1997
α -selineno (155)	<i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
β -selineno (156)	<i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. regnellii</i>	Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998
α -terpineno (157)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. solmsianum</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Moreira <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
terpineol (158)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. regnellii</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Andrade <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
terpin-4-ol (159)	<i>P. arboreum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. umbelatum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Martins <i>et al.</i> 1998
terpinoleno (160)	<i>P. arboreum</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998

	<i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. fimbriulatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. pierrei</i> <i>P. umbelatum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Mundina <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997 Martins <i>et al.</i> 1998
α -tujeno (161)	<i>P. auritum</i> <i>P. capense</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. umbelatum</i>	Pino <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998 Martins <i>et al.</i> 1998
valenceno (162)	<i>P. regnellii</i>	Andrade <i>et al.</i> 1998
viridiflorol (163)	<i>P. arboreum</i> <i>P. pierrei</i>	Mundina <i>et al.</i> 1998 Leclerq <i>et al.</i> 1997

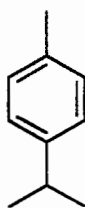




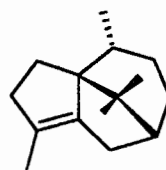
114



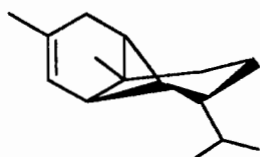
115



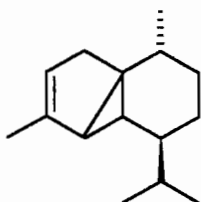
116



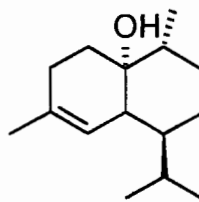
117



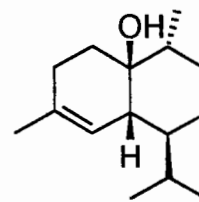
118



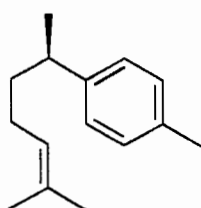
119



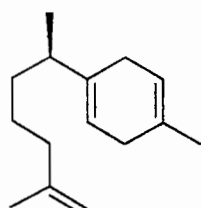
120



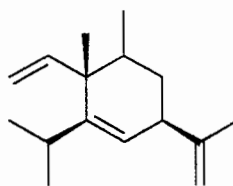
121



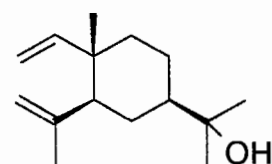
122



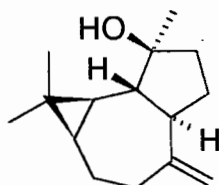
123



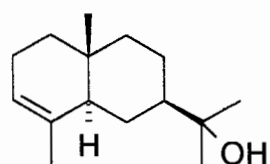
124



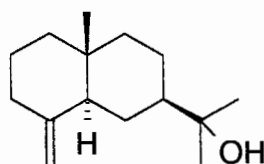
125



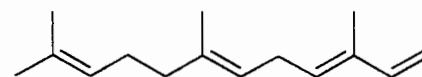
126



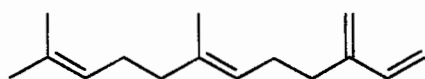
127



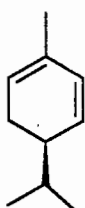
128



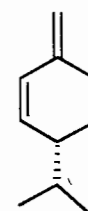
129



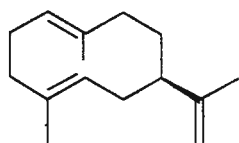
130



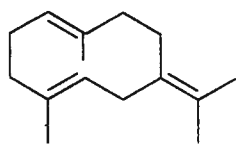
131



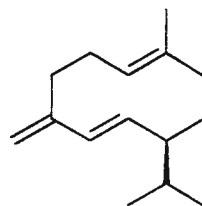
132



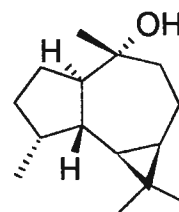
133



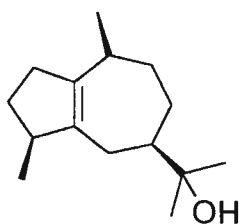
134



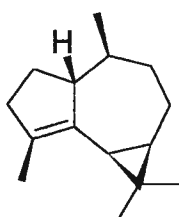
135



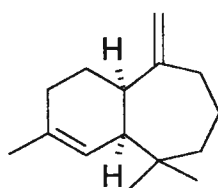
136



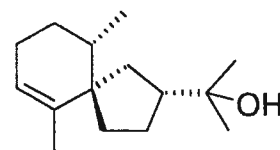
137



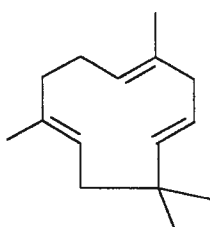
138



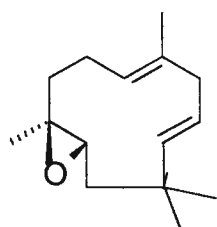
139



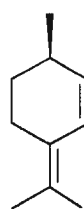
140



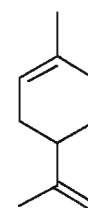
141



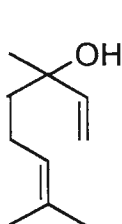
142



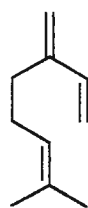
143



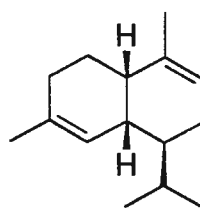
144



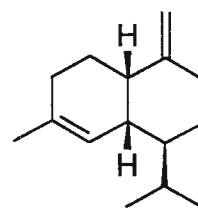
145



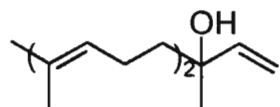
146



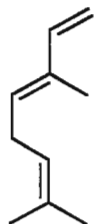
147



148



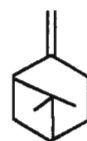
149



150



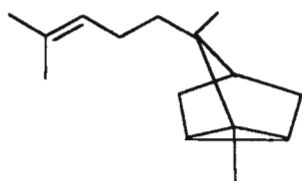
151



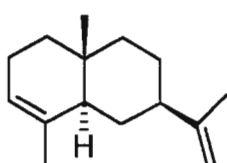
152



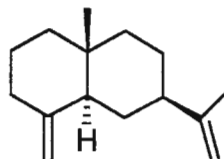
153



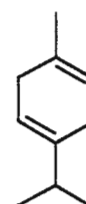
154



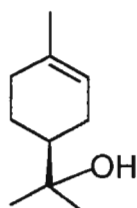
155



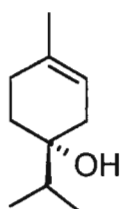
156



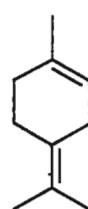
157



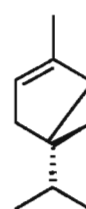
158



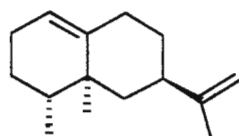
159



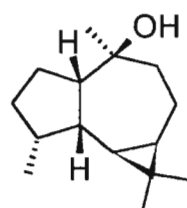
160



161



162



163

1.2. *Piper regnellii*

A espécie da família Piperaceae selecionada para o estudo biossintético foi a *Piper regnellii* (Miquell) Var. *regnellii*, um arbusto de aproximadamente 2 a 4 m de altura que ocorre na Mata Atlântica (Figura 4). As suas folhas são ovaladas-arredondadas inteiras, com aproximadamente 10 cm de comprimento e 16 a 20 cm de largura (Figura 5), possui inflorescências de 5 mm de espessura e de 5 a 8 mm de comprimento. A *P. regnellii* é cultivada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde foi coletada. A espécie foi identificada pelo Dr. Antônio Salatino (Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP). Uma exsicata está depositada no Herbário do Instituto de Biociências da USP (Benevides S/n.SPF112.6.84). Foram descritas para esta espécie fenilpropanóides e neolignan benzofurânicas em seus tecidos, sendo que quatro substâncias eram inéditas na literatura: regnellina, *epi*-conocarpano, *epi*-decurrenal e um éster metílico (Benevides *et al.* 1999). Outro trabalho *com P. regnellii* descreveu a composição do óleo essencial das folhas, onde foi observada a presença de β -cariofileno e limoneno como constituintes principais (Salatino, 1975). Um estudo posterior mostrou a estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores do óleo essencial (Silva *et al.* 1999).



Figura 4: Especimens de *P. regnellii* no IQ- USP

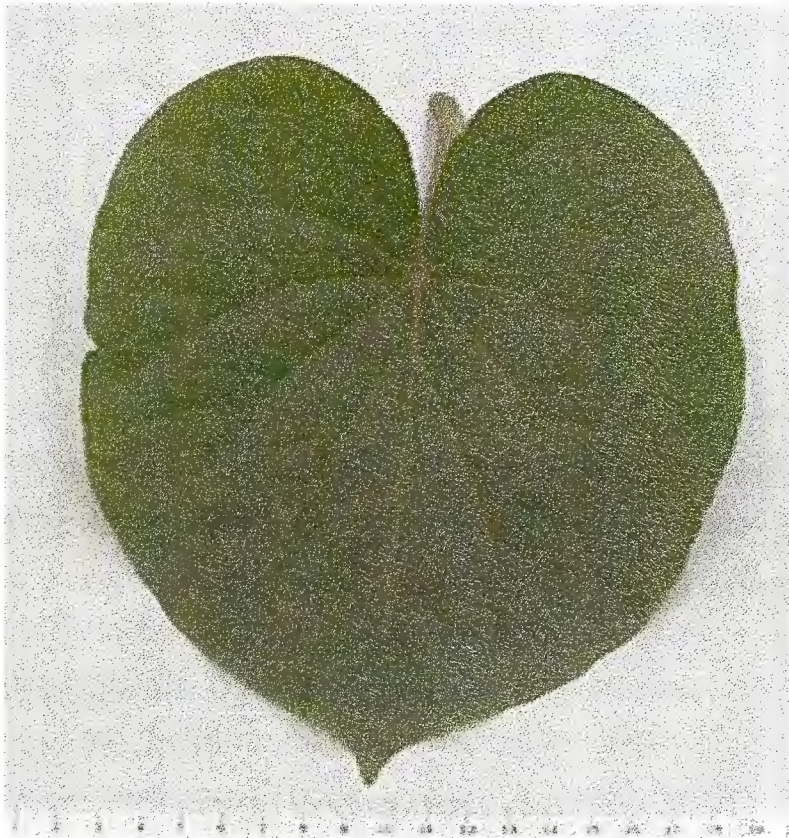


Figura 5: Folha de *P. regnelli*

1.3. Biossíntese de Lignóides

A via fenilpropanoídica requer como precursores os aminoácidos *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, que são os produtos finais da via do ácido chiquímico (Gross, 1975). A desaminação destes aminoácidos fornece respectivamente, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico. Estas reações são catalisadas pelas enzimas PAL (fenilalanina amônia liase) e TAL (tirosina amônia liase), respectivamente, sendo que esta última enzima é restrita a gramíneas (Neish, 1961). Após as reações de hidroxilação, metilação e redução há a formação dos fenilpropanóides, que são os precursores de ligninas, lignanas e neolignanas (Dewick, 1989).

A biossíntese de lignanas e neolignanas está relacionada com a produção de ligninas. Experimentos de incorporação demonstraram que os precursores das ligninas são álcoois cinamílicos hidroxilados, como álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 6). No entanto, as ligninas são formadas de maneira randômica, sendo iniciadas por lacases e peroxidases (Dewick, 1989). Em termos de biossíntese, ligninas e lignanas/neolignanas são estruturalmente relacionadas, mas diferem num aspecto importante, que é a atividade óptica demonstrada pela grande maioria das lignanas/neolignanas. Contudo, um certo grau de organização pode ser encontrado na formação das ligninas com a participação de polissacarídeos componentes da parede celular (Higuchi, 1990; Whetten e Sederoff, 1995). Este controle estereoquímico não seria possível através de uma reação catalisada por peroxidases inespecíficas, como aquelas envolvidas na biossíntese de ligninas (Umezawa *et al.* 1991).

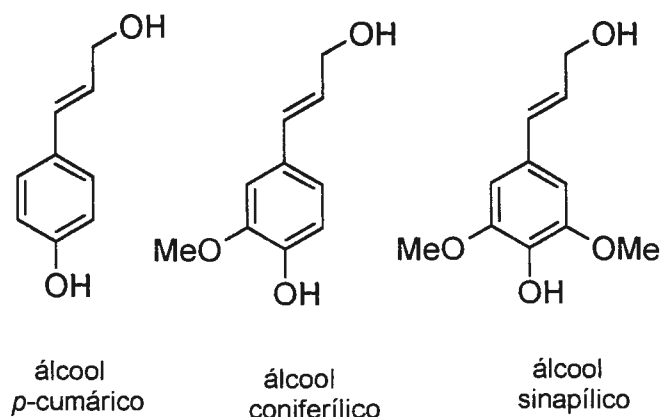


Figura 6: Estruturas dos álcoois cinamílicos

Na biossíntese de lignanas/neolignanas, o precursor básico é a fenilalanina, que é convertida pela fenilalanina amônia liase (PAL) em ácido cinâmico. Esta enzima é uma das enzimas do metabolismo secundário mais estudadas sob o ponto de vista bioquímico e fisiológico (Camm e Towers, 1977). Uma revisão sobre a enzima PAL que aborda a regulação de sua indução e suas funções no desenvolvimento da planta foi realizada por Jones (1984). A PAL está presente em praticamente todas as plantas superiores, tendo sido previamente purificada e suas propriedades determinadas (Koukol e Conn, 1961). Foi ainda estabelecido que a reação catalisada pela PAL não requer cofatores e o produto de reação pode ser medido espectrofotometricamente (Zucker, 1965). Após a formação do ácido cinâmico, este sofre uma série de etapas de hidroxilações e metilações mediadas por fenolases e O-metil-transferases, respectivamente (Lewis *et al.* 1990). Os ácidos cinâmicos substituídos são finalmente reduzidos a álcoois cinamílicos substituídos, tais como álcoois coniferílico e sinapílico, que são substratos para a formação de lignanas e ligninas. Na sequência da rota biossintética de lignanas e neolignanas, considera-se que a biossíntese envolva reações de acoplamento oxidativo de duas unidades de fenilpropanóides mediados por agentes oxidantes ou enzimas (Ward, 1997) e, embora o

mecanismo radicalar envolvido na dimerização de fenilpropanóides tenha sido sugerido há muito tempo (Erdtman, 1963), somente recentemente evidências experimentais para a formação de lignanas têm sido demonstradas. Desta maneira, em trabalhos com lignanas de *Podophyllum* verificou-se, através de experimentos de incorporação, que fenilalanina, ácido cinâmico e ácido ferúlico são precursores da podofilotoxina (Jackson e Dewick, 1984), uma lignana ariltetralínica com comprovada atividade anti-tumoral (Jackson e Dewick, 1985).

Nos primeiros estudos com espécies de *Forsythia*, Rahman *et al.* (1990) demonstraram que plântulas de *Forsythia intermedia* utilizam fenilalanina e ácido ferúlico como precursores da lignana dibenzilbutirolactônica arctigenina, e das furofurânicas filigenina e *epi*-pinoresinol. Na sequência dos estudos, Umezawa *et al.* (1990) demonstraram que ambos (+)-pinoresinol em *F. suspensa* e (-)-secoisolariciresinol em *F. intermedia* são formados via acoplamento direto de duas unidades de álcool coniferílico, controlado estereoquimicamente em uma reação catalisada por uma peroxidase típica na presença de H₂O₂. Posteriormente Umezawa *et al.* (1991) mostraram que tal controle estereoquímico não seria possível se a reação fosse catalisada por uma peroxidase típica. Desta maneira, ele demonstrou que a dimerização estereoespecífica de duas unidades de álcool coniferílico forma (-)-secoisolariciresinol e subsequente desidrogenação resulta em (-)-matairesinol em preparações enzimáticas de *F. intermedia*, numa reação que requer NADH e H₂O₂ como cofatores.

Peroxidases típicas estão presentes em tecidos vegetais e também fazem a dimerização de fenilpropanóides em lignanas. No entanto essas peroxidases não são específicas aos mesmos. No caso da peroxidase isolada e caracterizada por Frias *et al.* (1991) observou-se a dimerização de ácido ferúlico e ácido cafeico para formar lignanas.

Em outro estudo sobre a biossíntese de lignóides foi demonstrado que preparações enzimáticas de calos de *Larix leptolepis* foram capazes de formar (-)-pinoresinol com ee de 74%, a partir do álcool coniferílico (Nabeta *et al.* 1991). O acoplamento oxidativo estereosseletivo de álcool coniferílico também levou à formação da lignana furofurânica (+)-pinoresinol (Davin *et al.* 1992) e suas

subsequentes reduções a (+)-lariciresinol e (-)-secolariciresinol foram demonstradas em espécies de *Forsythia* (Katayama *et al.* 1992; Katayama *et al.* 1993; Dinkova-Kostova *et al.* 1996; Davin *et al.* 1997) (Figura 7). Posteriormente, foi estabelecida a especificidade da redução do (+)-pinoresinol a (-)-secolariciresinol via (+)-lariciresinol (Katayama *et al.* 1993) e a enzima responsável por esta redução foi investigada em detalhes através de sua clonagem e superexpressão em *E. coli* (Chu *et al.* 1993; Dinkova-Kostova *et al.* 1996).

O acoplamento oxidativo na formação de (+)-pinoresinol em *Magnolia Kobus* foi também estereoespecífico, mas demonstrou-se que os passos subsequentes de O-metilações, formando (+)-eudesmina, não são enantiosseletivos (Miyachi *et al.* 1998).

Na formação de grupos metilenodioxifenílicos em lignanas do gergelim, um alto nível de enantiosseletividade para (+)-pinoresinol, para produzir sequencialmente (+)-piperitol, (+)-sesamina e (+)-sesamolina, foi demonstrado quando uma mistura racêmica sintética de (+/-)-pinoresinol foi fornecido as sementes de *Sesamun indicum* (Kato *et al.* 1998; Jiao *et al.* 1998).

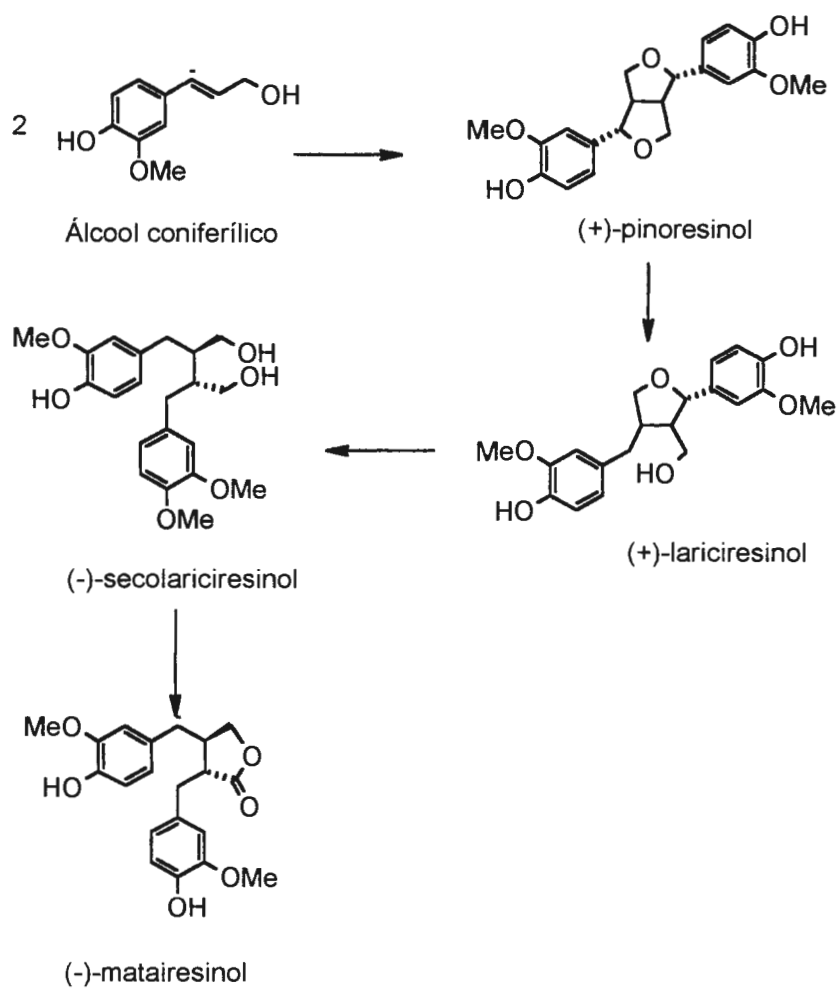
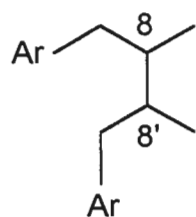


Figura 7: Biossíntese de lignanas de espécies de *Forsythia*

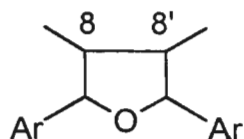
1.3.1. Lignanas/Neolignanas

A definição de lignanas/neolignanas tem sido ponto de controvérsia. O termo lignana foi primeiramente aplicado para dímeros de unidades de fenilpropanóides ligados pelos carbonos 8-8' da cadeia lateral (Haworth, 1942). O termo neolignana foi introduzido por Gottlieb em 1972 para designar dímeros de fenilpropanóides ligados por outras posições que não as 8-8' (Gottlieb, 1972). Porém em 1974, Gottlieb redefiniu o termo neolignana sob o ponto de vista quimiotaxonômico, onde neolignanas poderiam ser consideradas dímeros de propenil ou alilfenóis (Gottlieb, 1974; Gottlieb, 1978), pois estas possuíam ocorrência restrita a super-ordens primitivas (Magnoliales e Piperales) em comparação com as lignanas que são amplamente distribuídas em Angiospermae. Então, segundo Gottlieb, ácidos cinâmicos e álcoois cinâmicos seriam os precursores das lignanas, e havendo uma etapa a mais de redução levaria à formação de alil/propenilfenóis que seriam os precursores das neolignanas (Figura 10), ou seja as enzimas que levam à formação de neolignanas são específicas para alil/propenilfenóis, não dimerizando fenilpropanóides oxidados no C-9 (como no caso de ácidos e álcoois). No entanto, esta definição não tem sido totalmente aceita na literatura por falta de dados biossintéticos que comprovassem a especificidade dos sistemas enzimáticos. O que se aceita atualmente na literatura é a nomenclatura recomendada pela IUPAC (JCBN-25.3/1992), onde lignanas seriam dímeros formados por ligações 8-8' e neolignanas seriam dímeros formados por outras ligações diferentes das 8-8'. Na Figura 8 observa-se exemplos de neolignanas segundo a definição de Gottlieb e lignanas segundo a definição da IUPAC, e na Figura 9 observa-se exemplos de neolignanas segundo Gottlieb e segundo a IUPAC.

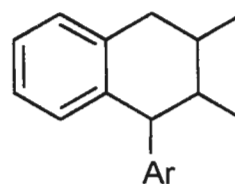
A maioria das plantas não expressa essas últimas etapas de redução ou as tiveram bloqueadas por algum processo evolutivo, sendo as neolignanas restritas a algumas famílias, entre as quais a Piperaceae.



Diarilbutânica



Tetraidrofurânica



Ariltetralínica

Figura 8: Exemplos de lignanas segundo IUPAC e neolignanas segundo Gottlieb

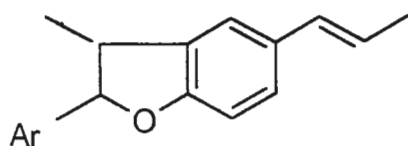
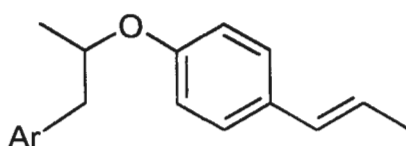
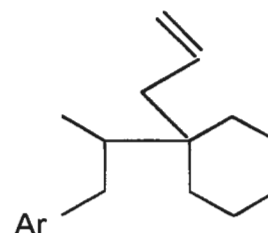
Di-hidrobenzofurânica
(8.3')b-ariloxiarilpropânica
(8.O.4')Arilcicloexilpropânica
(8.1')

Figura 9: Exemplos de neolignanas segundo Gottlieb, 1974 e segundo a IUPAC

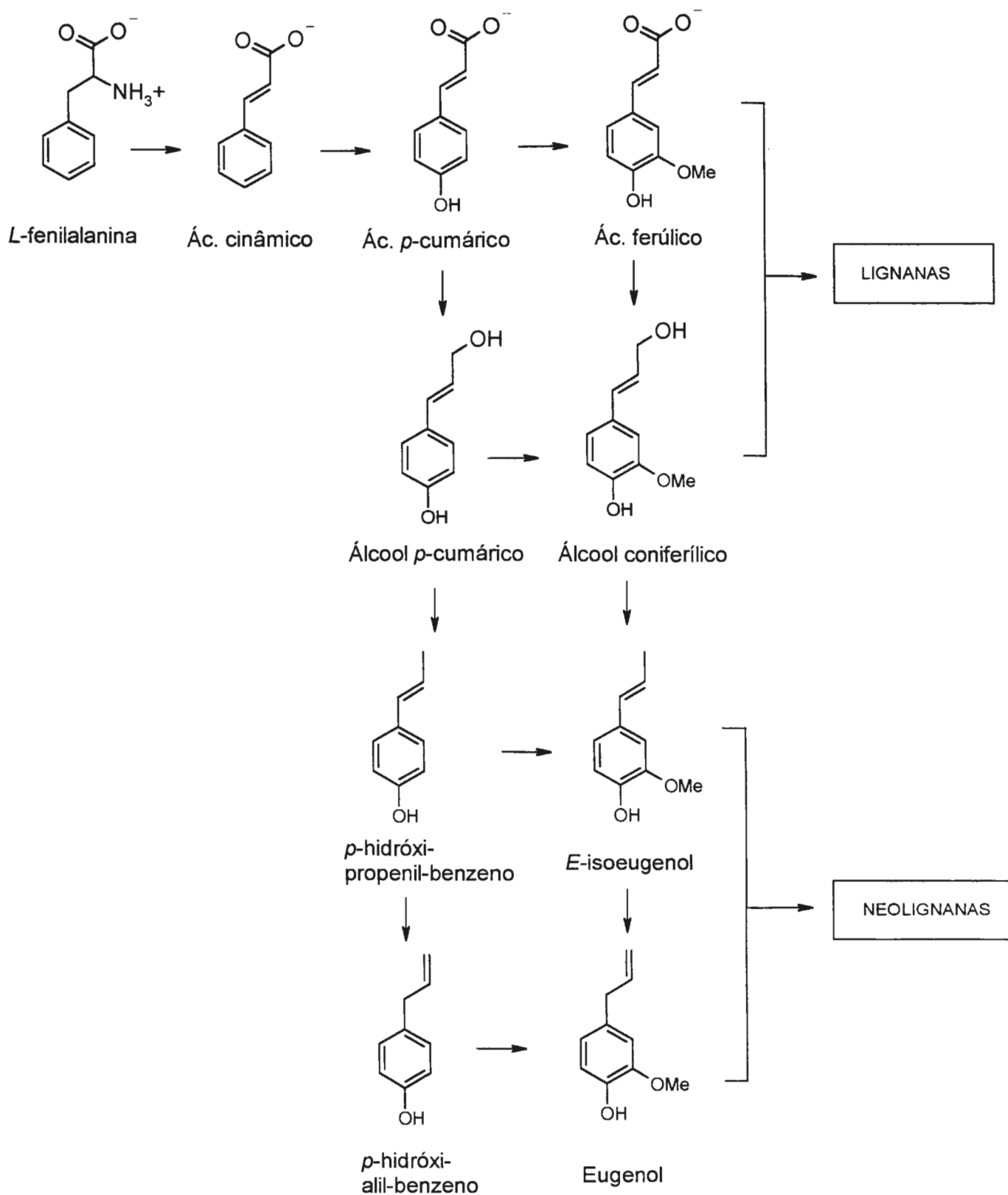


Figura 10: Etapas biossintéticas para a formação de lignanas/neolignanas

1.3.2. Neolignanas Benzofurânicas

As neolignanas benzofurânicas representam uma sub-classe de neolignanas com uma variedade de atividades biológicas incluindo anti-PAF (Pan *et al.* 1987), anti-fúngica (Nair e Burke, 1990; Grayer e Harborne, 1994) e inseticida (Boll *et al.* 1994; Chauret *et al.* 1996). Diversas neolignanas desta sub-classe têm sido descritas em espécies de Piperaceae (Jensen *et al.* 1993; Moreira *et al.* 1995; Parmar *et al.* 1997) incluindo *P. regnellii* (Benevides *et al.* 1999).

Na biossíntese das neolignanas presentes em *P. regnellii*, foi demonstrada a utilização de fenilalanina como precursor (Benevides, 1996), através de experimentos *in vivo* de incorporação de [U-¹⁴C] fenilalanina e detecção por CLAE e radiodetecção. Foi observada a incorporação de [U-¹⁴C] fenilalanina no conocarpano. Foram ainda observadas incorporações na neolignana regnellina, nos eupomatenóides 6 e 5 e também nos fenilpropanóides presentes em *P. regnellii*. As incorporações *in vivo* de L-fenilalanina nos fenilpropanóides e nas neolignanas benzofurânicas mostraram que todas as enzimas envolvidas na biossíntese dessas neolignanas são bem ativas em caules e folhas de *P. regnellii*.

A partir do perfil químico desta espécie, que mostra acúmulo de representantes pertencentes a um único tipo de esqueleto de neolignana, foi proposta uma rota biossintética, considerando-se que o principal constituinte de *P. regnellii* (conocarpano) é derivado do acoplamento oxidativo de duas unidades do fenilpropanóide *p*-hidróxi-propenil-benzeno. Este foi definido como um possível precursor do conocarpano (Figura 11). Nenhum dado na literatura da biossíntese desta classe de substâncias foi descrito até o momento.

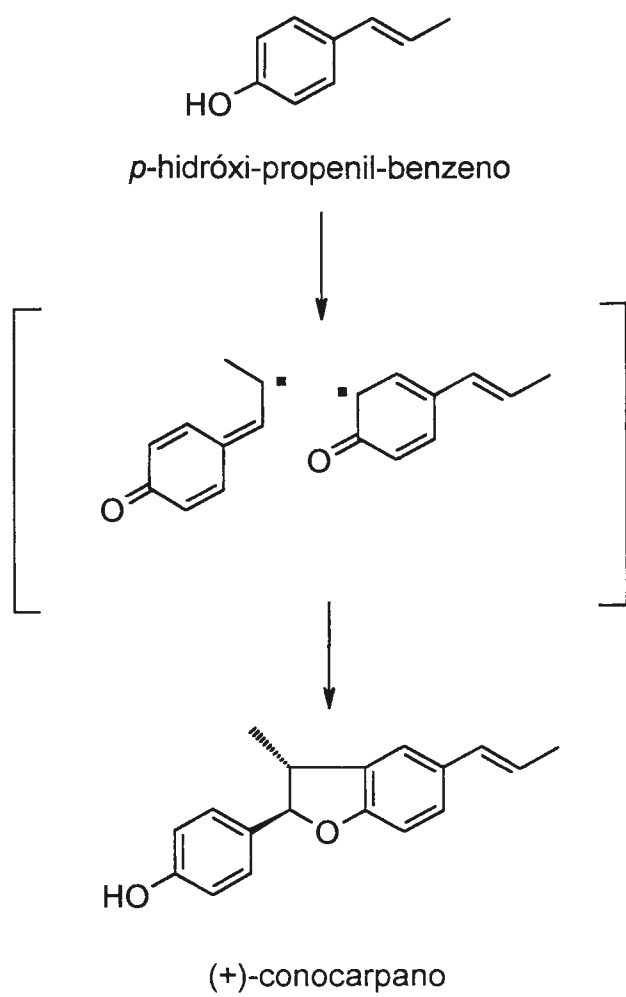


Figura 11: Possível precursor do conocarpano

2. Objetivos

A importância da investigação fitoquímica de espécies de Piperaceae reside no fato de que essa família é das mais primitivas entre os Angiospermae e o metabolismo secundário conduz à formação de muitos fenilpropanóides, lignanas e neolignanas. Isto a torna um modelo interessante para estudos biossintéticos, que constitui um dos objetivos de investigação do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ-USP.

Em um estudo prévio da espécie *P. regnellii* foi observado o acúmulo preferencial de fenilpropanóides, neolignanas diidrobenzofurânicas e benzofurânicas (Benevides, 1996; Benevides *et al.* 1999). Sugeriu-se então, que essas neolignanas fossem dímeros dos fenilpropanóides *p*-hidróxi-propenil-benzeno e *E*-isoeugenol, através de acoplamento oxidativo entre si e cruzado. Foi previamente demonstrado que essa espécie utiliza fenilalanina como precursor (Benevides, 1996). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a rota biossintética proposta, através da conversão dos monômeros *p*-hidróxi-propenil-benzeno e *E*-isoeugenol nas neolignanas presentes nas folhas de *P. regnellii*. Foi investigada também a especificidade do sistema enzimático frente a outros possíveis precursores (álcool e ácido *p*-cumárico), e também a enantiosseletividade da enzima responsável pela dimerização do *p*-hidróxi-propenil-benzeno para formar o conocarpano.

3. *Materiais e Métodos*

3.1. Equipamentos e Materiais Utilizados

- O material vegetal foi moído em moinho de facas Marconi modelo TE840.
- O grau de pureza dos solventes utilizados variou de acordo com a finalidade. Para extrações, partições e sistemas cromatográficos utilizou-se solventes de grau P. A. da Merck, Vetec e Synth, previamente submetidos à destilação fracionada. Para análises em CG utilizou-se solventes grau cromatográfico da Merck.
- O fracionamento cromatográfico em coluna (CC) foi realizado empregando-se sílica-gel 60 (0,063 - 0,200 mm) (Merck).
- Para as cromatografias planar comparativa (CPC) e planar preparativa (CPP) foram utilizadas sílica-gel GF₂₅₄ e sílica-gel 60 PF₂₅₄, respectivamente, ambas da Merck. As visualizações das substâncias foram efetuadas com irradiações na região do ultra-violeta (254 nm) e soluções de sulfato cérico, seguidas por aquecimento a 70°C por 15 minutos.
- A recuperação destas substâncias após separação por CCP foi realizada por extração com AcOEt.
- Para a cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados os seguintes recursos: cromatógrafo líquido analítico Hewlett-Packard mod.1050, equipado com bomba quaternária e detector espectrofotométrico do tipo multicanal na região do UV, munido de injetor automático Shimadzu SIL-9A. Cromatógrafo líquido analítico/semipreparativo Shimadzu mod. LC-10, equipado com bomba ternária e detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável, munido de injetor automático SIL-10A.
- As colunas para CLAE utilizadas foram: fase reversa - RP-18 Supelco (5µm d.i., 4x250 mm), C-18 Alltech–econosil (5 µm d.i., 250x4 mm); fase normal -Sílica

Alltech (5 μm d.i., 250x4 mm); fase quiral - Chiracel OD (5 μm , d. i. 250x4.6 mm).

- Os espectros de RMN- ^1H foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300 (Instituto de Química - USP), operando a 300 MHz. O solvente utilizado foi deuteroclorofórmio (CDCl_3) da Aldrich. Os sinais de absorção do clorofórmio e/ou do tetrametilsilano (TMS) foram utilizados como padrão de referência interna.
- Os espectros de RMN- ^{13}C (PND) foram registrados no espectrômetro Bruker AC-200 (Instituto de Química - USP), operando a 50 MHz. O deuteroclorofórmio foi utilizado como solvente e como padrão de referência interna.
- O critério de pureza adotado foi baseado na obtenção de uma única mancha em CPC, em diferentes sistemas de eluentes, por CG, e pela análise dos espectros de RMN- ^1H .
- As análises em CG foram realizadas em cromatógrafo HP5890 series II munido de coluna capilar megabore (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm), 5% fenil em 95% metil-silicone, detector de ionização de chama e injetor automático. O gás de arraste utilizado foi o hélio.
- Os espectros de IV, foram registrados em aparelhos FT-IR 1750 (Nicolet e Perkin-Elmer).
- Os espectros de massas foram registrados em espectrofotômetro de massas de baixa e alta resolução (Hewlett-Packard e Finnigan).
- Os espectros de massas operando no modo electonspray foram registrados em espectrômetro de massa Micromass mod. Plattform II.
- Para as cromatografias de proteínas, foram utilizadas colunas descartáveis pré-empacotadas PD-10 (sephadex G-25 M); bomba peristáltica P-1; suporte para colunas XK 16 com o respectivo adaptador, misturador de gradiente GM-1 e coletor de frações RediFRAC da Pharmacia.
- A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o kit-Bradford (Bio-Rad), composto por um corante (Comassie Brilliant-Blue G-250), uma solução de albumina sérica bovina e cubetas de poliestireno, para as leituras em 595 nm. Utilizou-se também o

método de Peterson (Peterson, 1979), empregando-se um kit da Bio-Rad, constituído por uma solução de tartarato cúprico, reagente de Folin, reagente S e cubetas de poliestireno.

3.2. Purificação dos padrões de *P. regnellii*

As substâncias isoladas previamente por Benevides (Benevides, 1996) degradaram-se, por serem tratadas de substâncias fenólicas. Essas substâncias foram novamente purificadas para serem utilizadas como referências para a identificação das substâncias presentes no extrato bruto de folhas de *P. regnellii* analisados numa condição pré-estabelecida em CLAE e CG.

Obtenção do extrato de raízes de *P. regnellii*: Raízes de *P. regnellii* (57,7 g) foram moídas e extraídas por três vezes com 700 mL de AcOEt em banho de ultrassom (30 min), o solvente foi concentrado em rota-evaporador, fornecendo 4,4 g de extrato bruto. A análise do perfil em CLAE da composição de metabólitos secundários dos extratos de folhas, caules e raízes mostraram-se análogos, no entanto optou-se por trabalhar com o extrato de raízes, pelo fato de não haver interferentes como clorofila presentes nas folhas.

Fracionamento do extrato de raízes de *P. regnellii*: O extrato bruto obtido (4,4 g) foi solubilizado em 10 mL de AcOEt e misturado com 16 g de sílica. O solvente foi então evaporado e a pastilha obtida, foi submetida à cromatografia em coluna (50 cm, d. i. 5 cm), utilizando-se 200 g de SiO₂ 60-G. O sistema eluente utilizado foi hexano-AcOEt em ordem crescente de polaridade e posteriormente MeOH. Após a eluição foram obtidas 45 frações de 50 mL cada, que após a análise por cromatografia planar comparativa foram reunidas (designadas como CP-1 a CP-16) conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Fracionamento cromatográfico do extrato de raízes de *P. regnellii*

Fração	massa (mg)
CP-1 (1 - 3)	1,4
CP-2 (4 - 6)	152,5
CP-3 (7)	20,0
CP-4 (8)	53,3
CP-5 (9 - 11)	240,5
CP-6 (12-14)	93,3
CP-7 (15 - 16)	21,6
CP-8 (17 - 18)	17,9
CP-9 (19 -20)	25,6
CP-10 (22 - 25)	100,8
CP-11 (26 - 28)	300,0
CP-12 (29 - 31)	361,5
CP-13 (32 - 33)	145,2
CP-14 (34 - 37)	365,9
CP-15 (38 - 39)	480,5
CP-16 (40 - 45)	620,0

Obtenção dos padrões de *P. regnellii*: Foram trabalhadas as frações CP-6, CP-7, CP-10, CP-13, onde se encontravam concentrados os fenilpropanóides (designados como FP-1 a FP-3), as neolignanas (designadas como Ne-1 a Ne-7) e as dinor-neolignanas (designadas como DN-1 a DN-3). O fracionamento cromatográfico pode ser observado no Figura 12.

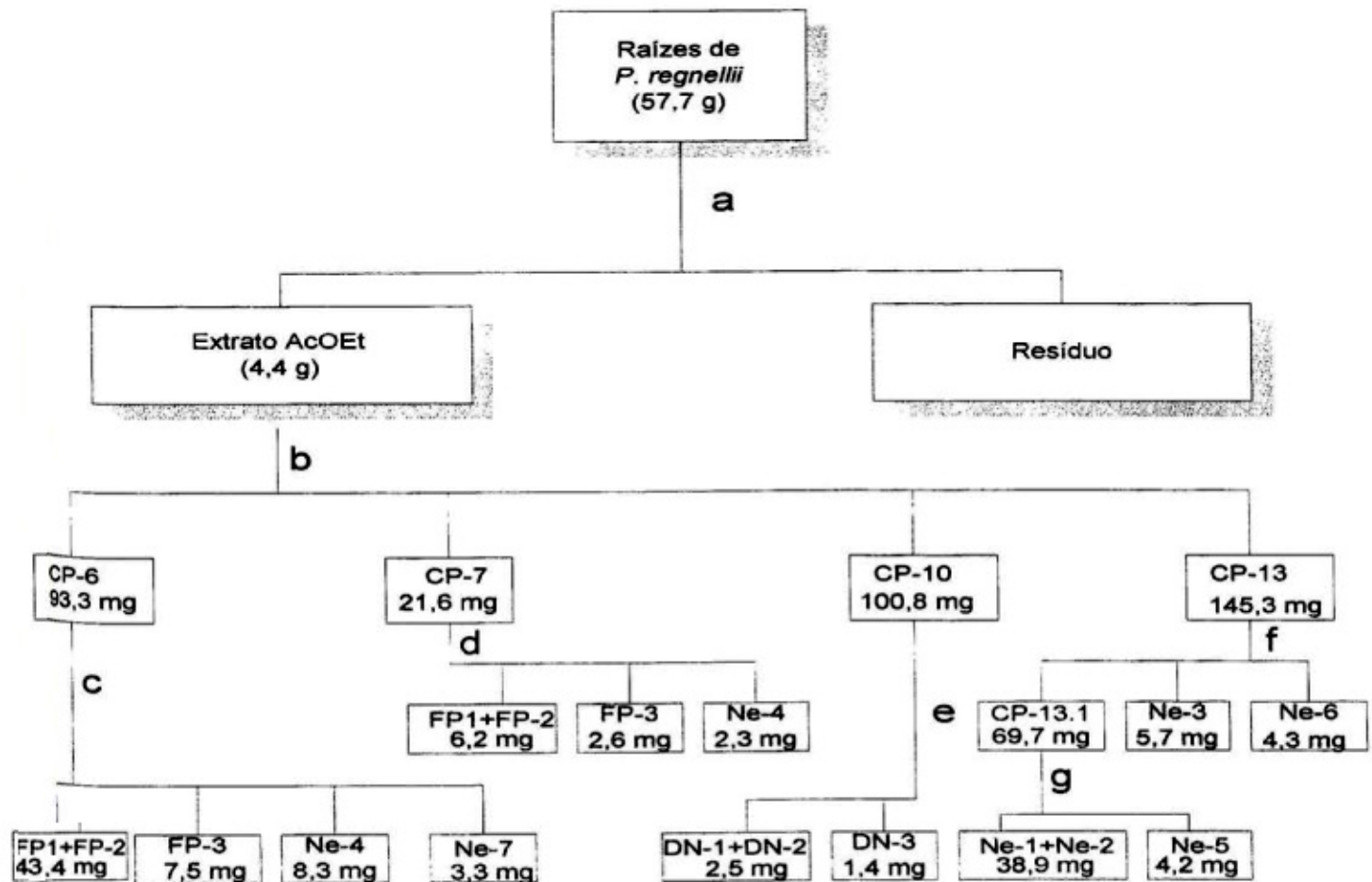


Figura 12: Esquema de Fracionamento cromatográfico de raízes de *P. regnellii*

- (a) Extração com 700 mL de AcOEt (3X), filtração.
- (b) CC filtrante de sílica-gel (200 g), eluída com hexano:AcOEt em ordem crescente de polaridade; 45 frações recolhidas de 50 mL cada uma.
- (c) CPP, eluída com Bz:acetona 99,5:0,5 por 2X .
- (d) CPP, eluída com Bz:acetona 99,5:0,5 por 2X.
- (e) CPP, eluída com Bz:acetona 99,5:0,5 por 2X.
- (f) CPP, eluída com Bz:acetona 99,5:0,5.
- (g) CPP, eluída com hexano:AcOEt 8:2.

Verificação do grau de pureza das substâncias por CG: Foram feitas soluções dos padrões purificados de raízes de *P. regnellii* (1 mg/mL) em MeOH, e estes foram analisados por CG. A condição estabelecida foi:

-Temp. injetor = 250°C

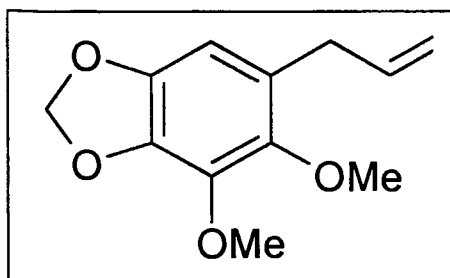
-Temp. detector = 350°C

-Gradiente: 100°C a 280°C (10°C/min)

-Volume de injeção: 1 µL

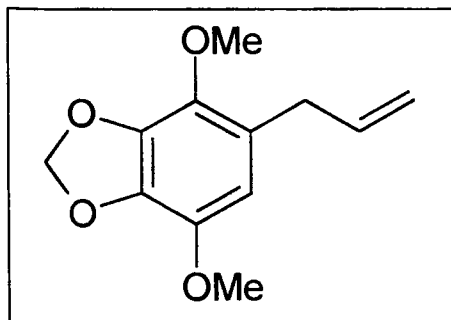
3.3. Dados Físicos das Substâncias isoladas

- Fenilpropanóides



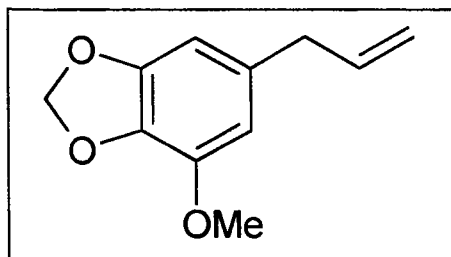
FP-1: 2,3-dimetoxi-4,5-metilenodioxo-alil-benzeno
(dilapiol)

RMN-¹H: Figura 13 , p. 66 ; Tabela 10 , p. 102.



FP-2: 2,5-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-alil-benzeno
(apiol)

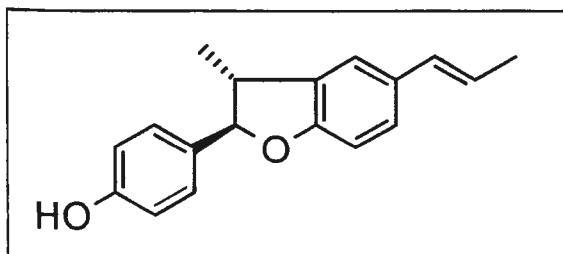
RMN-¹H: Figura 13 , p.66 ; Tabela 10 , p. 102.



FP-3: 3-metoxi-4,5-metilenodioxo-alil-benzeno
(miristicina)

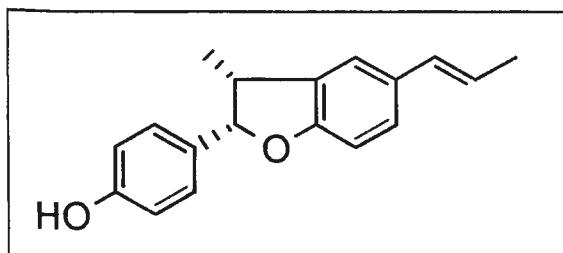
RMN-¹H: Figura 14, p. 67, Tabela 10, p. 102.

- Neolignanas



Ne-1: (7*R*, 8*R*)-4-hidroxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'[*E*]-eno (conocarpano)

RMN-¹H: Figura 15, p. 68 ; Tabela 11, p. 103.

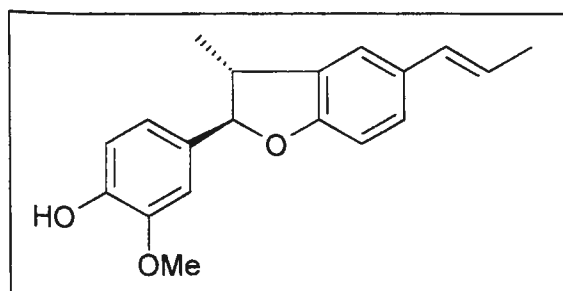


Ne-2: (7*S*, 8*R*)-4-hidroxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'[*E*]-eno (*epi*-conocarpano)

Sólido branco. $[\alpha]_D^{21} -33,3^\circ$ (MeOH, c 0,03)

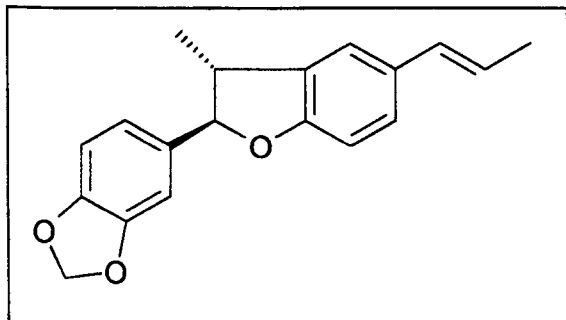
RMN-¹H: Figura 15, p.68 ; Tabela 11 , p. 103.

CD (MeOH, c 0,003): $[\theta]_{211} - 4649$, $[\theta]_{218} 0$, $[\theta]_{229}^{\max} + 14390$, $[\theta]_{235} 0$, $[\theta]_{243}^{\max} - 9923$, $[\theta]_{275} 0$, $[\theta]_{282} + 2658$. IR $\nu_{\max}^{\text{film}} \text{cm}^{-1}$: 3542, 2964, 1614, 1015. MS m/z (rel. int.): 266 [M]⁺ (100), 251(31), 223(17), 171(12), 131(26), 91(20), 77(17).



Ne-3: (7*R*, 8*R*)-4-hidroxi-3-metoxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'[*E*]-eno

RMN-¹H: Figura 16, p. 69; Tabela 11, p. 103 .



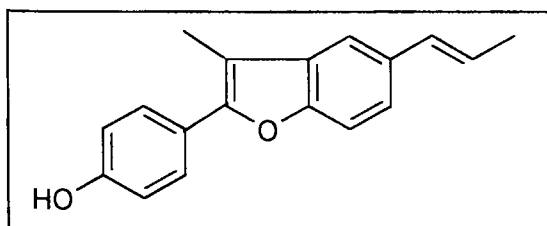
Ne-4: (7*R*,8*R*)-3,4-metilenodioxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'[*E*]-eno (regnellina)

Sólido amorfo. $[\alpha]_D^{21} + 85,5^\circ$ (MeOH, *c* 0,06). RMN-¹H: Figura 17, p. 70; Tabela 11, p. 103.

CD (MeOH, *c* 0,003): $[\theta]_{214} + 6270$, $[\theta]_{215} 0$,

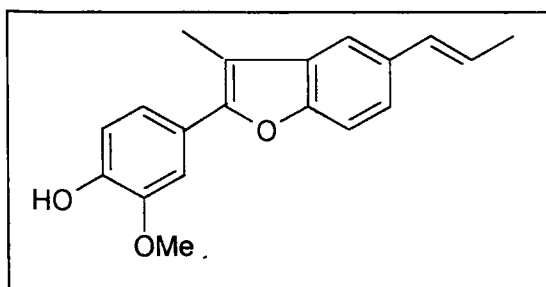
$[\theta]_{219}^{\max} - 7667$, $[\theta]_{229} 0$, $[\theta]_{260}^{\max} + 15770$, $[\theta]_{294}^{\text{st}} + 3760$. IR $\nu_{\max}^{\text{film}} \text{cm}^{-1}$: 3445, 1488, 1122.

EM *m/z* (int. rel.): 294 [M]⁺ (90), 282(100), 265(11), 147(20), 135(55), 103(10), 77(18).



Ne-5: 4-hidróxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7[z],7'[*E*]-dieno (eupomatenóide-6)

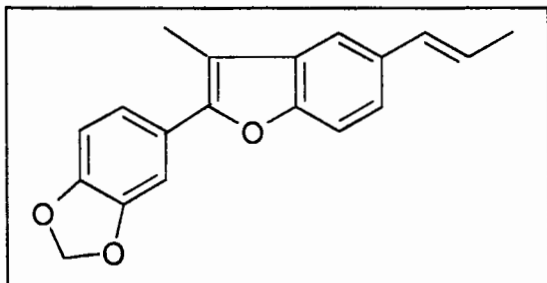
RMN-¹H: Tabela 12, p. 104.



Ne-6: 4-hidróxi-3-metoxi-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7[z],7'[*E*]-eno

(eupomatenóide-5)

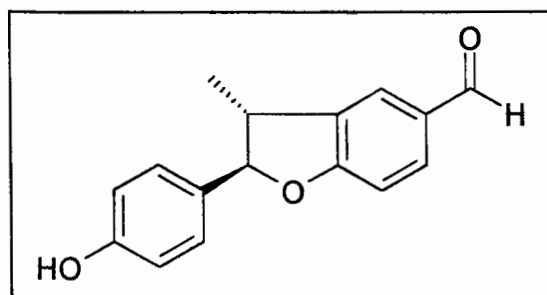
RMN-¹H: Figura 18, p. 71; Tabela 12, p. 104.



Ne-7: 3,4-metilenodioxo-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7[z],7'[E]-dieno

(eupomatenóide-3)

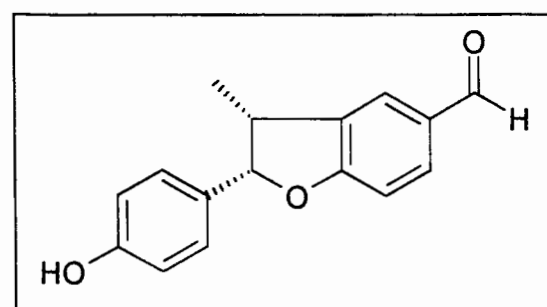
RMN-¹H: Figura 19, p. 72 ; Tabela 12, p. 104.



DN-1: (7*R*,8*R*)-4-hidróxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'-aldeído

(decurrenal)

RMN-¹H: Figura 20, p. 73; Tabela 13, p. 105.



DN-2: (7*S*,8*R*)-4-hidróxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'-aldeído

(*epi*-decurrenal). Sólido amarelo.

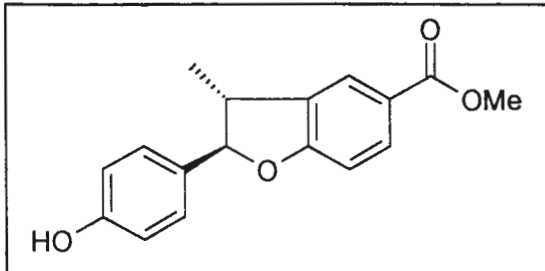
RMN-¹H: Figura 20, p. 73 ; Tabela 13, p. 105.

$[\alpha]_D^{21}$ -29,1° (MeOH, c 0,10). CD (MeOH, c

0,003): $[\theta]_{220}^-$ -10458, $[\theta]_{228}^0$, $[\theta]_{234}^{\max}$ +29099, $[\theta]_{250}^0$, $[\theta]_{275}^-$ -18553, $[\theta]_{296}^{\text{sh}}$ -11096. IV

ν_{\max}^{film} cm⁻¹: 3410, 2950, 1689, 1594, 1251, 1120. MS *m/z* (rel. int.): 254 ($[M]^+$, 45),

239 (10), 225 (11), 149 (100), 107 (47).



DN-3: (7*R*,8*R*)-4-hidróxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'-ato de metila
Óleo amarelo.

RMN-¹H: Tabela 13, p. 105.

$[\alpha]_D^{21} +30,1^\circ$ (MeOH, c 0,08). CD (MeOH, c

0,003): $[\theta]_{214} +3824$, $[\theta]_{217} 0$, $[\theta]_{222}^{max} -2754$, $[\theta]_{229} 0$, $[\theta]_{242}^{max} +9582$, $[\theta]_{263}^{sh} +2600$. IV

$\nu_{max}^{film} \text{ cm}^{-1}$: 3562, 2873, 1720, 1519.

3.4. Espectros obtenidos

Current Data Parameters
 NAME proton1
 EXPNO 7
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 9/12/17
 Time 9:33
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13
 PULPROG zg30
 TO 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 128
 DS 0
 SWH 3140.704 Hz
 FWHM 0.055847 Hz
 AQ 5.2167156 sec
 RG 128
 DM 159.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 11.20 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 300.1313001 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300.1300282 MHz
 WDN EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1P 9.000 ppm
 F1 2701.17 Hz
 F2P 0.500 ppm
 F2 -150.07 Hz
 PPMCN 0.43182 ppm/cm
 HZCN 129.60161 Hz/cm

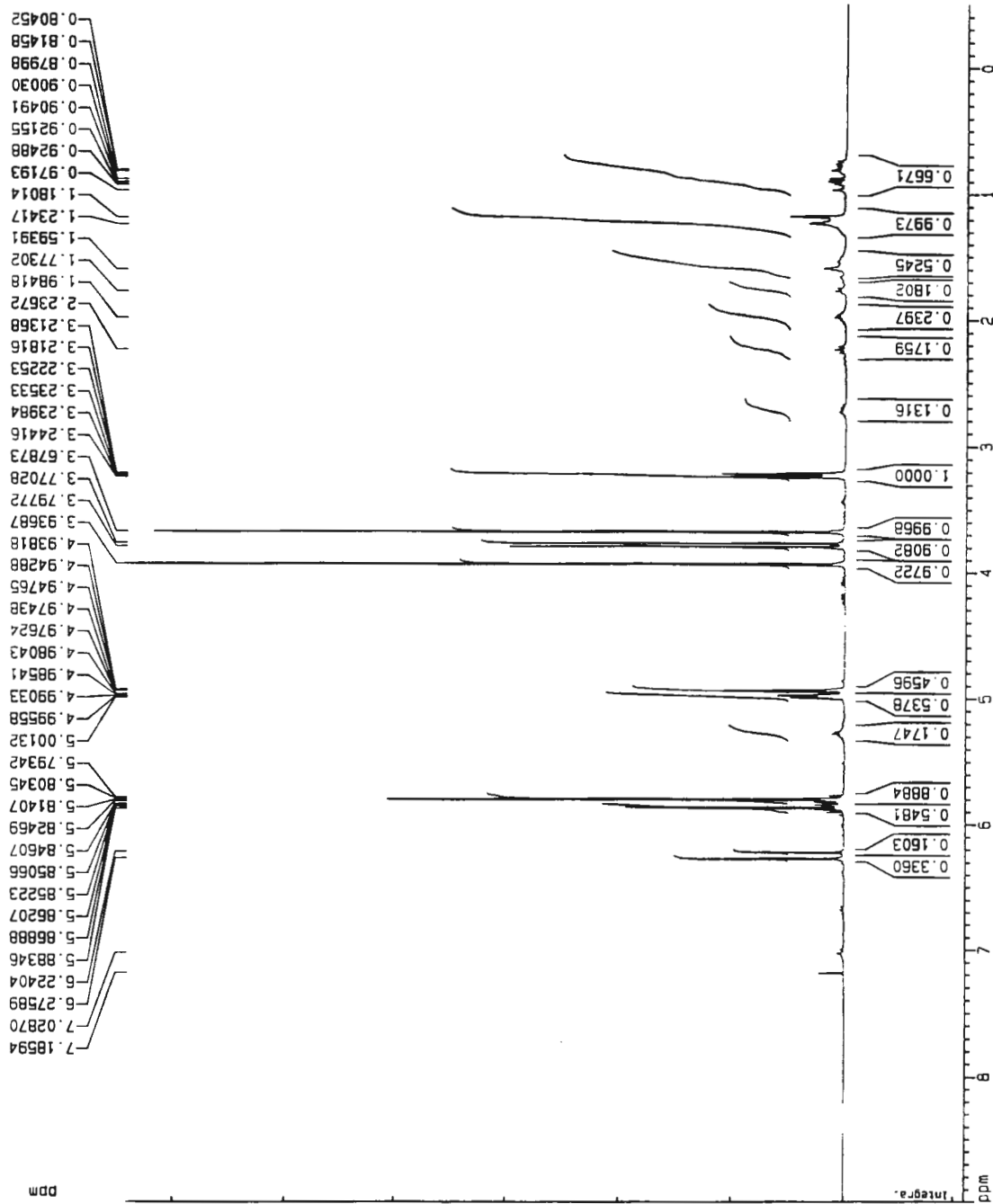


Figura 13: RMN-1H (300 MHz, CDCl₃) de FP-1+FP-2

Current Data Parameters
 NAME protom1
 EXPNO 8
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 971217
 Time 10.04
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dnl1 13
 PULPROG zg30
 TO 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 128
 DS 0
 SWH 3698.225 Hz
 FIDHS 0.112861 Hz
 AQ 4.4302835 sec
 RG 574.7
 CW 135.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 P1 11.20 usec
 DE 6.00 usec
 SFO1 300 1311170 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300.1300268 MHz
 NCH EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

10 NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1P 9.000 ppm
 F1 2701.17 Hz
 F2P 0.500 ppm
 F2 -150.07 Hz
 PPMCM 0.43182 ppm/cm
 HZCM 129.60161 Hz/cm

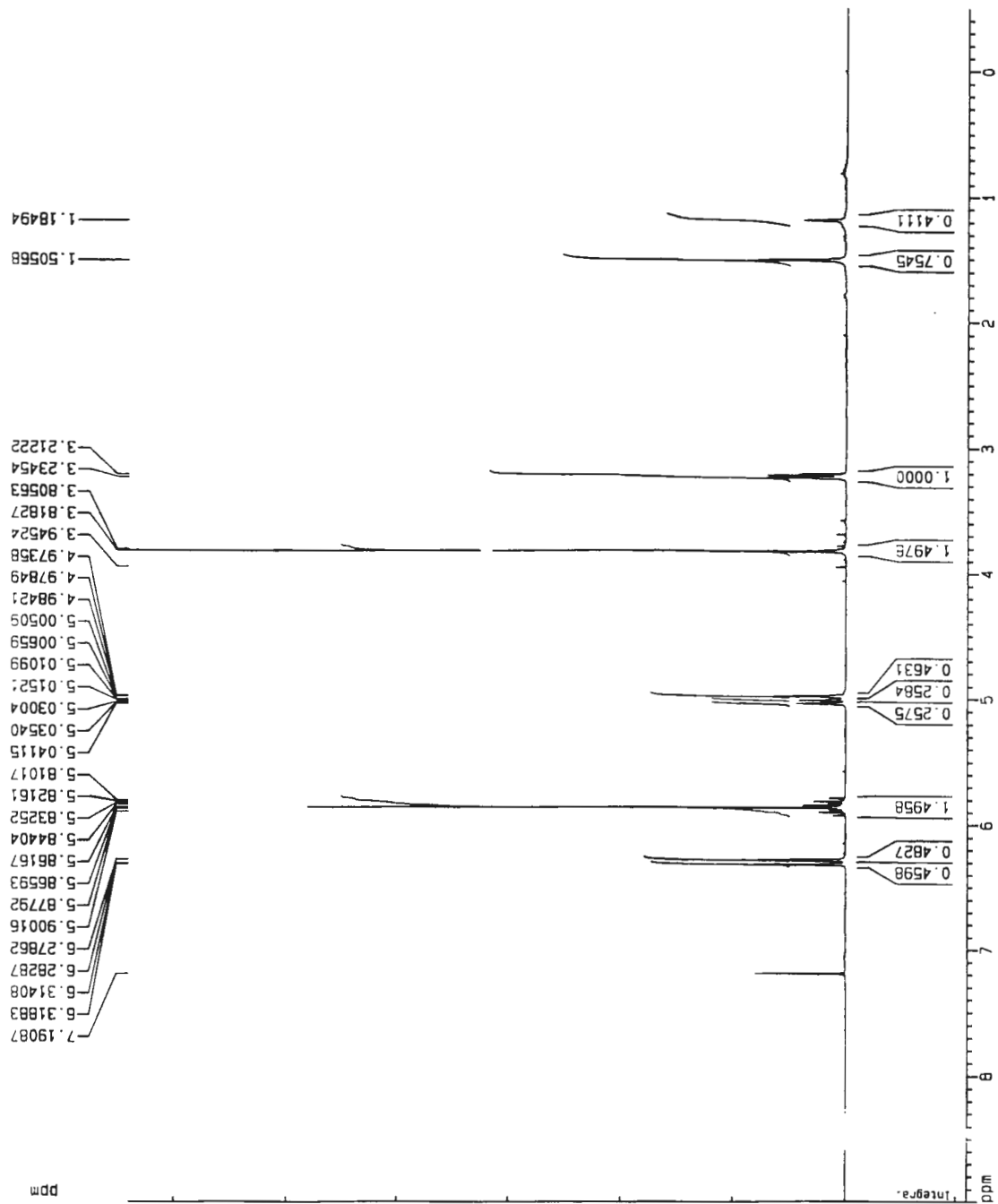


Figura 14: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de FP-3

Current Data Parameters
 NAME proton25
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 980213
 Time 15.01
 INSTRUM spect
 PROBNM 5 mm Dwa1 13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 24
 DS 0
 SMI 3238.342 Hz
 FIDRES 0.098826 Hz
 AQ 5.0594292 sec
 RG 50.5
 DM 154.400 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 11.20 usec
 DE 4.50 usec
 SF01 300.1313911 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 S1 16384
 SF 300.1300121 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1P 5.000 ppm
 F1 2701.17 Hz
 F2P 0.500 ppm
 F2 -150.07 Hz
 PPRCM 0.43182 ppm/cm
 HZCM 129.60195 Hz/cm

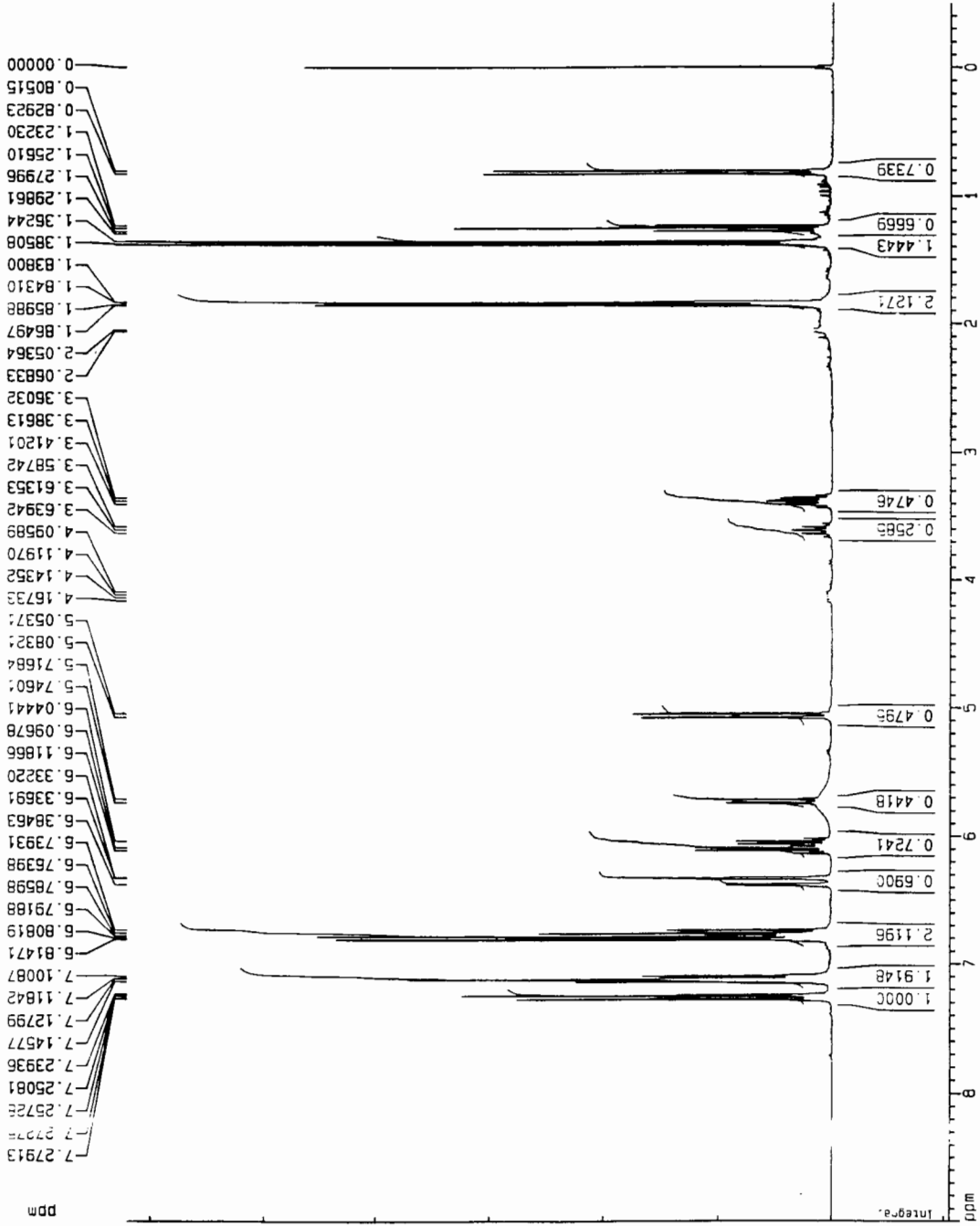


Figura 15: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de Ne-1+Ne-2

Patricia CP413 3

Current Data Parameters
 NAME proton17
 EXPNO 6
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 980115
 Time 9.13
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dui1 13
 PULPROG zg30
 TO 32768
 SOLVENT COC13
 NS 128
 DS 0
 SWH 3906.250 Hz
 FIDRES 0.119209 Hz
 AQ 4.1943541 sec
 RG 1149.4
 DM 128.000 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 P1 11.20 usec
 DF 4.50 usec
 SF01 300.131526 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 Processing parameters
 S1 16384
 SF 300.1300275 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LU 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1P 10.000 ppm
 F1 3001.30 Hz
 F2P 0.500 ppm
 F2 -150.06 Hz
 PPHCM 0.4727 ppm/cm
 HZCM 1.43.24387 Hz/cm

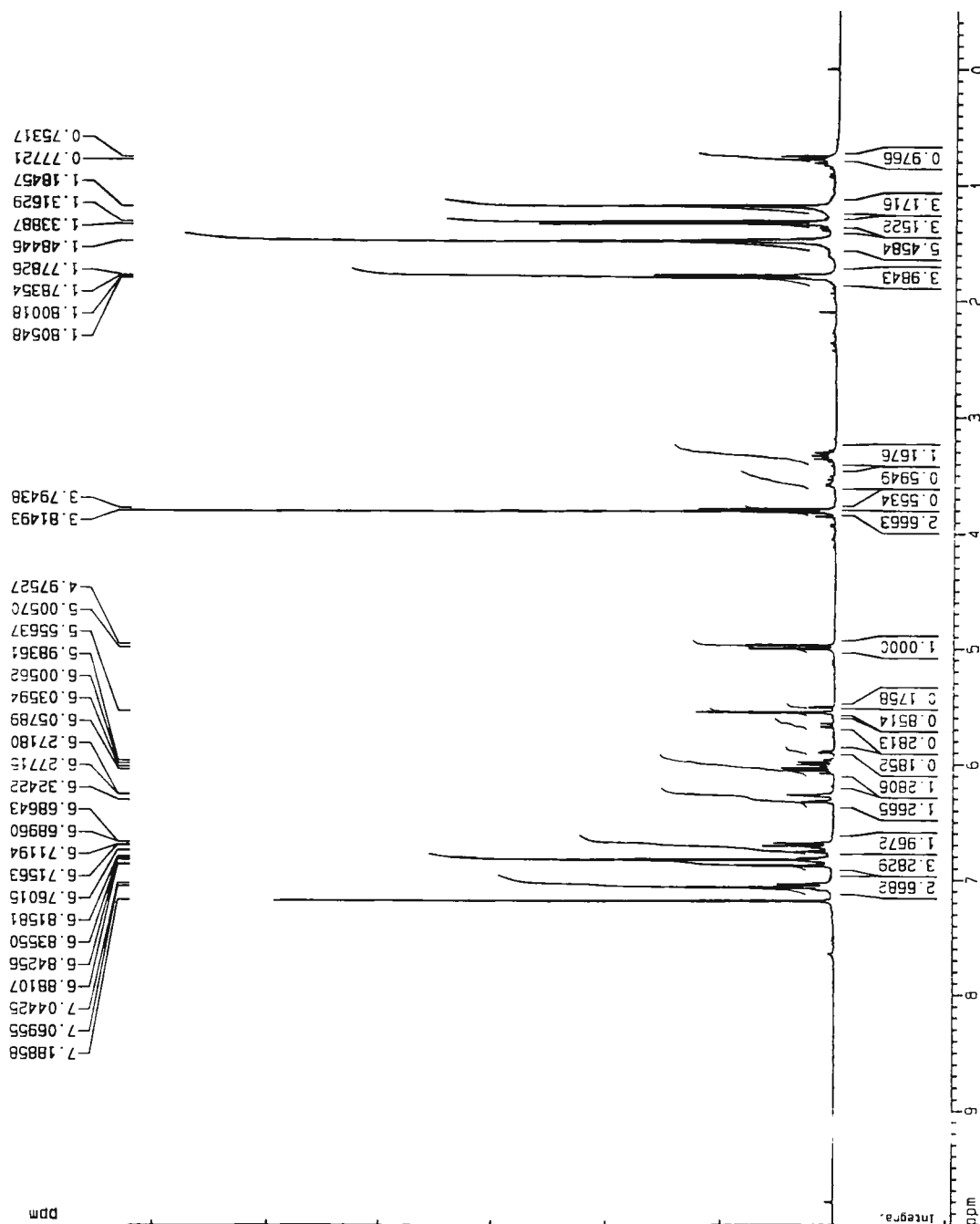


Figura 16: Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl₃) de Ne-3

Current Data Parameters
 NAME proton1
 EXPNO 9
 PROCNO 1

F2 Acquisition Parameters
 Date_ 9/7/217
 Time 10 41
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Jja1 13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDC13
 NS 200
 DS 0
 SWH 3531.954 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 574.7
 DW 1.19 200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 P1 11.20 usec
 DI 6.00 usec
 SF 300 1300280 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16364
 SF 300 1300280 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.50 Hz
 GB 0
 PC 10.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1 9.000 ppm
 F1 2701.17 Hz
 F2 0.500 ppm
 F2 -150.07 Hz
 FPMCM 0.43182 ppm/cm
 HZCM 129.60161 Hz/cm

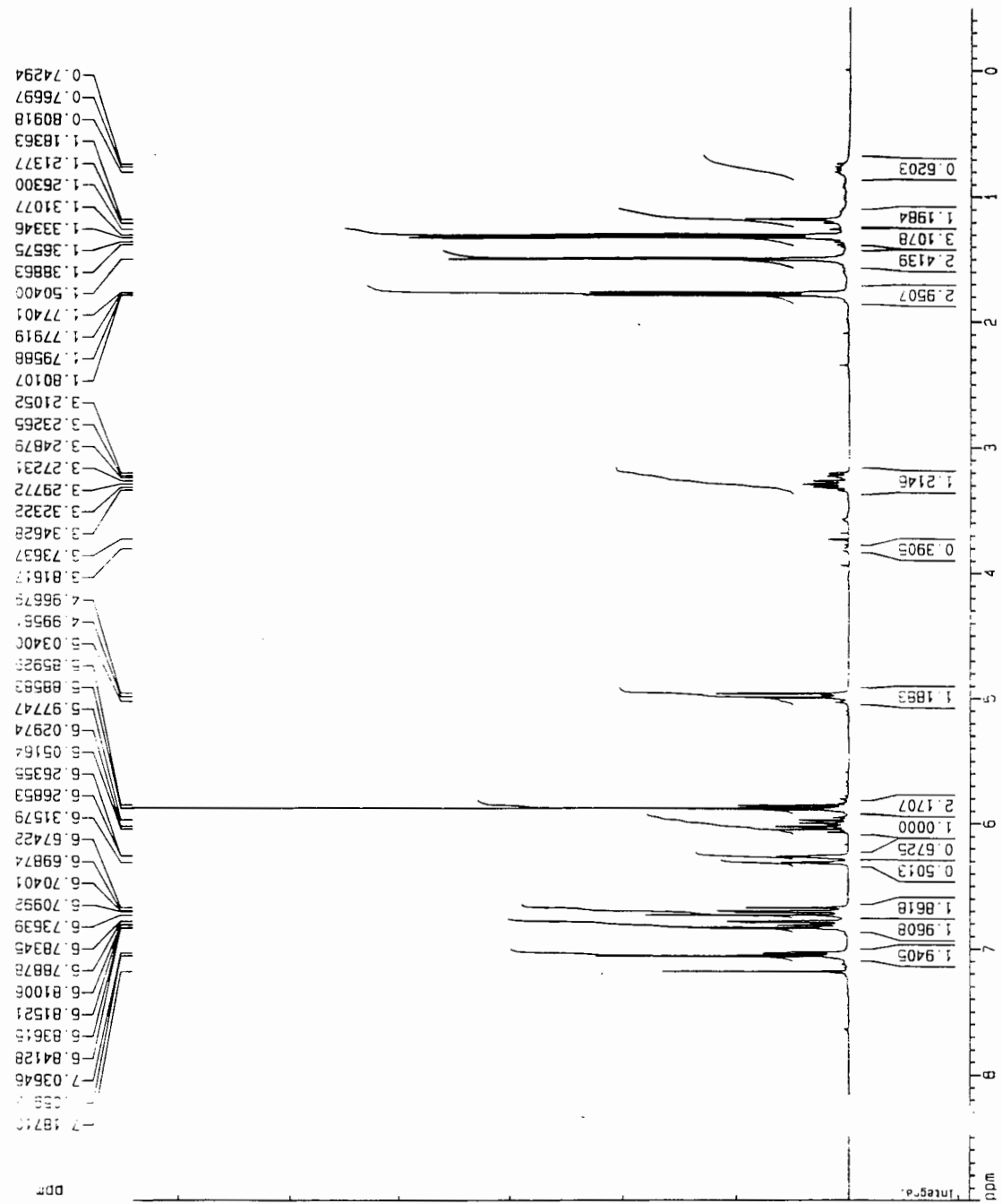


Figura 17: Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl3) de Ne-4

Current Data Parameters:
 NAME: proton17
 EXPNO: 7
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 980115
 Time: 9:34
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm QNP1 13
 PULPROG: zg30
 TD: 32768
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 128
 DS: 0
 SWH: 37878.73 Hz
 FIDRES: 0.11557 Hz
 AQ: 4.3254261 sec
 RG: 1149.4
 DM: 132.000 usec
 DE: 4.50 usec
 TE: 300.0 K
 D1: 1.00000000 sec
 P1: 11.20 usec
 P2: 4.50 usec
 SFO1: 300.1314737 MHz
 NUC1: 1H
 PL1: 0.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI: 16384
 SF: 300.1300273 MHz
 MDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.50 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

1D NMR plot parameters:
 CX: 22.00 cm
 F1P: 9.000 ppm
 F1: 2701.17 Hz
 F2P: -0.500 ppm
 F2: -150.07 Hz
 PPMCM: 0.43182 ppm/cm
 HZCM: 129.60161 Hz/cm

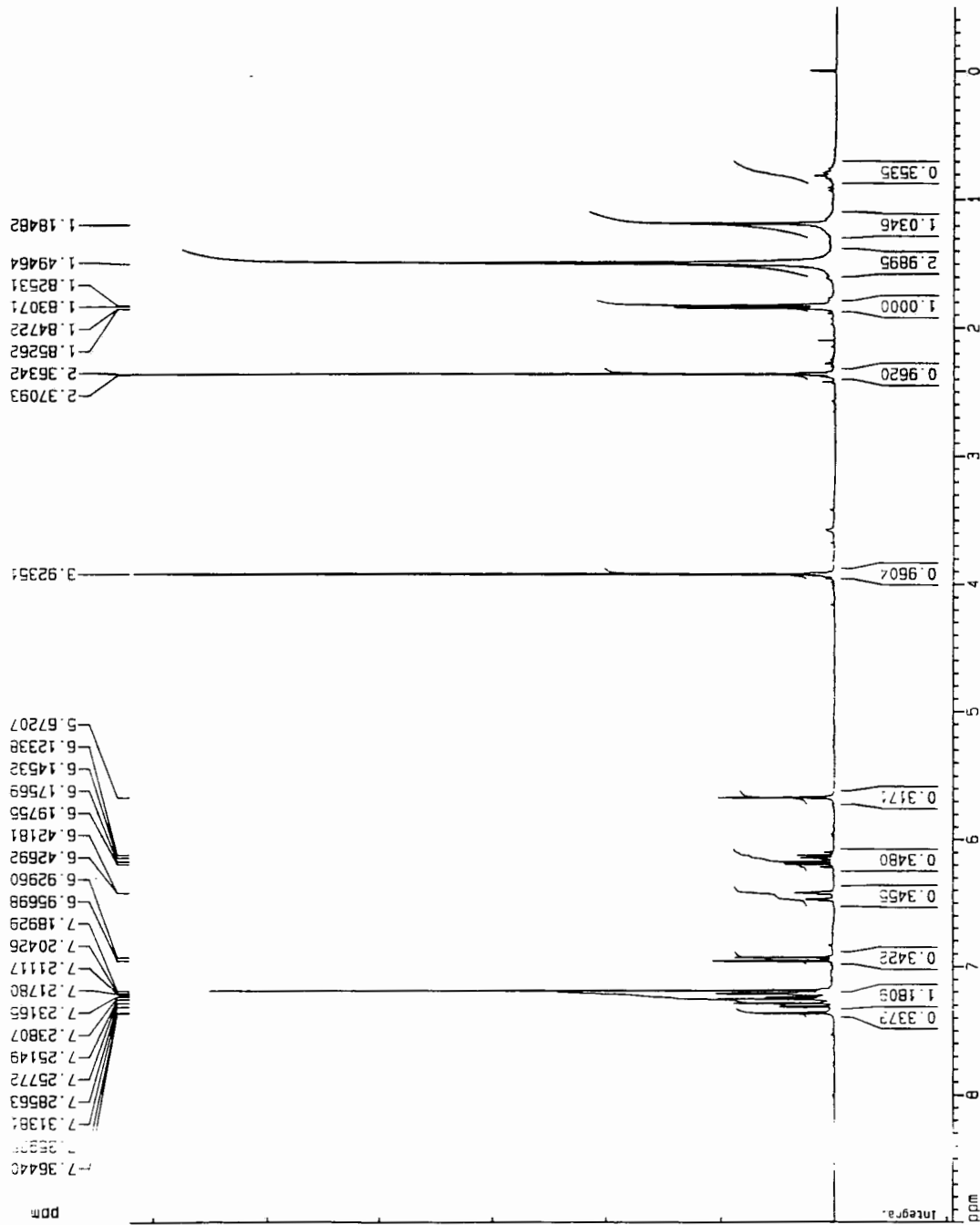


Figura 18: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de Ne-6


```

Current Data Parameters
NAME          proton1
EXPNO         10
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         971217
Time          11:52
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm QNP 1H
PULPROG       zg30
TD            32768
SOLVENT       CDCl3
NS            256
DS            0
SWH           3654.471 Hz
FIDRES        0.111541 Hz
AQ            4.4827123 sec
RG            812.7
DM            1.36 800 usec
DE            6.00 usec
TE            300.0 K
D1            1.0000000 sec
P1            11.20 usec
DI            6.00 usec
SF            300.1314464 MHz
NUC1          1H
PL1           : 0.0 dB

F2 - Processing parameters
SI            16384
SF            300.1300272 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            15.00

1D NMR plot parameters
CX            22.00 usec
F1P          9.000 ppm
F1            2701.17 Hz
F2P          0.500 ppm
F2            -150.07 Hz
PPM1M        0.43182 ppm/cm
HZCM         129.60161 Hz/cm
    
```

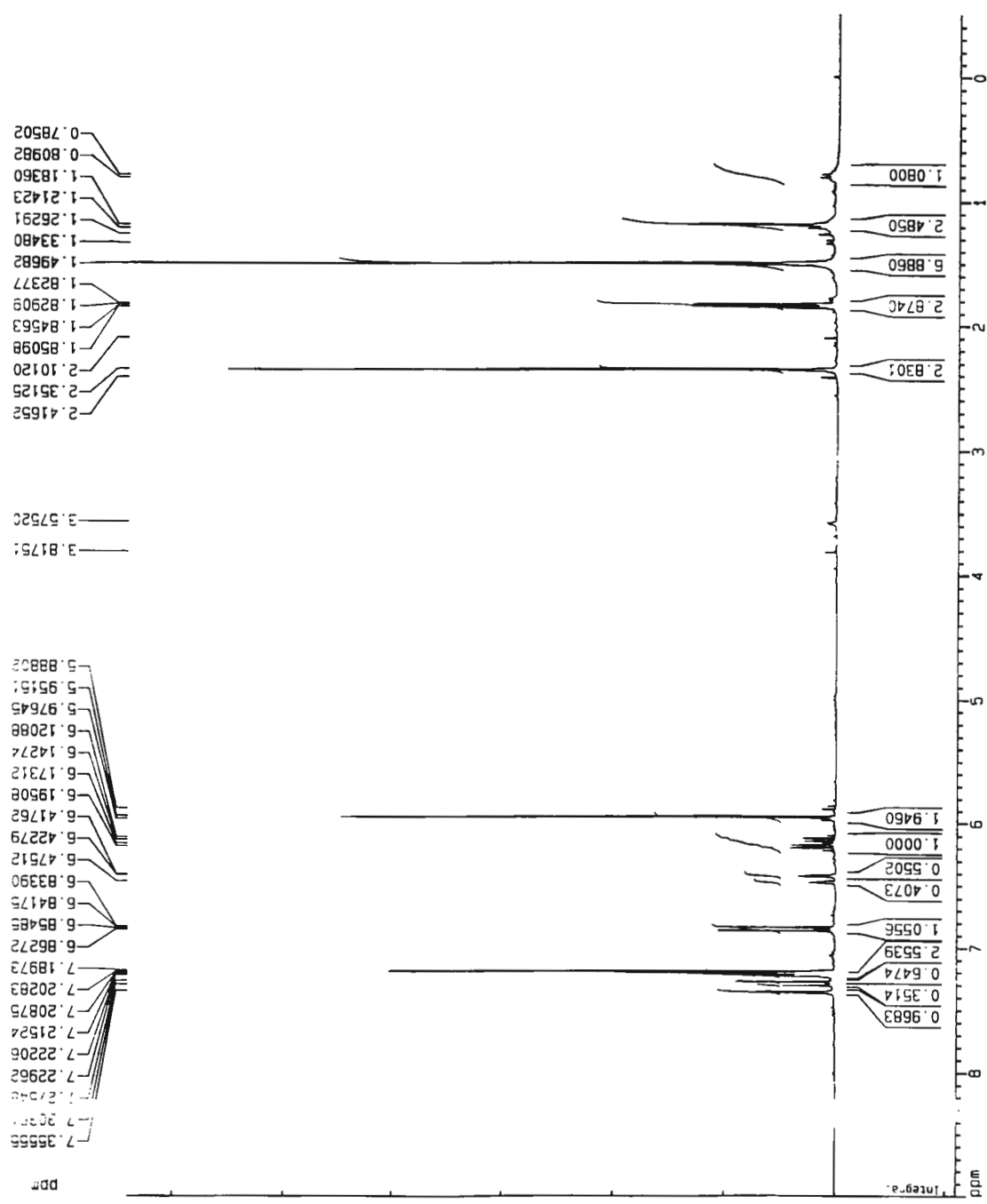


Figura 19: Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl3) de Ne-7

Patricia M 8

Current Data Parameters
 NAME proton22
 EXPR0 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 980210
 Time 9:45
 INSTRUM spect
 PROBN0 5 mm QNP113
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 0
 SMU 3633.721 Hz
 FIDRES 0.110892 Hz
 AQ 4.5089269 sec
 RG 574.7
 DM 137.600 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 C1 1.0000000 sec
 P1 11.70 usec
 D1 4.50 usec
 SI 01 300 131.4641 MHz
 NUC1 1H
 PL1 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300 1300057 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.50 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 22.00 cm
 F1P 10.500 ppm
 F1 1151.36 Hz
 F2P 0.500 ppm
 F2 -150.07 Hz
 RPNM 0.50000 ppm/cm
 MZCN 150.06500 Hz/cm

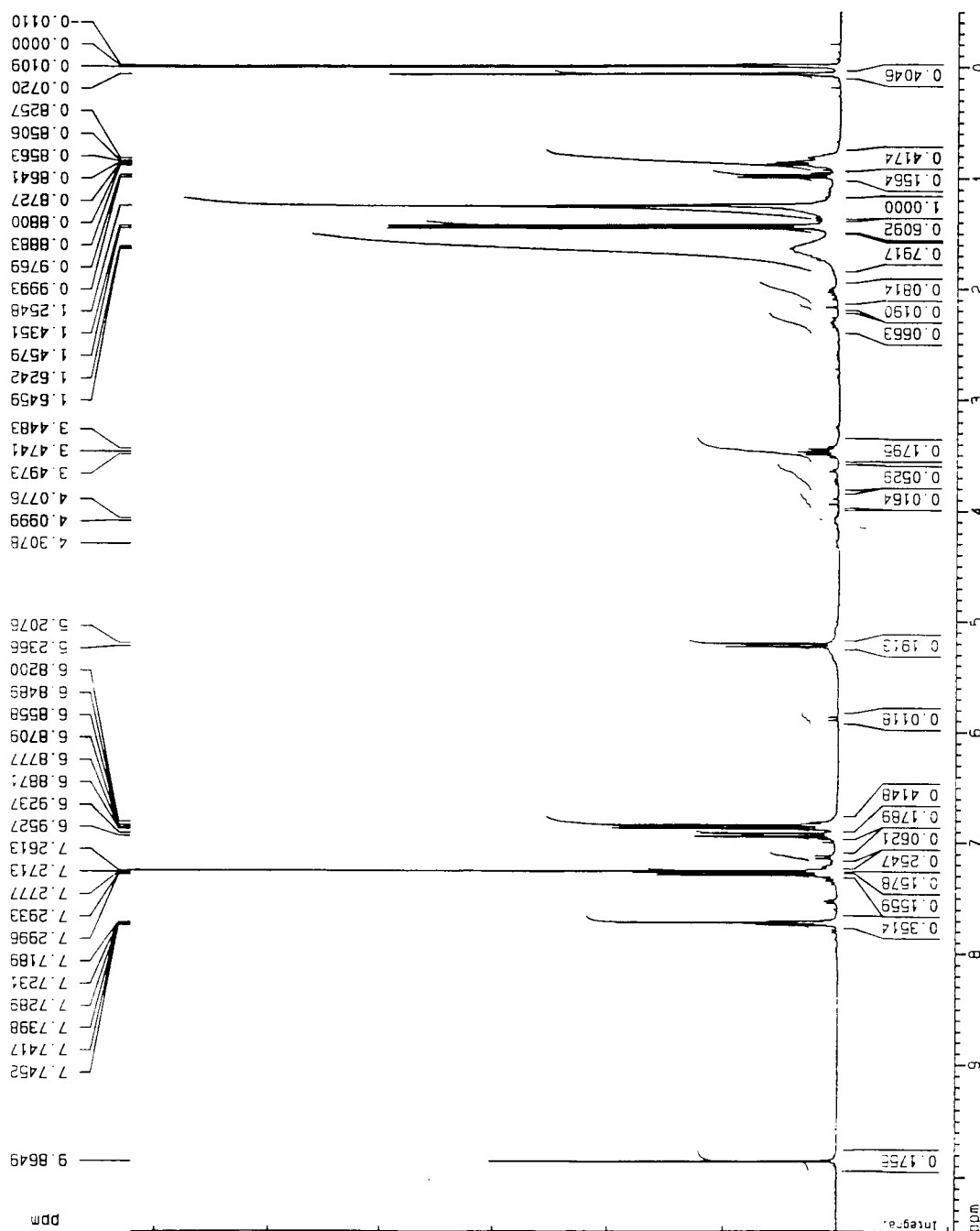


Figura 20: Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl3) de DN-1+DN-2

3.5. Estudo Biossintético

3.5.1. Preparação de Reagentes e Precusores

Para a avaliação da rota biossintética proposta foi necessária a preparação dos precursores que não se encontravam disponíveis comercialmente: *p*-hidróxi-propenil-benzeno, ácido *p*-cumárico e álcool *p*-cumárico. O precursor *p*-hidróxi-propenil-benzeno foi preparado de acordo com o trabalho de Ireland *et al.* (1968) através da desmetilação do anetol, utilizando-se difenilfosfina de lítio, conforme a figura 21.

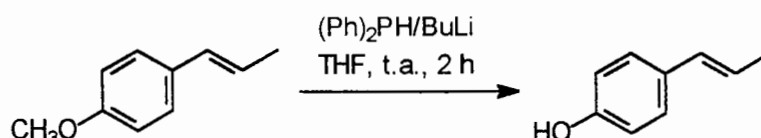


Figura 21: Esquema da desmetilação do anetol

No entanto, o reagente difenilfosfina também não se encontra disponível comercialmente, sendo necessária também a sua preparação, através da reação da trifenilfosfina com lítio (Ireland *et al.* 1968).

Preparação da difenilfosfina: Em um balão de 2L, em atmosfera inerte, foram adicionados 1L de THF seco e 120,00 g (0,46 mols) de trifenilfosfina. À esta solução foram adicionados 18,42 g (2,66 mols) de um fio de lítio previamente lavado em hexano e cortado dentro do balão em aproximadamente 20 min. A solução foi agitada por 2,5 h.

Esta solução foi filtrada em lã de vidro dentro de um béquer contendo 600,00 g de gelo picado. O balão da reação foi lavado com Et₂O, e a solução foi transferida para um funil de separação de 2 L, e extraída com Et₂O (4x200 mL), a fase etérea foi lavada com 250 mL de ácido hidroclicórico 5%, em seguida com 250 mL de água, e finalmente com 250 mL de NaCl saturado. Posteriormente, a

solução foi seca com Na_2SO_4 anidro. O produto de reação foi submetido a uma destilação fracionada a vácuo, sendo o ponto de ebulição da difenilfosfina de 280°C , à pressão atmosférica. A caracterização do produto foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (Figura 24, p.78), onde foi observado um pico do íon molecular de 186 m/z referente a difenilfosfina (Figura 22).

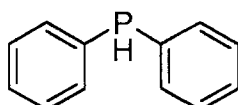


Figura 22: Estrutura da difenilfosfina

Desmetilação do anetol: A um balão com atmosfera inerte, em banho de gelo, foram adicionados 30 mL de THF seco e 5 mL de difenilfosfina (28,74 mmol) obtida a partir da preparação previamente descrita. Foram adicionados em 3 min à mistura 15 mL de *n*-BuLi/hexano 2,12 M. O balão chegou até a T. A. em 30 min, e então foram adicionados 5,10 mmols de anetol (previamente destilado). A agitação se manteve por duas horas, quando a reação foi interrompida.

A solução foi então transferida para um erlenmeyer de 500 mL e foram adicionados 200 mL de H_2O mais 10 mL de uma solução de NaOH 10%, esta mistura foi transferida para um funil de separação de 500 mL, a solução foi então lavada com quatro porções de 100 mL de Et_2O para a remoção das impurezas do álcali, e as frações etéreas foram recombinadas e extraídas com duas porções de 50 mL de NaOH 10%. A fase aquosa foi transferida para um erlenmeyer de 1L, resfriada em um banho de gelo e acidificada com HCl concentrado (o pH foi mantido abaixo de 3,0). Durante a acidificação a solução amarela tornou-se gradativamente branca. A solução leitosa foi agitada por mais três minutos sem resfriamento e então extraída com uma porção de 200 mL e duas porções de 100 mL de Et_2O . As frações etéreas reunidas foram lavadas com 100 mL de H_2O e 100 mL de NaCl aquoso saturado. A solução foi então secada com MgSO_4 anidro, filtrada e concentrada, fornecendo um óleo amarelo. Este produto foi submetido à

cromatografia planar preparativa, eluído com CH_2Cl_2 :hexano 3:2, de onde se obteve duas faixas, sendo a mais intensa caracterizada como sendo o *p*-hidróxi-propenil-benzeno, que foi extraída com acetona, e analisada por RMN- ^1H (Tabela 8, p. 80, Figura 26, p. 81) que revelou sinais característicos do fenilpropanóide. A análise do EM do produto mostrou o íon do pico molecular de 134 m/z (Figura 25, p. 79). Posterior análise em cromatografia gasosa mostrou um grau de pureza de 96,2%. Este produto foi utilizado nos ensaios de biossíntese.

Ácido *p*-cumárico: O ácido *p*-cumárico foi sintetizado através da condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e *p*-hidróxi-benzaldeído, catalisada por aminas aromáticas (Figura 23) segundo Katayama *et al.* (1992).

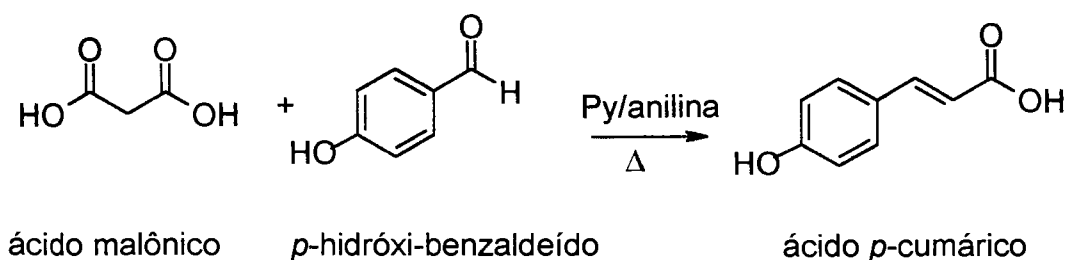


Figura 23: Reação de obtenção do ácido *p*-cumárico

Ácido malônico (1,50 g, 14,42 mmol) e *p*-hidróxi-benzaldeído (1,15 g, 9,43 mmol) foram dissolvidos em piridina seca (3,5 mL), e foi adicionado piperidina (uma gota) e anilina (uma gota) previamente destiladas. A temperatura foi mantida a cerca de 55-60° C por 24 horas e então a 100° C por uma hora. Após o resfriamento à T. A., a mistura reacional foi evaporada a vácuo. O resíduo foi dissolvido em H_2O (15 mL) e acidificado com HCl 2 M (5 mL). A solução opaca resultante foi extraída com AcOEt (75 mL x 2), a solução em AcOEt foi então concentrada a cerca de 25 mL do volume, e extraída com uma solução de NaHCO_3 5% (75 mL). A frações aquosas foram então combinadas e extraídas com CH_2Cl_2 (4 x 50 mL), acidificadas com HCl conc. e extraída com AcOEt (3 x 110 mL). As fases orgânicas foram reunidas e extraídas com solução de NaCl (80 mL), secadas com

Na₂SO₄ anidro, e evaporadas fornecendo ácido *p*-cumárico que foi então cristalizado em MeOH/éter. O espectro de RMN-¹H mostrou sinais referentes ao ácido *p*-cumárico (Tabela 8, p. 80, Figura 27, p. 82).

Esterificação do ácido *p*-cumárico: Foi adicionado a uma solução de ácido *p*-cumárico (500,0 mg) em MeOH (60 mL), 0,2 mL de H₂SO₄ conc. à T.A. A temperatura foi aumentada antes do refluxo começar, com o solvente de refluxo seco continuamente por meio de um extrator soxhlet contendo Na₂SO₄ anidro e CaCO₃. Após 9 h a mistura reacional foi esfriada (T.A.), neutralizada (NaHCO₃, 4g), filtrada, e evaporada até a secura em rotaevaporador. O resíduo resultante foi extraído com Et₂O (150 mL) e H₂O (50 mL), e a fase aquosa foi novamente extraída com Et₂O (50 mL). As fases etéreas combinadas, foram extraídas com solução de NaCl saturada, secadas com Na₂SO₄ anidro, e evaporadas até secura em rotaevaporador. O produto obtido a partir da esterificação do ácido *p*-cumárico foi reconstituído em CH₂Cl₂, e aplicado em uma coluna de sílica-gel (38 cm x 2 cm d.i.), eluída com CH₂Cl₂: MeOH. Frações contendo o cumarato de metila foram combinadas e evaporadas a vácuo fornecendo 438 mg de cumarato de metila. O espectro de RMN-¹H mostrou sinais referentes ao cumarato de metila (Tabela 8, p. 80, Figura 28, p. 83). Este produto foi utilizado para a preparação do álcool *p*-cumárico.

Redução do cumarato de metila: À uma solução de LiAlH₄ (533,6 mg, 13,4 mmol) em Et₂O seco (15,7 mL, destilado sob sódio metálico e benzofenona) a -20°C sob N₂, foi adicionado gotejando-se uma solução de cumarato de metila (438,0 mg, 2,67 mmol) em Et₂O seco (12,4 mL) em cerca de 30 min. Seguindo-se agitação por uma hora. Após isso a mistura reacional foi transferida para um béquer contendo gelo picado, para destruir o excesso de LiAlH₄, a mistura foi então transferida para um funil de separação e foi adicionado 70 mL de H₂O. O sal de lítio foi então extraído com AcOEt (3 x 25 mL), e as fases em AcOEt foram combinadas e extraídas com solução saturada de NaCl (2 x 50 mL), secada com Na₂SO₄ anidro e então evaporada a vácuo, fornecendo assim 345,9 mg de álcool

p-cumárico bruto. O produto obtido a partir da redução do cumarato de metila foi aplicado em CPP, eluído com CH₂Cl₂: EtOH 97:3 por três vezes. A fração correspondente ao álcool *p*-cumárico foi extraída da sílica com acetona e analisada por RMN-¹H (Tabela 8, p. 80, Figura 29, p. 84) e por CG, mostrando um grau de pureza de 96%.

Purificação do *E*-isoeugenol: O *E*-isoeugenol sendo disponível comercialmente foi apenas purificado antes de cada ensaio de incorporação em preparações enzimáticas. Foram aplicados ~100 mg em cromatografia planar preparativa e eluída com hexano:AcOEt 8:2 por duas vezes. A faixa correspondente ao *E*-isoeugenol foi então extraída com ACOEt, concentrada e armazenada em freezer até o momento do ensaio enzimático.

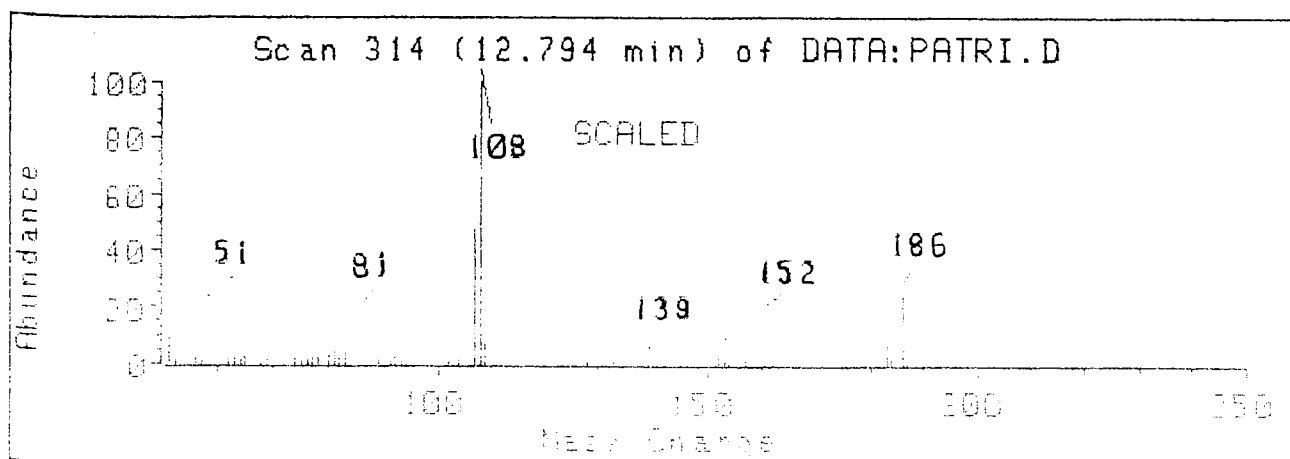


Figura 24: Espectro EM da difenilfosfina

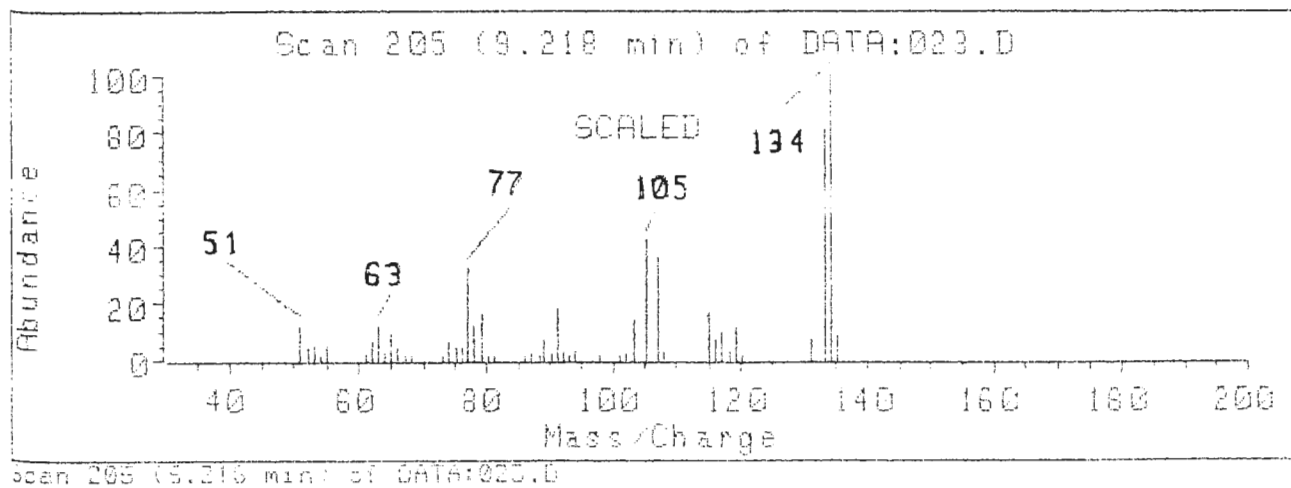


Figura 25: Espectro EM do *p*-hidróxi-propenil-benzeno

Tabela 8: Dados obtidos nos espectros de RMN-¹H dos precursores sintetizados

Próton	<i>p</i> -hidróxi-propenil- benzeno	Ácido <i>p</i> -cumárico	Cumarato de metila	Álcool <i>p</i> - cumárico
H-2	6,75 (1H, <i>dd</i> , 2,0; 6,7 Hz)	6,94 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)	6,88 (1H, <i>dd</i> , 2,0; 6,6 Hz)	6,83 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)
H-3	7,19 (1H, <i>dd</i> , 1,9; 6,6 Hz)	7,60 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,6 Hz)	7,53 (1H, <i>dd</i> , 1,9; 6,6 Hz)	7,26 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)
H-5	7,19 (1H, <i>dd</i> , 1,9; 6,6 Hz)	7,60 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,6 Hz)	7,53 (1H, <i>dd</i> , 1,9; 6,6 Hz)	7,26 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)
H-6	6,75 (1H, <i>dd</i> , 2,0; 6,7 Hz)	6,94 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)	6,88 (1H, <i>dd</i> , 2,0; 6,6 Hz)	6,83 (1H, <i>dd</i> , 1,8; 6,5 Hz)
H-7	6,31 (1H, <i>dd</i> , 1,4; 15,8 Hz)	6,39 (1H, <i>d</i> , 15,9 Hz)	6,33 (1H, <i>d</i> , 16,0 Hz)	6,52 (1H, <i>dd</i> , 1,5; 15,2 Hz)
H-8	6,04 (1H, <i>dq</i> , 6,4; 15,8 Hz)	7,66 (1H, <i>d</i> , 15,9 Hz)	7,59 (1H, <i>d</i> , 16,0 Hz)	6,20 (1H, <i>dd</i> , 5,4; 15,2 Hz)
H-9	1,78 (3H, <i>dd</i> , 1,8; 6,4 Hz)	-	-	4,21 (1H, <i>dd</i> , 1,5; 5,4 Hz)
OMe	-	-	3,7 (3H, <i>s</i>)	-

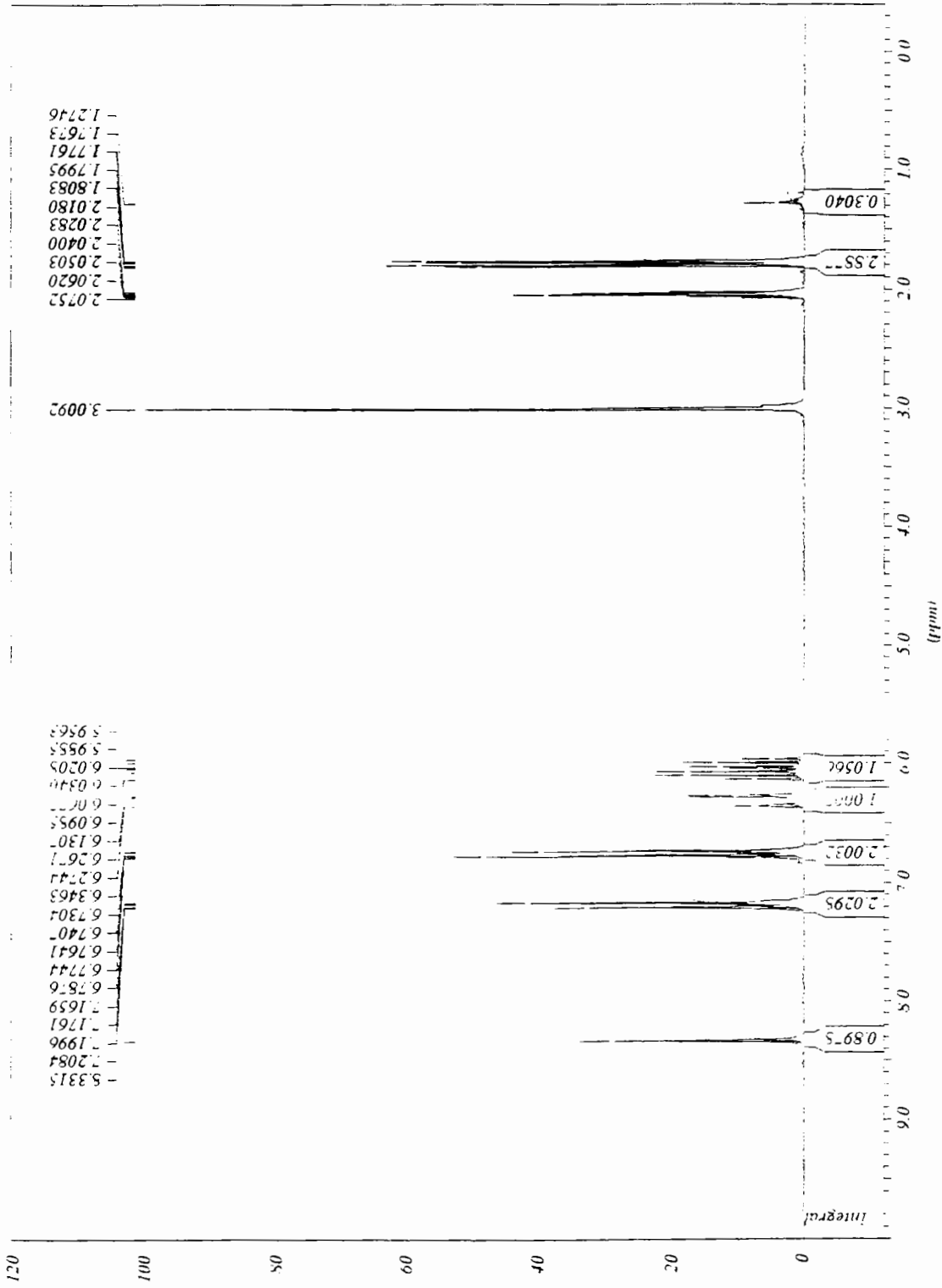


Figura 26: Espectro de RMN-¹H (200 MHz, acetona) do *p*-hidróxi-propenil-benzeno

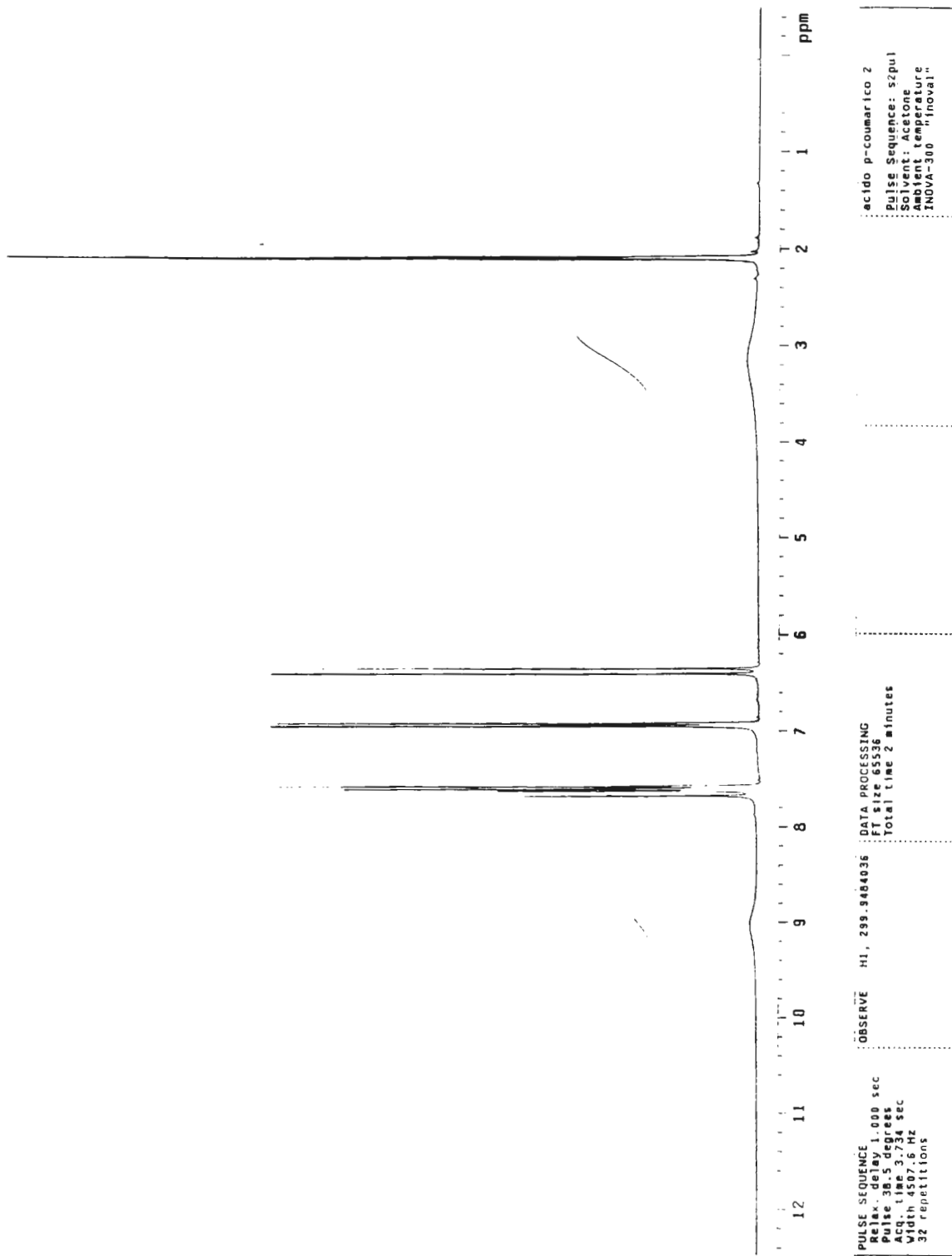


Figura 27: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, acetona) do ácido *p*-cumárico

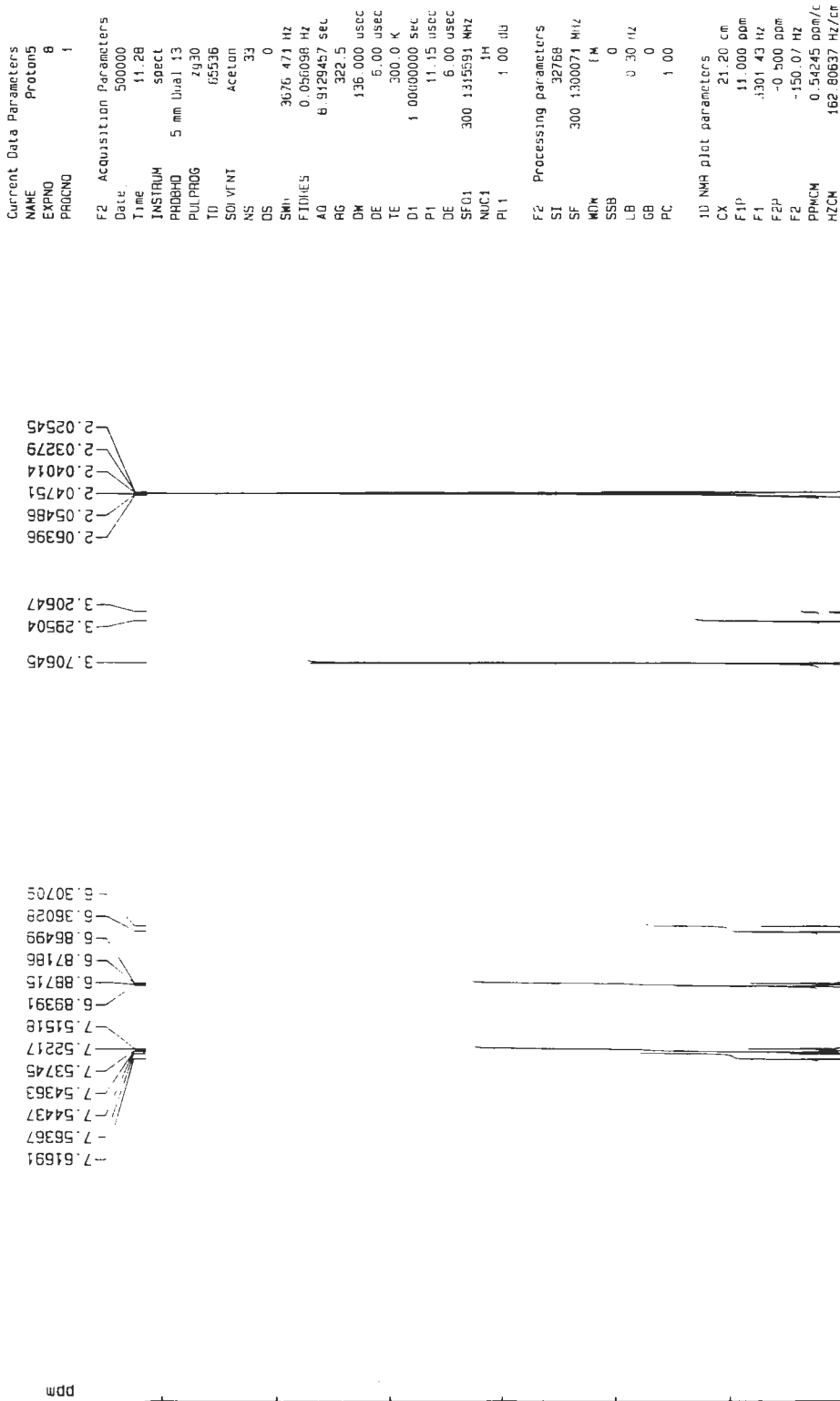


Figura 28: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, acetona) do cumarato de metila

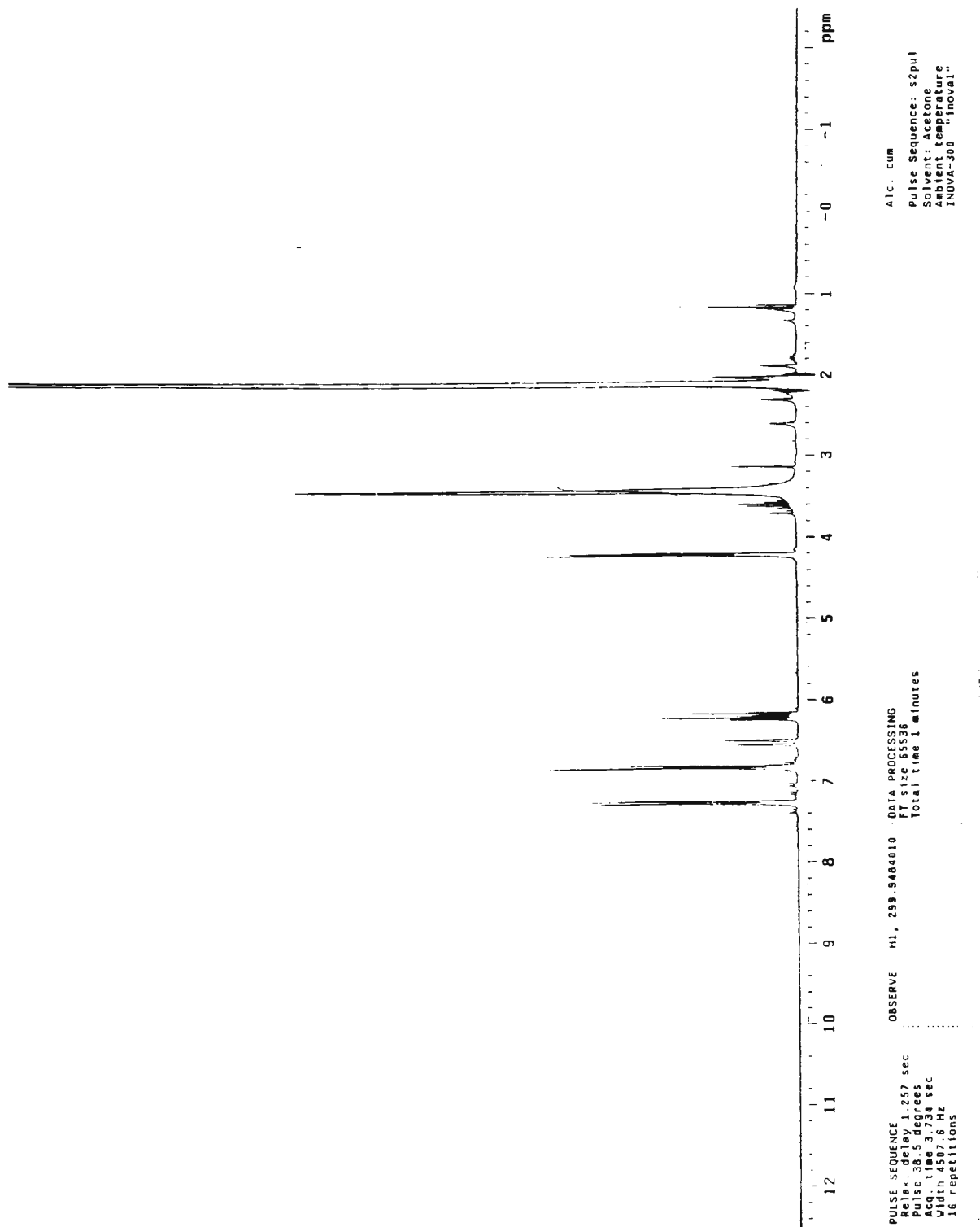


Figura 29: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, acetona) do álcool *p*-cumárico

3.5.2. Doseamento da PAL

Extração enzimática: Folhas frescas de *P. regnellii* (2 g) foram trituradas em N₂ líquido com 300 mg de sílica. Foram adicionados 50 mg/g material fresco de polivinilpolipirrolidona - PVPP e 1mL/g material fresco de tampão-borato 0,1 M pH=8,8. Essa mistura foi filtrada em gaze e centrifugada a 10.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi submetido a uma cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-25, coluna PD-10) para reter os componentes de baixo PM (Moreno *et al.* 1994). A solução enzimática foi então submetida aos ensaios de atividade enzimática por CLAE.

Ensaio da PAL monitorado por CLAE: Foram incubados 300 µl de solução de fenilalanina 10 mM, 200 µl de solução enzimática e 1000 µl de tampão-borato 0,1 M, pH=8,8 a 30°C por 30 min, e a reação foi terminada com a adição de 100 µl de HCl 12 N. Em seguida adicionou-se 50 nmols de metil-umbeliferona (padrão interno), e centrifugou-se a mistura a 9.000 x g por 5 min. Em seguida analisou-se o sobrenadante em CLAE na seguinte condição (Heide *et al.* 1989):

-MeOH : H₂O : CH₃COOH (60 : 40 : 1)

-Coluna: C-18 (5 µm) 250x4 mm Econosil - Alltech

-Fluxo = 1,0 mL/min

-λ de detecção = 275 nm

-Volume de injeção = 20 µL

Doseamento total de proteínas: Foi utilizado o procedimento descrito por Bradford (Bradford, 1976), e foi utilizado o kit-Bradford (Bio-Rad). Neste método, o corante vermelho (Comassie Brilliant Blue) é convertido à cor azul quando se liga à proteína, e são feitas leituras em 595 nm, sendo que as absorbâncias são correspondentes à quantidade relativa de proteínas.

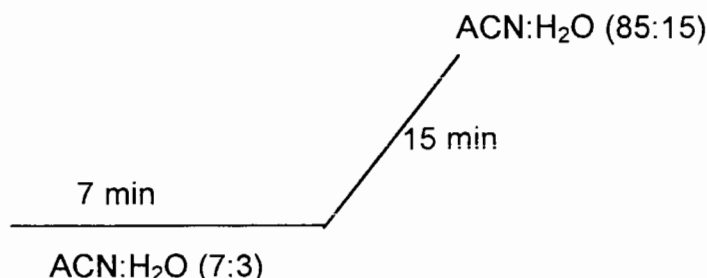
Foram preparadas quatro soluções de diferentes concentrações de a BSA (1,75; 3,50; 7,00; e 10,50 µg/ml) para a obtenção da curva-padrão. Um volume de

1200 μL destas amostras mais 300 μL do corante foram incubados por cinco minutos, e a leitura foi realizada em 595 nm. Com as medidas de absorvância destas soluções, foi obtida a curva-padrão para a BSA, que foi utilizada na extrapolação e obtenção dos teores de proteínas totais.

3.5.3. Ensaios Biossintéticos

Obtenção do extrato de folhas de *P. regnellii*: Duas folhas de *P. regnellii* (622 mg) foram liofilizadas por 24 h, e extraídas por duas vezes com AcOEt no ultrassom, obtendo-se 93,2 mg de extrato bruto (rendimento de 15%). Uma parte deste extrato (4 mg) foi tratada com Sep-pak C18 e posteriormente filtrada em filtro Milli-pore (0,45 μm) e analisada por CLAE.

Estabelecimento de uma condição de análise: Foi desenvolvido um método de análise através de CLAE para a separação das principais neolignanas presentes no extrato de folhas de *P. regnellii*. Foi utilizado um sistema isocrático com acetonitrila e água inicialmente seguido por um gradiente:



Aparelho: Shimadzu LC-10

Coluna: RP-18 (5 μm) 250x4 mm - Supelco

Fluxo: 1 mL/min

λ de detecção: 285 nm

Vol. de injeção: 10 μL

Identificação das principais neolignanas: Os padrões, previamente isolados foram analisados em CLAE na condição estabelecida visando identificar cada pico do cromatograma do extrato de folhas de *P. regnellii*. E a substância licarina-A não foi isolada de folhas de *P. regnellii*, tendo sido obtida em um banco de padrões previamente isolados.

Estabelecimento do protocolo de extração enzimática: O estabelecimento do protocolo de extração da enzima que dimeriza o *p*-hidróxi-propenil-benzeno – denominada conocarpano sintase foi feito por tentativa e erro, seguindo-se algumas referências da literatura, entre as quais um guia prático para purificação de enzimas (Price, 1996 e Deutscher, 1990) e os trabalhos de Lewis *et al.* (Umezawa *et al.* 1991, Katayama *et al.* 1992, 1993, Paré *et al.* 1994). O protocolo final utilizado foi: Uma folha de *P. regnellii* (m=8,0 g) foi congelada em N₂ líquido e macerada em 8 mL de tampão K-Pi 0,1 M pH=7,0 com EDTA 2m M e DTT 1 mM. Foram adicionados 50 mg/g material fresco de PVPP e 250 mg de sílica (para auxiliar na maceração), a mistura foi filtrada em gaze e centrifugada a 10.000xg por 30 min. O sobrenadante foi separado do precipitado e este foi extraído com tampão K-Pi adicionando-se 1% de Triton X-100, e novamente centrifugado a 10.000xg por 30 min. O sobrenadante foi então submetido à dessalinização através de cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-25, coluna PD-10).

Ensaio enzimático: Foram utilizados 200 µL de extrato enzimático, 20 µL de uma solução 250 mM de *p*-hidróxi-propenil-benzeno em acetona e soluções dos cofatores: 20 µL de NADH 50 mM e 10 µL de H₂O₂ 10 mM. Os experimentos foram incubados por dez minutos. A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de AcOEt, e o produto foi extraído com 2x500 µL de AcOEt. Em um dos controles foram adicionados o *p*-hidróxi-propenil-benzeno e os cofatores (NADH e H₂O₂) e a enzima desnaturada por 30' a 100°C. No outro controle foram adicionados *p*-hidróxi-propenil-benzeno e os cofatores e o extrato enzimático foi substituído por tampão K-Pi.

Análise por CLAE e CG: A fase orgânica dos extratos foi concentrada, suspensa em 500 µL de MeOH, filtrada em filtro Milli-pore (0,45 µm) e analisada por CLAE, tendo como referência o perfil cromatográfico do extrato de folhas de *P. regnellii* na condição pré-estabelecida. O produto foi também analisado por CG-EM para identificação da substância formada.

Conversão de *E*-isoeugenol: Folhas de *P. regnellii* foram extraídas de maneira análoga à descrita para o ensaio com o *p*-hidróxi-propenil-benzeno. No primeiro ensaio foram testadas frações solúvel e insolúvel, portanto ao resíduo da primeira centrifugação foi adicionado 1% de Triton X-100, mais tampão K-Pi 0,1 M pH=7,0, e a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min novamente. Então sobrenadantes da primeira e segunda centrifugação (frações solúvel e insolúvel, respectivamente) foram submetidos à dessalinização em coluna PD-10 Sephadex G-25 (separadamente), e os respectivos eluatos obtidos foram submetidos aos ensaios enzimáticos. O ensaio enzimático foi análogo ao ensaio com o *p*-hidróxi-propenil-benzeno, sendo que as reações foram iniciadas pela adição de 20 µL de solução de *E*-isoeugenol 250 mM em acetona.

Análise por CLAE e ES-EM: O produto de dimerização enzimática foi extraído com AcOEt, suspenso em MeOH e analisado por CLAE. O produto também foi submetido à análise em espectrômetro de massas operando no modo electrospray para a identificação da substância formada.

3.5.4. Quantificação da conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno

Para quantificação da conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano e monitoramento da conocarpano sintase foi necessária a realização de algumas etapas:

Obtenção de conocarpano natural: Para traçar a curva de calibração do conocarpano com exatidão foi necessária a obtenção de uma quantidade maior de conocarpano. Então a partir da fração CP11 (124 mg) obtida do fracionamento cromatográfico do extrato de raízes de *P. regnellii* foi realizada uma cromatografia planar preparativa, eluída em CH₂Cl₂:acetona 99:1, e obtidas duas faixas, sendo que a primeira foi identificada como sendo o conocarpano (66,3 mg) com pureza de 100% verificada por cromatografia gasosa.

Definição do padrão interno: Para se utilizar uma substância como padrão interno, deve-se levar em conta semelhanças estruturais com as substâncias a serem extraídas, incluindo a semelhança de grupos cromóforos. Assim sendo foram testadas várias neolignananas, e o critério de escolha foi o a não sobreposição cromatográfica. A neolignanana selecionada foi a canelina-A (Figura 30) isolada de *Licaria rigida* (Braz *et al.* 1981) e disponível no banco de padrões do Laboratório de Produtos Naturais do IQ-USP.

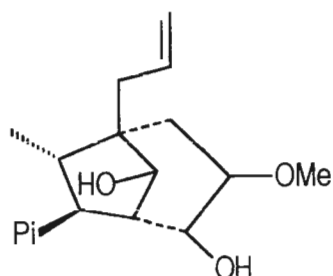


Figura 30: Estrutura da canelina-A

Curva de calibração do conocarpano + padrão interno: Foi preparada uma solução estoque de conocarpano em MeOH de 1mg/mL, e a partir desta solução foram feitas diluições e foram adicionados em cada solução 30 μ L de uma solução estoque do padrão interno em MeOH de 5 mg/mL (correspondente a 433,4 nmols). As diluições realizadas foram:

Conc. Conocarpano (mg/mL)	Volume da solução estoque (μ L)	Volume de MeOH(μ L)
1,0000	970	0,0
0,5000	485	485,0
0,2500	242,5	757,5
0,1250	121,25	878,75
0,0750	60,63	939,37
0,0375	30,31	969,69

Um volume de 10 μ L foram analisados por CLAE na condição estabelecida para a obtenção da curva-padrão do conocarpano+p.i.

3.5.5. Otimização do ensaio

Após o estabelecimento da extração enzimática e do ensaio enzimático, e da caracterização dos produtos da reação enzimática, os procedimentos foram otimizados, ou seja foram estabelecidas condições ótimas de modo que a enzima conocarpano sintase tivesse sua atividade máxima. A otimização envolve a determinação de diversas variáveis tais como pH, concentração do substrato e a cinética de reação.

pH ótimo: A determinação do pH ótimo de uma proteína é o primeiro passo na determinação do melhor tampão a ser empregado na sua extração, portanto, foram testados outros tampões além do tampão fosfato (K-Pi) 0,1 M pH=7,0, com uma faixa de pH de 3,7 a 8,8, com a mesma concentração. Os tampões utilizados foram: tampão acetato 0,1 M pH=3,7; tampão acetato 0,1 M pH=5,6; tampão tris(hidroximetil)aminoetano (Tris) 0,1 M pH=8,8. Esses tampões foram preparados de acordo com a literatura (Deutscher *et al* 1990).

Cinética de reação: A cinética de reação foi obtida. Os extrato enzimáticos foram obtidos conforme o protocolo estabelecido, e incubados com o precursor *p*-hidróxi-propenil-benzeno (20mM) mais os cofatores, nos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min. Em reações enzimáticas deve-se observar uma linearidade no gráfico da cinética de reação. No caso deste ensaio observou-se linearidade até 10 min.

Saturação do substrato: O terceiro parâmetro a ser definido era a quantidade de substrato incubado. Para se ter atividade máxima, deve-se garantir que todos sítios ativos da enzima estejam ocupados, para isso foram testadas várias concentrações do *p*-hidróxi-propenil-benzeno (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mM) para

verificar em qual concentração ocorreria o maior índice de sua conversão em conocarpano.

Dosagem de proteínas totais por Peterson: Foi utilizado o procedimento descrito por Peterson (Peterson 1979). No ensaio foram misturados 125 μL da solução de tartarato cúprico alcalino (à esta solução foram adicionados 10% de SDS) (reagente A) e 1000 μL do reagente de Folin diluído (reagente B) com 25 μL do extrato enzimático a ser dosado, a solução foi agitada levemente e incubada por 15 min, e a absorbância foi determinada a 750 nm. Para cada ensaio foi realizada a curva-padrão da albumina sérica bovina (BSA) que é a proteína a ser utilizada como padrão. No branco foram incubados 125 μL do reagente A e 1000 μL do reagente B.

3.5.6. Análise dos produtos enzimáticos por cromatografia quiral

A reação foi analisada em termos da preferência enantiosseletiva e diastereoisomérica. Foi necessário saber se a conversão do substrato foi enantiosseletiva ou se houve formação de ambas as formas antipodais. O produto foi analisado quanto à sua composição enantiomérica tendo como padrões, o conocarpano *cis* e *trans* naturais e o obtido por síntese química. Foi também analisado o produto de dimerização do *E*-isoeugenol. Estas análises foram constituídas das seguintes etapas:

Separação do conocarpano *cis/trans*: A fim de separar os isômeros *cis/trans* do conocarpano, este foi submetido à CLAE em fase normal (sílica). A condição de separação utilizada foi:

- Aparelho: HP-1050
- Fase móvel: hexano:DCM:AcOEt (50:48:2)
- Coluna: Econosil sílica 5 μm 250x4,6 mm
- Fluxo = 1 mL/min
- λ = 280 nm

Foram realizadas 11 injeções de 30 μ L de uma solução contendo conocarpano 1 mg/mL.

Obtenção do conocarpano sintético: Obteve-se o conocarpano sintético de acordo com o trabalho de Sarkanen e *cols* (Sarkanen *et al* 1973) da seguinte maneira: O *p*-hidróxi-propenil-benzeno (100 mg) foi dissolvido em 4,3 mL de água + 2,7 mL de acetona, à essa solução foi acrescentado 0,22 mg de peroxidase comercial (1,16 unidades/mL) e 375,8 μ L de H₂O₂ a 20°C, e agitada por 45 min. A reação foi resfriada com um banho de gelo e agitada por mais 15 min. Foi então adicionada H₂O à reação e esta foi interrompida. A solução foi extraída por três vezes com éter etílico, e após evaporação do solvente, obteve-se um resíduo que foi purificado por CPP (eluído com hexano:AcOEt 7:3), fornecendo um produto que foi caracterizado por CG e utilizando-se o produto natural como referência, como sendo o conocarpano.

Foi obtido também o conocarpano sintético a partir do acoplamento oxidativo de duas unidades de *p*-hidróxi-propenil-benzeno mediado por FeCl₃, da seguinte maneira: 100 mg de *p*-hidroxi-propenil-benzeno foram dissolvidos em 1mL de EtOH + 1 mL de H₂O destilada; foram adicionados 150 mg de FeCl₃, a reação foi então agitada por 12 h, e o produto da reação foi extraído com Et₂O. O produto foi posteriormente purificado em CPP utilizando-se um sistema de eluente: hexano:AcOEt (7:3), que foi caracterizado como conocarpano. Este produto foi então submetido à cromatografia quiral.

Obtenção da licarina-A sintética: A licarina-A sintética foi obtida de forma análoga à obtenção do conocarpano sintético seguindo-se o trabalho de Sarkanen e *cols*, só que o reagente utilizado foi o *E*-isoeugenol obtido comercialmente e previamente purificado. Após a obtenção do produto, este foi purificado em CPP e analisado por RMN-¹H e caracterizado como sendo a licarina-A.

Cromatografia quiral: Foram submetidos à cromatografia quiral o conocarpano sintético (obtido a partir da reação com peroxidase de raiz forte e a partir da

reação com FeCl₃), conocarpano *cis* e *trans* separadamente, e o produto de reação enzimática. Foi também analisado quanto à composição enantiomérica a licarina-A sintética e o produto de dimerização enzimática de *E*-isoeugenol. Foram utilizadas as seguintes condições de análise:

-Aparelho: HP 1050 e Shimadzu LC-10.

-Coluna OD-H, 5 μm 150 x 4,6 mm.

-Fase móvel: hexano/etanol 97:3

-Fluxo: 1 mL/min

-Detecção: 280 nm

-Vol. de injeção : 50 μL

3.5.7. Especificidade da fração enzimática ao substrato

Após o estabelecimento da enantiosseletividade da conocarpano sintase, foi necessário determinar a especificidade quanto ao substrato, para verificar se a enzima é capaz de dimerizar fenilpropanóides oxidados no C-9, como o álcool *p*-cumárico, levando à formação de uma lignana análoga ao conocarpano, porém oxidada no C-9 e 9' (Figura 31), ou se esta enzima é específica para propeniifenóis, conforme Gottlieb (Gottlieb 1974 e 1978).

Para este tipo de análise foi necessária a purificação parcial da conocarpano sintase, para se eliminar a presença de enzimas interferentes. Além da purificação, foi necessária também a obtenção do dímero do álcool *p*-cumárico, que foi utilizado como referência.

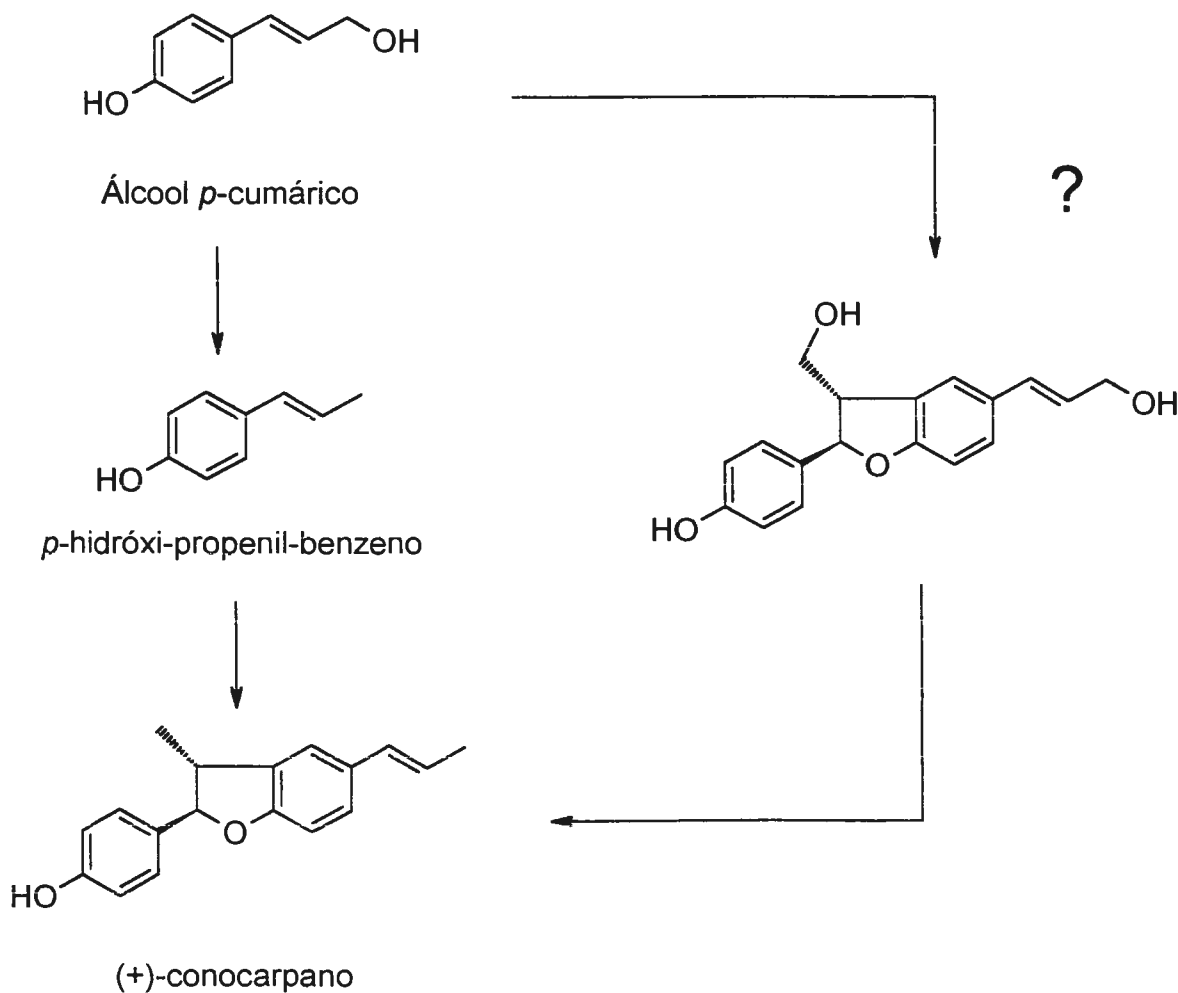


Figura 31: Esquema de biossíntese do conocarpano

Purificação parcial por filtração em gel: Realizou-se o procedimento de extração da enzima em tampão K-Pi 0,1 M pH=7,0, e após a segunda centrifugação, o extrato enzimático (5 mL) foi aplicado em porções de 2 mL à uma coluna de filtração em gel utilizando-se como suporte cromatográfico Sephacril S 200 HR. Optou-se por utilizar filtração em gel para separar as proteínas dos componentes de baixo peso molecular. O suporte mais utilizado é a Sephadex G-25 que exclui totalmente as proteínas (moléculas com PM acima de 5.000 Da), mas para haver o fracionamento das proteínas utilizou-se a Sephacril S 200 HR, que permite a resolução de proteínas na faixa de 2 a 300 KDa.

Durante a realização da coluna, o extrato enzimático foi eluído com tampão K-Pi 0,1M pH=7,0, contendo 2mM de EDTA e 1 mM de DTT a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Foram recolhidas 50 frações de 1 mL. As frações ímpares foram submetidas ao ensaio de dosagem de proteínas totais pelo método de Peterson e as frações pares foram submetidas ao ensaio enzimático.

Ensaio enzimático: Foram localizadas as frações que continham a conocarpano sintase, e estas frações foram submetidas aos ensaios enzimáticos utilizando-se como precursores ácido *p*-cumárico (20 mM) e álcool *p*-cumárico (20 mM).

Obtenção do dímero do álcool *p*-cumárico: Para se ter referência em CLAE do produto de dimerização do álcool *p*-cumárico, este foi obtido a partir da reação do álcool com FeCl₃: 100 mg de álcool *p*-cumárico foram dissolvidos em 1mL de EtOH + 1 mL de H₂O destilada; foram adicionados 150 mg de FeCl₃, a reação foi então agitada por 12 horas, e o produto da reação foi extraído com Et₂O. O produto foi posteriormente purificado em CPP utilizando-se um sistema de eluente: hexano:AcOEt (7:3), e foi submetido à espectrometria de massas mostrando um íon do pico molecular de 300 m/z. Este mesmo produto foi analisado por CLAE na condição de análise pré-estabelecida.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas

Fenilpropanóides: As análises dos espectros de RMN-¹H dos fenilpropanóides isolados permitiu atribuir-lhes as estruturas do dilapiol (FP-1) (Bernhard *et al.* 1978), apiol (FP-2) (Bernhard *et al.* 1978), e miristicina (FP-3) (Nair *et al.* 1990) (Figura 32). O espectro de RMN-¹H destas substâncias revelou, além dos sinais de metoxilas e grupos metilenodioxifenílicos, sinais de hidrogênios alílicos: (*dd*) ~3,2 (1,5; 6,7 Hz) referente ao H-7, e olefínicos ~5,8 (*m*) (H-8) e (2 *dd*) ~5,0 referentes aos protons H-9a e H-9b.

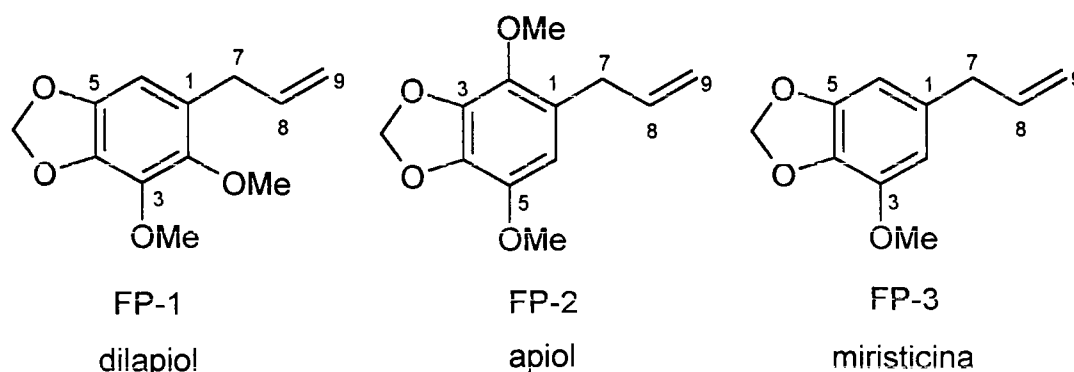


Figura 32: Fenilpropanóides isolados de *P. regnellii*

Neolignanas: Foram identificadas quatro neolignanas do tipo di-hidrobenzofurânicas (Ne-1 - Ne-4), (Figura 33); três neolignanas do tipo eupomatenóides (Ne-5 - Ne-7) (Figura 34); e três dinor-neolignanas (DN-1 - DN3) (Figura 35).

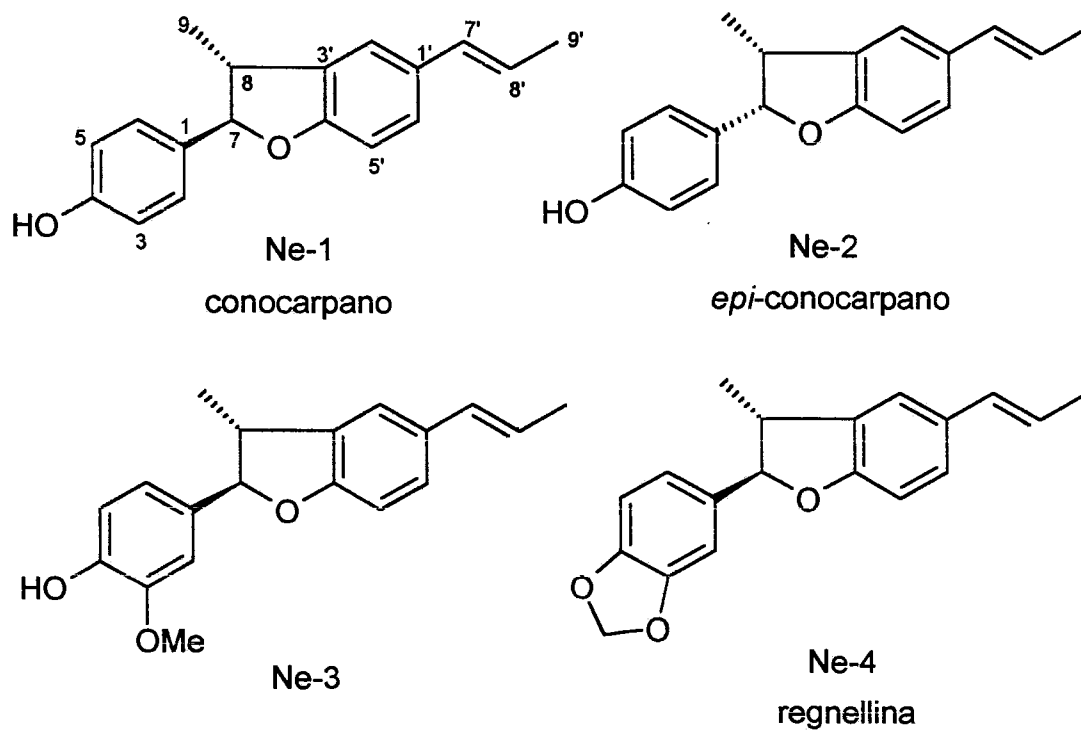


Figura 33: Neolignanas di-hidrobenzofurânicas isoladas de *P. regnellii*

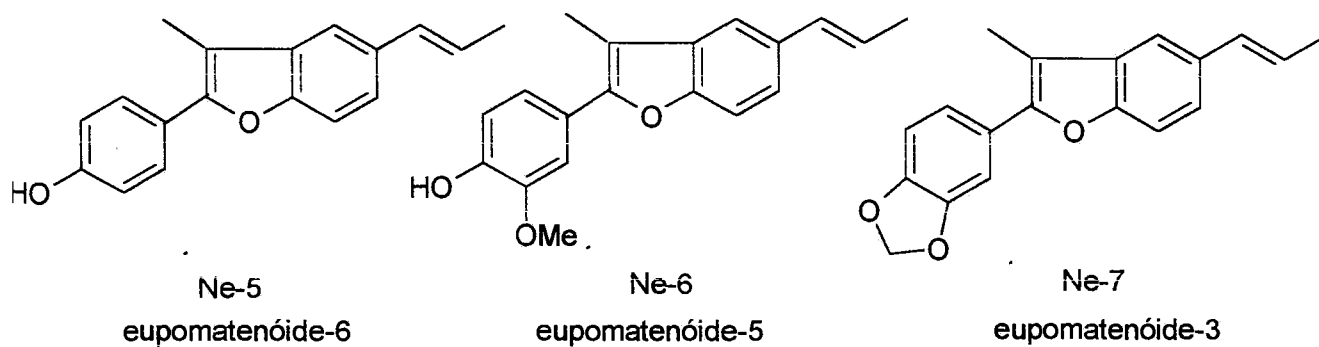


Figura 34: Neolignanas benzofurânicas isoladas de *P. regnellii*

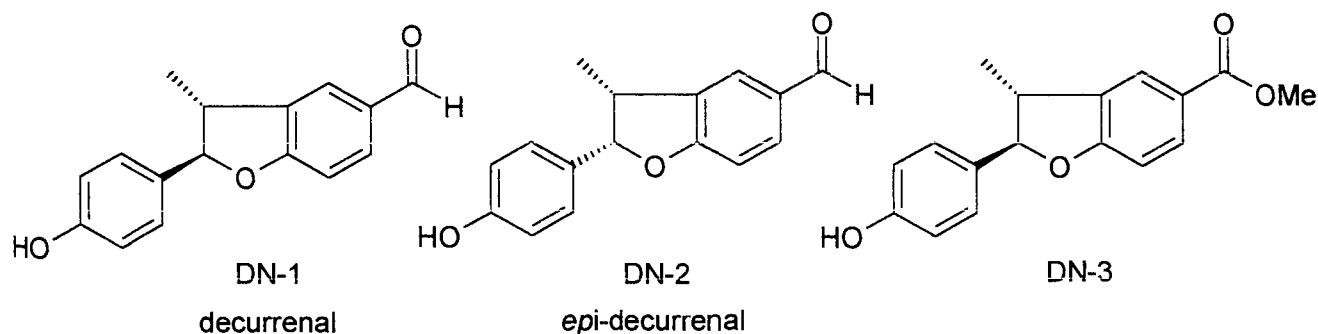


Figura 35: Dinor-neolignanas isoladas de *P. regnellii*

Essas neolignanas tiveram suas estruturas determinadas através dos sinais observados no espectro de RMN-¹H, e a partir de dados da literatura que as identificaram como sendo o conocarpano (Ne-1) (Hayashi e Thomson, 1975; Chauret *et al.* 1996), Ne-3 (Achenbach *et al.* 1987), eupomatenóide-6 (Ne-5), eupomatenóide-5 (Ne-6), eupomatenóide-3 (Ne-7) (Bowden *et al.* 1972; Arnason *et al.* 1996), decurrenal (DN-1) (Chauret *et al.* 1996). As demais neolignanas, Ne-2, Ne-4, DN-2 e DN-3, não haviam sido relatadas na literatura até então, e as suas estruturas foram deduzidas a partir dos dados de RMN-¹H a 300 MHz, RMN-¹³C (Benevides, 1996), análise elementar e de medidas espectropolarimétricas (DC).

A fórmula molecular para a neolignana Ne-2 foi estabelecida como C₁₈H₁₈O₂ baseado nos dados de espectrometria de massas (M⁺ 266), análise elementar (81,43% C e 6,72% H), e dados de RMN-¹H e ¹³C. Seu espectro de RMN-¹H revelou sinais em δ 5,73 (*d*, 8,8 Hz, H-7), δ 3,61 (*dq*, 7,2; 8,8 Hz, H-8) e 0,82 (*d*, 7,2 Hz, H-9), que indicaram um sistema *cis*-7-aryl-8-metil-dihidrobenzofurânico (Lima *et al.* 1972). A configuração *E* para o grupo propenil ficou evidente pela presença de um sistema AMX₃ [δ 6,36 (*dd*, 1,4; 15,0 Hz, H-7'), 6,08 (*dq*, 6,6; 15,0 Hz, H-8') e 1,85 (*dd*, 1,4, 6,6 Hz, H-9')]. As constantes de acoplamento *orto* observadas entre H-2/H-6 a 7,26 Hz (*d*, 8,5 Hz) e H-3/H-5 a 6,80 (*d*, 8,5 Hz) identificaram o padrão de substituição do anel aromático como sendo

idêntico ao do conocarpano. Esta neolignana foi então estabelecida como sendo o epímero do conocarpano no C-7, sendo denominada de *epi*-conocarpano.

A neolignana Ne-4 teve sua fórmula molecular determinada como sendo $C_{19}H_{18}O_3$ baseado nos dados de espectrometria de massas (M^+ a 294), análise elementar (77,63% C e 6,32% H) e RMN de 1H e ^{13}C . A análise de seu espectro de RMN- 1H permitiu a identificação de um sistema *trans*-7-aryl-8-metil-7,8-hidrobenzofurânico [δ 4,98 (*d*, 8,7 Hz, H-7), 3,28 (*dq*, 6,8, 8,7 Hz, H-8) e 1,32 (*d*, 6,8 Hz, H-9)]. A presença do grupo metilenodioxifenílico foi inferida pelo singlete a δ 5,89. Essa neolignana, sendo inédita na literatura foi denominada regnellina.

A dinor-neolignana DN-2 com fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ (confirmada por EM que apresentou um íon molecular 254 *m/z*) teve sua estrutura identificada como sendo o epímero no C-7 do decurrenal (DN-1), previamente isolado de *P. decurrens* (Chauret *et al.* 1996) e também de *P. regnellii*. A presença do grupo aldeídico foi estabelecida baseada na presença de um sinal a δ 9,86 no espectro de RMN- 1H . A presença da carbonila aldeídica foi confirmada pelo espectro de IV (banda em 1689 cm^{-1}). O estabelecimento da configuração *cis* entre os grupos metila e arila foi baseada no deslocamento químico correspondente aos prótons oxibenzílico, metínico e metilênicos similares aos observados para o *epi*-conocarpano.

A dinor-neolignana DN-3, com fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$, mostrou em seu espectro de RMN- 1H sinais similares ao do conocarpano, exceto para os sinais correspondentes à porção propenila, que foram substituídos por um singlete correspondente a um éster metílico. Este grupo funcional foi confirmado pelo espectro de RMN- ^{13}C no qual há sinais correspondentes à carbonila de éster em δ 190,9 e de uma metoxila alifática em δ 50,5, e também pelo espectro de IV que apresentou uma banda em 1720 cm^{-1} . O éster foi localizado na posição C-7' baseado nas similaridades dos deslocamentos químicos correspondentes ao sistema di-hidro-benzofurânico e pelo efeito de desproteção causado pela carbonila nos hidrogênios H-2' (δ 7,75) e H-6' (δ 7,74) no espectro de RMN- 1H . Desta maneira, a estrutura de DN-3 foi estabelecida como (7*R*,8*R*)-4-hidroxi-8',9'-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignana-7'-ato de metila.

As configurações absolutas para essas neolignanas foram estabelecidas baseadas no sinal do efeito Cotton observadas nas curvas de dicroísmo circular (CD). As neolignanas com configuração *trans* em C-7/C-8 mostraram um efeito Cotton positivo a 260 e 242 nm, respectivamente, correspondendo a *7R* e *8R*, enquanto as neolignanas Ne-2 e DN-2 com configuração *cis* em C-7/C-8, mostraram um efeito Cotton negativo a 243 e 275 nm, respectivamente, correspondendo a *7S* e *8R* (Gottlieb *et al.* 1977 e Aiba *et al.* 1977).

4.1.2. Análise por CG

A Tabela 9 mostra os t_R dos padrões isolados de *P. regnellii*, e a % de pureza estabelecidos em CG.

Tabela 9: t_R dos padrões isolados

Substância	t_R (min) - CG	% pureza
FP-1 / FP-2	10,848 / 10,169	45,7 / 46,5
FP-3	8,935	94,8
Ne-1 / Ne-2	18,658 / 18,790	60,4 / 39,6
Ne-3	19,132	81,8
Ne-4	19,262	83,7
Ne-5	20,997	51,5
Ne-6	21,363	85,6
Ne-7	20,885	91,2
DN-1 / DN-2	18,592 / 18,804	79,3 / 14,1
DN-3	19,042	61,3

Tabela 10: Dados obtidos(δ , multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ^1H dos fenilpropanóides isolados de *P. regnellii*.

Hidrogénios	FP-1 (dilapiol)	FP-2 (apiol)	FP-3 (miristicina)
H - 2	-	6,28 (1H, s)	6,32 (1H, d, 1,4 Hz)
H - 6	6,23 (1H, s)	-	6,28 (1H, d, 1,4 Hz)
H - 7	3,24 (2H, dd, 1,5; 6,6 Hz)	3,24 (2H, dd, 1,5; 6,6 Hz)	3,22 (2H, d, 6,7 Hz)
H - 8	5,79 (1H, m)	5,81 (1H, m)	5,85 (1H, m)
H - 9a	4,96 (1H, dd, 1,5; 9,0 Hz)	4,96 (1H, dd, 1,5; 9,0 Hz)	4,99 (1H, dd, 1,7; 8,0 Hz)
H - 9b	4,97 (1H, dd, 1,5; 15,4 Hz)	4,97 (1H, dd, 1,5; 15,4 Hz)	5,01 (1H, dd, 1,7; 17,1 Hz)
OMe 2	3,68 (3H, s)	3,78 (3H, s)	3,81 (3H, s)
OMe 3	3,94 (3H, s)	3,80 (3H, s)	-
OCH ₂ O	5,88 (2H, s)	5,86 (2H, s)	5,86 (2H, s)

Tabela 11: Dados obtidos(δ , multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ^1H das neolignanas Ne-1 a Ne-4 (CDCl_3 , δ , 300 MHz)

Hidrogênios	Ne-1(conocarpano)	Ne-2(epi-conocarpano)	Ne-3	Ne-4 (regnellina)
H-2	7,26 (1H, d, 8,5 Hz)	7,26 (1H, d, 8,5 Hz)	6,68 (1H, d, 1,1 Hz)	6,67 (1H, d, 1,7 Hz)
H-3	6,80 (1H, d, 8,5 Hz)	6,80 (1H, d, 8,5 Hz)	-	-
H-5	6,80 (1H, d, 8,5 Hz)	6,80 (1H, d, 8,5 Hz)	6,74 (1H, d, 7,7 Hz)	6,72 (1H, d, 7,5 Hz)
H-6	7,26 (1H, d, 8,5 Hz)	7,26 (1H, d, 8,5 Hz)	6,70 (1H, dd, 1,1; 7,7 Hz)	6,70 (1H, dd, 1,7; 7,5 Hz)
H-7	5,07 (1H, d, 8,8 Hz)	5,73 (1H, d, 1,8 Hz)	4,99 (1H, d, 9,1 Hz)	4,98 (1H, d, 8,7 Hz)
H-8	3,43 (1H, dq, 7,3; 7,8 Hz)	3,61 (1H, dq, 7,2; 8,8 Hz)	3,30 (1H, dq, 6,8; 9,1 Hz)	3,28 (1H, dq, 6,8; 8,7 Hz)
H-9	1,40 (3H, d, 7,2 Hz)	0,82 (3H, d, 7,2 Hz)	1,33 (3H, d, 6,8 Hz)	1,32 (3H, d, 6,8 Hz)
H-2'	7,14 (1H, d, 1,8 Hz)	7,14 (1H, d, 1,8 Hz)	6,83 (1H, d, 2,0 Hz)	6,84 (1H, d, 1,5 Hz)
H-5'	6,75 (1H, d, 7,4 Hz)	6,75 (1H, d, 7,4 Hz)	7,05 (1H, d, 7,6 Hz)	7,04 (1H, d, 7,4 Hz)
H-6'	7,12 (1H, d, 7,4 Hz)	7,12 (1H, d, 7,4 Hz)	6,81 (1H, d, 2,0; 7,6 Hz)	6,80 (1H, dd, 1,6; 7,4 Hz)
H-7'	6,36 (1H, dd, 1,4; 15,0 (Hz)	6,36 (1H, dd, 1,4; 15,0 (Hz)	6,30 (1H, dd, 1,6; 15,0 (Hz)	6,29 (1H, dd, 1,5; 15,0 Hz)
H-8'	6,08 (1H, dq, 6,6; 15,0 Hz)	6,08 (1H, dq, 6,6; 15,0 Hz)	6,02 (1H, dq, 6,6; 15,0 Hz)	6,01 (1H, dq, 6,6; 15,0 Hz)
H-9'	1,85 (3H, dd, 1,4; 6,6 Hz)	1,85 (3H, dd, 1,4; 6,6 Hz)	1,79 (3H, dd, 1,6; 6,6 Hz)	1,79 (1H, dd, 1,6; 6,6 Hz)
OMe / OCH ₂ O	-	-	3,81 (1H, s)	5,89 (2H, s)

Tabela 12: Dados obtidos(δ , multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ^1H das neolignanas Ne-5 a Ne-6 (CDCl_3 , δ , 300 MHz)

Hidrogênios	Ne-5 (eupomatenóide-6)	Ne-6 (eupomatenóide-5)	Ne-7 (eupomatenóide-3)
H-2	7,2 (1H, m)	7,23 (1H, d, 2,0 Hz)	7,20 (1H, d, 1,8 Hz)
H-3	6,8 (1H, m)	-	-
H-5	6,8 (1H, m)	6,94 (1H, d, 8,2 Hz)	6,84 (1H, d, 8,6 Hz)
H-6	7,2 (1H, m)	7,24 (1H, d, 2,0; 8,2 Hz)	7,22 (1H, d, 1,8; 8,5 Hz)
H-9	2,35 (3H, s)	2,37 (3H, s)	2,35 (3H, s)
H-2'	6,8 (1H, m)	7,36 (1H, d, 1,5 Hz)	7,36 (1H, d, 1,5 Hz)
H-5'	7,2 (1H, m)	7,30 (1H, d, 8,5 Hz)	7,29 (1H, d, 8,4 Hz)
H-6'	6,8 (1H, m)	7,20 (1H, d, 1,5; 8,5 Hz)	7,18 (1H, d, 1,5; 8,4 Hz)
H-7'	6,40 (1H, d, 18,0Hz)	6,44 (1H, dd, 1,5; 15,7 Hz)	6,45 (1H, dd, 1,6; 15,7 Hz)
H-8'	6,10 (1H, m)	6,16 (1H, dq; 6,6; 15,7 Hz)	6,16 (1H, dq; 6,6; 15,7 Hz)
H-9'	1,80 (3H, dd, 6; 1,6 Hz)	1,84 (3H, dd, 1,6; 6,6 Hz)	1,84 (3H, dd, 1,6; 6,6 Hz)
OMe	-	3,92 (3H, s)	-
OH	5,60 (1H, s/l)	5,67 (1H, s/l)	-
OCH ₂ O	-	-	5,95 (2H, s)

Tabela 13: Dados obtidos(δ , multiplicidade, J) nos espectros de RMN- ^1H das neolignananas DN-1 a DN-3 (CDCl_3 , δ , 300 MHz)

Próton	DN-1(decurrenal)	DN-2 (epi-decurrenal)	DN-3
H-2	7,29 (1H, dd, 1,9; 6,6 Hz)	7,29 (1H, dd, 1,9; 6,6 Hz)	7,30 (1H, dd, 1,8; 6,8 Hz)
H-3	6,86 (1H, dd, 2,0; 6,6 Hz)	6,86 (1H, dd, 2,0; 6,6 Hz)	6,83 (1H, dd, 1,8; 6,8 Hz)
H-5	6,86 (1H, dd, 2,0; 6,6 Hz)	6,86 (1H, dd, 2,0; 6,6 Hz)	6,83 (1H, dd, 1,8; 6,8 Hz)
H-6	7,29 (1H, dd, 1,9; 6,6 Hz)	7,29 (1H, dd, 1,9; 6,6 Hz)	7,30 (1H, dd, 1,8; 6,8 Hz)
H-7	5,22 (1H, d, 8,7 Hz)	5,89 (1H, d, 9,0 Hz)	5,20 (1H, d, 8,5 Hz)
H-8	3,47 (1H, dq, 6,9; 7,7 Hz)	3,64 (1H, dq, 6,8; 9,0 Hz)	3,40 (1H, dq, 7,0; 8,5 Hz)
H-9	1,44 (1H, d, 6,8 Hz)	0,99 (3H, d, 6,8 Hz)	1,34 (3H, d, 7,0 Hz)
H-2'	7,73 (1H, d, 1,7 Hz)	7,73 (1H, d, 1,7 Hz)	7,75 (1H, d, 1,7 Hz)
H-5'	6,94 (1H, d, 8,7 Hz)	6,94 (1H, d, 8,7 Hz)	6,90 (1H, d, 9,0 Hz)
H-6'	7,29 (1H, dd, 1,7; 8,7 Hz)	7,29 (1H, dd, 1,7; 8,7 Hz)	7,74 (1H, dd, 1,7; 9,0 Hz)
CHO	9,86 (1H, s)	9,86 (1H, s)	-
OMe	-	-	3,50 (3H, s)

4.2. Estudo biossintético

4.2.1. Doseamento de PAL em folhas de *P. regnellii*

A partir do cromatograma em CLAE do extrato (Figura 36), foi calculada a área do pico de ácido cinâmico e do padrão interno (metil-umbeliferona). A atividade enzimática foi expressa em katal por mL de homogenato. Katal é definido como a conversão de 1 mol de substrato por segundo. Esta atividade foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Act PAL} = \frac{(A_{\text{ac. cin.}} / A_{\text{p. i.}}) - (A_{\text{ac. cin.}} / A_{\text{p. i. brco}}) \times \text{qtidade p. i.}}{R \times \text{min incubados} \times 60 \times \text{Vol}_{\text{extr}}}$$

$$\text{Act PAL} = 5,31 \cdot 10^{-3} \text{ nkatais / mL}_{\text{ext}}$$

Onde: A ac. cin. = área do pico do ácido cinâmico (no cromatograma) = 23.841

A p. i. = área do pico do padrão interno - metilumbeliferona (no cromatograma) = 159.289

quantidade p. i. = 50 nmol

R = fator de correção para o ensaio = 3,9155

Vol_{ext} = volume de extrato = 0,2 mL

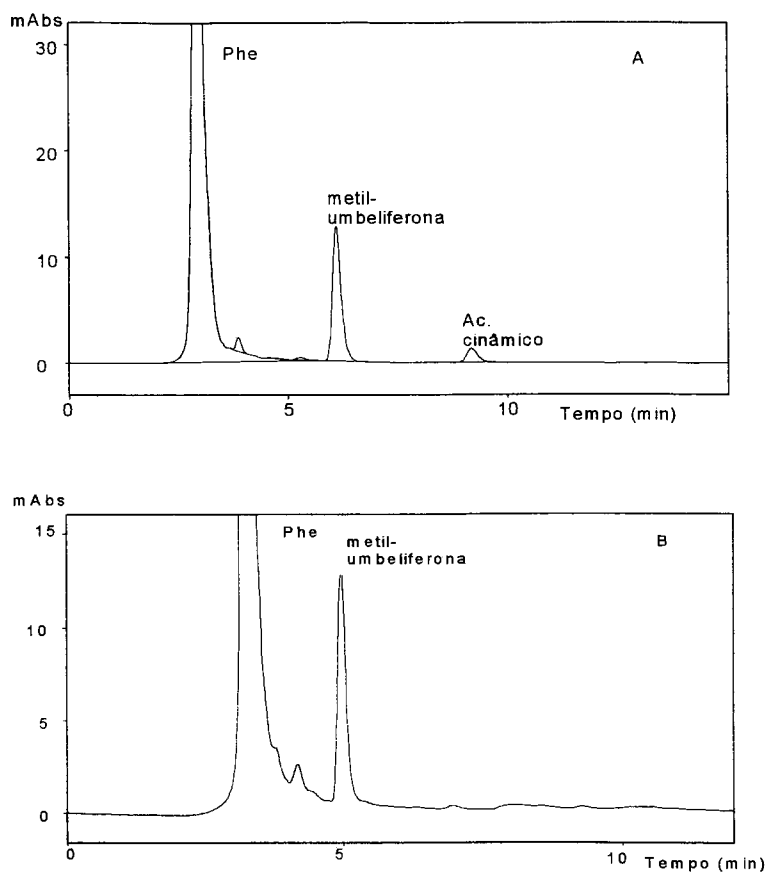


Figura 36: Análise por CLAE do ensaio da PAL A: t=30 min, B: t=0.

Para a obtenção da atividade específica da PAL, foi necessário determinar a quantidade de proteínas totais (mg). Este dado foi fornecido realizando-se a dosagem de proteínas totais pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

Dosagem de proteínas totais: Foi obtida uma curva-padrão para BSA a ser utilizada na dosagem de proteínas totais (Figura 37).

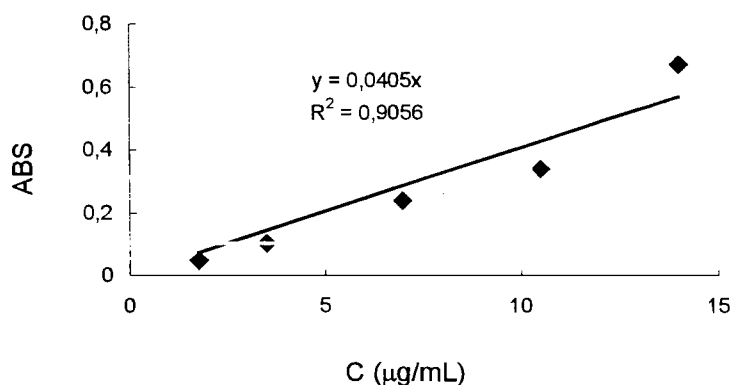


Figura 37: Curva-padrão da BSA para o ensaio de Bradford

O espectrofotômetro foi zerado com uma solução de 300 μL do corante dissolvido em 1190 μL do tampão-borato, e no ensaio foram acrescentados 10 μL do extrato enzimático. Foram lidas as absorvâncias a 595 nm e o valor médio das absorvâncias foi de 0,644. Utilizando-se a equação da reta da curva-padrão da BSA foi determinada a quantidade de proteínas totais da seguinte maneira:

$$\text{Abs} = 0,0404 C$$

$$C = 15,94 \mu\text{g/mL}$$

Como foram incubados 1,5 mL:

$$\text{Qtidade de prot.} = 23,91 \mu\text{g}$$

$$\text{Qtidade de prot.} = 2,39 \cdot 10^{-2} \text{ mg}$$

Logo:

$\text{Act esp./mg proteína} = 0,22 \text{ nKat/mg proteína}$

Essa atividade observada para folhas de *P. regnellii*, mostrou-se relativamente alta quando comparada com outras espécies descritas na literatura, onde se observa a atividade de PAL da ordem de $\mu\text{Kat/mg}$ proteína (Messner *et al.* 1991, Moreno *et al.* 1994).

4.2.2. Ensaios Biossintéticos

Estabelecimento de uma condição em CLAE: Foram separadas as neolignananas presentes em folhas de *P. regnellii*. O perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 38.

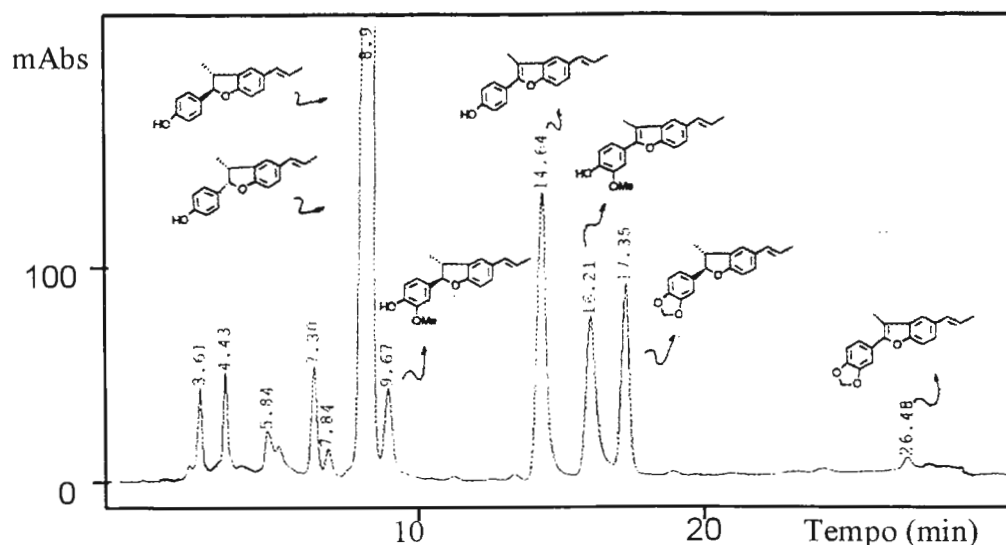


Figura 38: perfil cromatográfico em CLAE do extrato de folhas de *P. regnellii*

Estabelecimento do protocolo da extração enzimática: Para o estabelecimento foi necessário fazer algumas considerações. Durante o processo de obtenção do extrato enzimático e as etapas de purificação subsequente, seria possível que a atividade da enzima de interesse fosse perdida, então considerou-se alguns fatores para que isso não ocorresse, entre os quais:

Controle de proteases: A degradação das proteínas por proteases endógenas representa um sério problema, portanto deve-se incluir inibidores de proteases durante a extração, e no caso o inibidor utilizado foi o EDTA 2 mM (Price, 1996).

Proteção de grupos tióis: Os grupos tióis de certas enzimas podem ser danificados durante a extração pela oxidação ou pela reação com íons de metais pesados. A remoção das enzimas do ambiente redutor de dentro das células e a exposição ao oxigênio pode levar à formação de pontes dissulfeto ou de espécies

oxidadas tais como ácidos sulfínicos. Íons de metais pesados (tais como Cu, Pb, Hg) provenientes da água, reagentes ou equipamentos usados no procedimentos de extração podem inativar a enzima por reação com cisteínas das cadeias laterais. Estes problemas no caso deste protocolo foram superados pela inclusão do reagente redutor (DTT 1mM) e ainda com a adição EDTA 2mM no meio de extração, ocorre um aumento de estabilidade desta solução contendo o agente redutor, e também este fornece uma proteção contra uma variedade de íons de metais pesados, pela sua propriedade quelante, além de inibir metalo-proteases com foi relatado no item acima.

Eliminação dos metabólitos secundários: Os compostos fenólicos endógenos foram removidos do extrato enzimático pela complexação com PVPP adicionado durante a extração enzimática, e também pela dessalinização por filtração em gel (PD-10), que retém os componentes de baixo peso molecular.

Detergente: Após a primeira centrifugação, obsevou-se que o resíduo solúvel não apresentava atividade enzimática para a conocarpano sintase. Supos-se então que se tratava de uma enzima associada à membrana. Com o objetivo de solubilizar esta enzima, foi utilizado o detergente Triton X-100 (Figura 39). Este permaneceu na fração enzimática responsável pela conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno, porém o mesmo não interferiu no ensaio, e foi detectado na análise por CLAE.

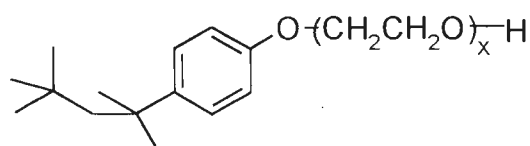
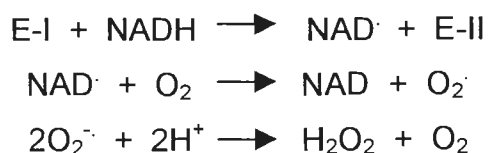
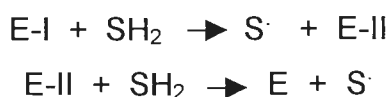


Figura 39: Estrutura do Triton X-100

Cofatores: Em plantas a oxidação de fenóis é catalisada por enzimas de parede celular (peroxidases), e é sugerido que o NADH endógeno seja a fonte de H₂O₂ (Halliwell e Guttridge, 1989) pela reação com peroxidases:



No caso do sistema *in vitro* utilizado para monitorar a conocarpano sintase, foi utilizado um homogenato celular, sendo que alguma via enzimática poderia estar sendo inibida, por isso foi necessário o fornecimento de H₂O₂ para que a reação ocorresse. Desta maneira H₂O₂ iniciou a reação com a enzima, e esta perdeu 2 elétrons para formar o composto E-I, este composto então oxidou o substrato formando o substrato radical e o composto E-II. Este para regenerar deveria oxidar outra molécula do substrato:



No sistema *in vitro* foi observada a presença de radicais hidroxila (OH[·]), isto pode ser explicado pela formação de NAD[·] (oxidado), que a partir da reação com O₂ forma o ânion superóxido, que então na presença de traços de metais reagiria com H₂O₂ formando os radicais OH[·]. Mas na planta provavelmente isto não ocorre, e isto é apenas uma sugestão para explicar a presença de radicais OH[·].

A presença de um radical HO[·] formada foi confirmada pela obtenção do espectro de EPR, utilizando-se um "trapeador" específico para este tipo de radical (dados não mostrados). Os espectros de EPR mostraram linhas relativas à formação de radicais, mas não foi possível atribuir os sinais à radicais específicos, pois o extrato enzimático não estava suficientemente purificado.

Dosagem de proteínas: Na extração da enzima responsável pela dimerização do *p*-hidróxi-propenil-benzeno, utiliza-se Triton X-100, que interfere no ensaio de Bradford, portanto optou-se por utilizar outro ensaio para a determinação de proteínas totais no extrato enzimático, o ensaio selecionado foi o baseado no método de Peterson (Peterson *et al.* 1997). Este método baseia-se em um ensaio colorimétrico para medir a concentração de proteínas solubilizadas por detergente. A reação é similar ao método de Lowry (Lowry *et al.* 1951) e alcança 90% do máximo do desenvolvimento de cor dentro de 15 min. Ela é baseada na reação da proteína com solução de tartarato cúprico e reagente de Folin sendo que há dois passos que levam ao desenvolvimento de cor: a reação entre proteína e o cobre no meio alcalino e subsequente redução do reagente de Folin pela proteína tratada com cobre. O desenvolvimento de cor é primeiramente devido aos aminoácidos tirosina e triptofano e, em menor extensão, cistina, cisteína e histidina. O efeito da proteína na redução do reagente de Folin é devido a perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, portanto produzindo uma ou mais espécies reduzidas que tem uma cor característica azul com o máximo de absorbância em 750 nm e mínimo de absorbância a 405 nm.

Conversão dos substratos: A partir do cromatograma obtido em CLAE para os extratos que foram incubados com o *p*-hidróxi-propenil-benzeno, observou-se o aparecimento de uma substância com $t_R=8,92$ min (correspondente ao conocarpano) e a diminuição de intensidade do pico com $t_R=4,52$ min (correspondente ao *p*-hidróxi-propenil-benzeno) em relação ao branco (Figura 40). Admitindo-se que com uso de PVPP e a filtração em gel, as neolignanas endógenas seriam eliminadas, então o aparecimento do pico relativo ao conocarpano é atribuído à dimerização enzimática do *p*-hidróxi-propenil-benzeno. Esse produto enzimático foi submetido à EM, sendo que foi possível observar um pico de M^+ de 266 m/z, e outros picos característicos de sua fragmentação.

Através dos ensaios enzimáticos preparados a partir das folhas, foi possível observar que o *E*-isoeugenol foi transformado em uma substância principal ($t_R=8,22$ min) que foi identificada, através da análise do espectro de massas ES-EM M^+ 326 m/z, como sendo a neolignana benzofurânica licarina-A.

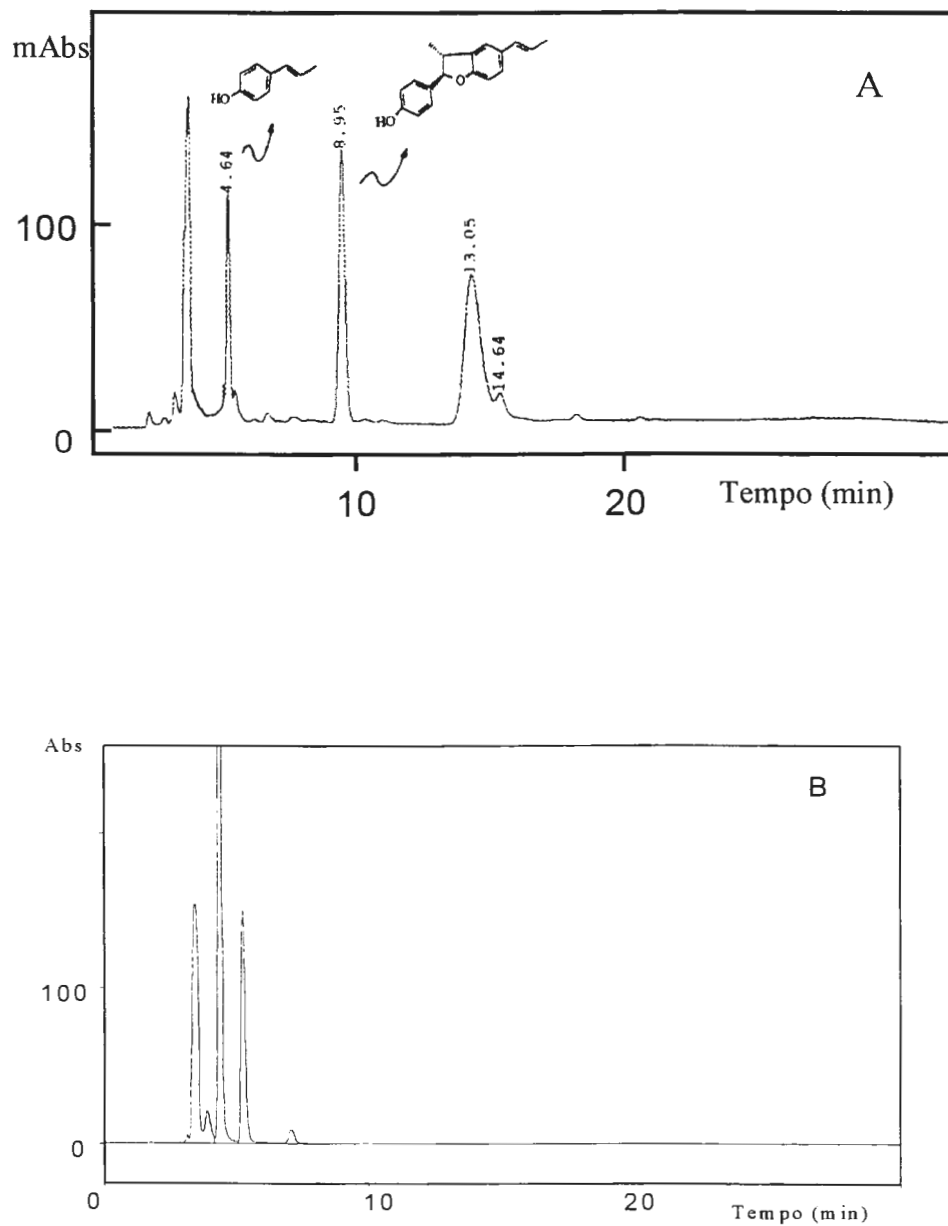


Figura 40: Análise por CLAE de A: produto de dimerização enzimática do *p*-hidróxi-propenil-benzeno, B: ensaio em branco

4.2.3. Quantificação da conversão

Curva de calibração do conocarpano + p.i.: A partir das áreas do conocarpano e do padrão interno obtidos no cromatograma foi construído um gráfico que correlaciona as duas áreas com a concentração, e o coeficiente angular desta reta foi utilizado nas medidas de atividade enzimática (Figura 41).

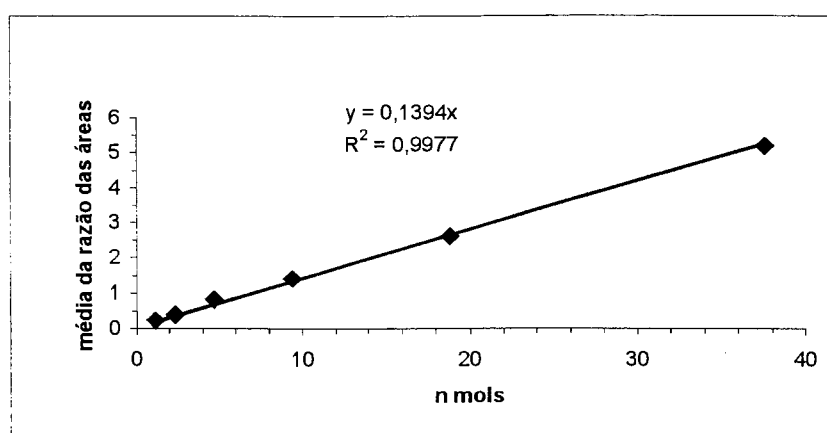


Figura 41: Curva de calibração do conocarpano+p.i.

Medida da atividade enzimática: A enzima que catalisa a conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano foi denominada conocarpano sintase (CS), e foi definida uma equação para medir a sua atividade:

$$\text{Act CS} = \frac{(A_{\text{con}}/A_{\text{p.i.}}) - (A_{\text{con-brco}}/A_{\text{p.i.-brco}}) \times \text{qtdade p.i.}}{R \times \text{min inc.} \times 60 \times \text{vol. extr.}}$$

onde:

A_{con} = área do conocarpano no cromatograma

$A_{\text{p.i.}}$ = área do padrão interno no cromatograma

$A_{\text{con-brco}}$ = área do conocarpano no controle

$A_{\text{p.i.-brco}}$ = área do padrão interno no controle

qtdade p.i. = quantidade de padrão interno adicionada na extração (433,5 nmol)

R = coeficiente angular da reta na curva de calibração do conocarpano + p.i.
(0,1394)

min inc. = tempo de incubação em minutos

vol. extr. = volume de extrato utilizado na incubação (0,2 mL)

Para se obter a atividade específica da CS, utiliza-se a quantidade de proteínas totais fornecida pelo ensaio de Peterson.

4.2.4. Otimização do ensaio

Foram definidos três parâmetros importantes para maximizar a conversão de *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano.

pH ótimo: Observa-se atividade máxima da CS no pH 7,0 (Figura 42), portanto o melhor tampão para a extração da conocarpano sintase foi o tampão K-Pi 0,1 M pH=7,0.

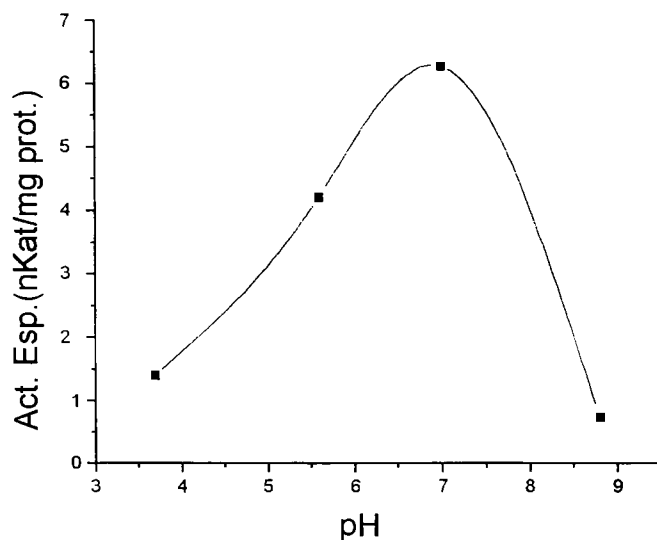


Figura 42: Curva de pH da conocarpano sintase

Saturação do substrato: Foi obtida uma curva da atividade específica da conocarpano sintase em função da concentração do substrato (Figura 43). A concentração do substrato onde ocorre saturação dos sítios ativos da enzima foi de 25 mM, mas optou-se trabalhar com a concentração de 20 mM, em decorrência da disponibilidade do substrato.

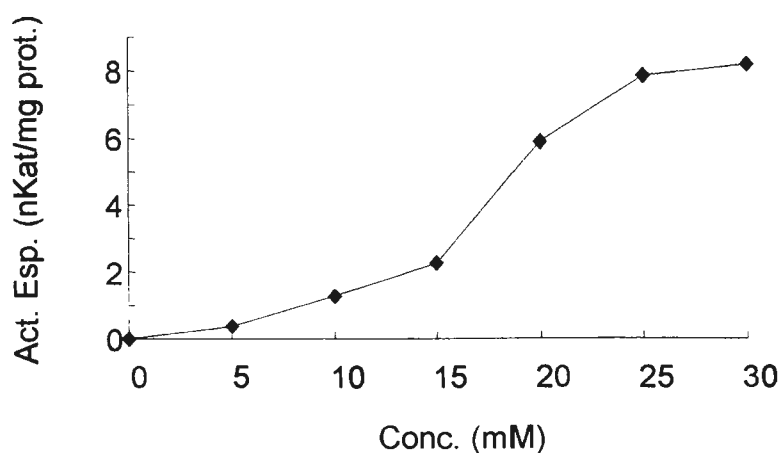


Figura 43: Curva de saturação do substrato

Cinética de reação: A formação enzimática do conocarpano atinge um patamar máximo em 10 min de reação (Figura 44), portanto é o tempo ótimo de reação.

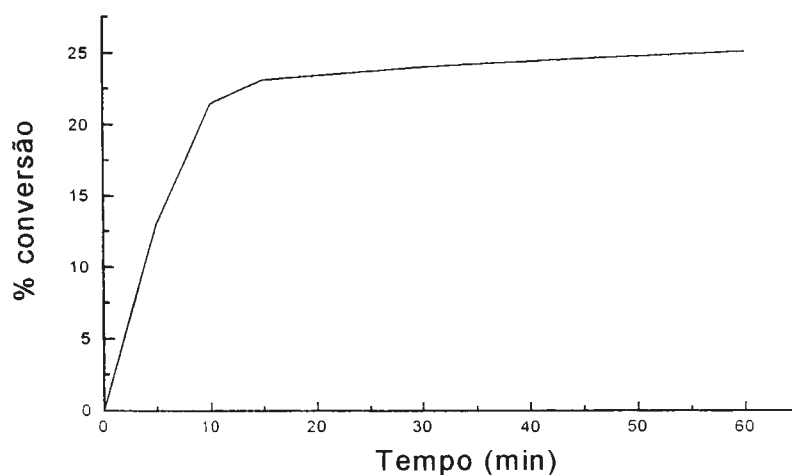


Figura 44: Cinética da conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano

4.2.5. Estudo da Enantiosseletividade da enzima

A análise através de cromatografia em fase quiral do conocarpano *cis* natural mostrou a presença exclusiva do enantiômero (-), o conocarpano *trans* revelou um ee de 90% da forma (+) (Benevides *et al.* 1999) (Figura 45). Na Figura 46-A está representado o conocarpano sintético obtido através da reação com FeCl₃, que mostrou ser uma mistura racêmica do conocarpano *trans* (mesmo perfil obtido a partir da reação com peroxidase de raiz forte). Não foi observada a formação do conocarpano *cis*, o que pode ser explicado em termos do alívio da compressão estérica entre a metila *cis* adjacente e a porção quinona (estrutura intermediária) pela rotação da ligação 7-8 antes da ciclização do intermediário (Gottlieb, 1978). Na figura 46-B está representado o conocarpano *cis/trans* natural, onde é observado o (-)-*epi*-conocarpano e o conocarpano *trans* com ee de 90%. E por fim, foi analisado o conocarpano obtido na reação enzimática (Figura 46-C), onde foi possível observar a formação do (-)-*epi*-conocarpano (100% ee) e do (+)-conocarpano (85% ee). O produto enzimático foi analisado a partir dos ensaios com as frações da conocarpano sintase semi-purificadas por filtração em gel. O conocarpano enzimático obtido a partir do ensaio com o extrato bruto revelou a formação do (+)-conocarpano com ee de 65%. Esses resultados revelaram a enantiosseletividade da conocarpano sintase. A cromatografia quiral revelou também que se forma o par racêmico da licarina-A na reação enzimática, levando à conclusão de que a enzima é uma peroxidase inespecífica, que converte fenóis, de uma forma geral, em dímeros.

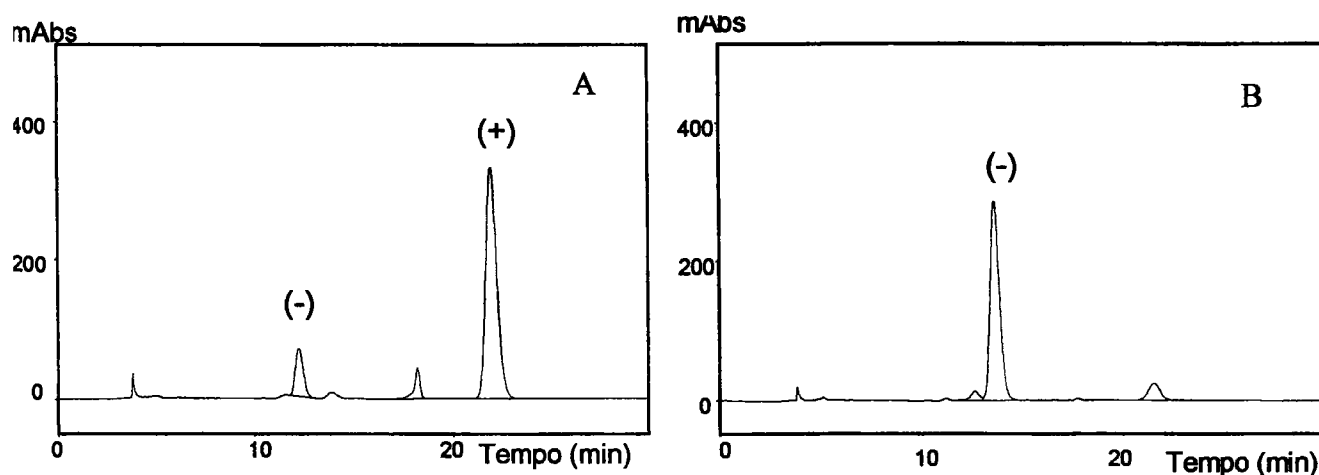


Figura 45: Cromatograma obtido em CLAE-quiral do A: conocarpano *trans* e B: conocarpano *cis*

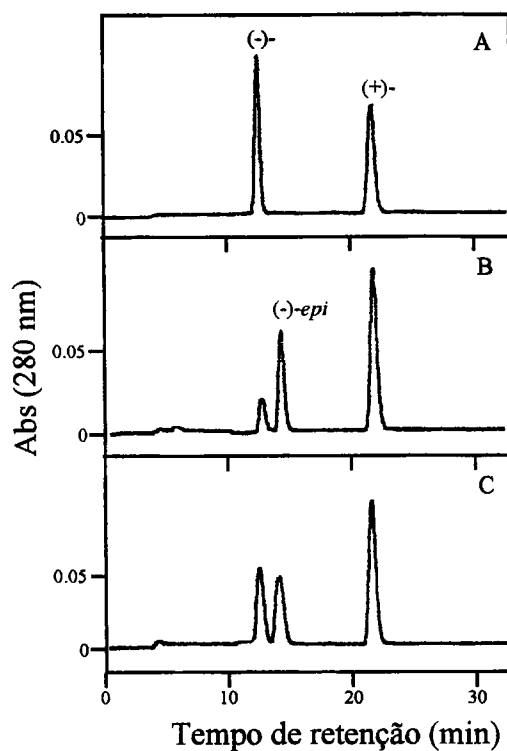


Figura 46: Análise do produto de dimerização enzimática através de CLAE-quiral, A: conocarpano sintético, B: conocarpano natural, C: conocarpano enzimaticamente produzido

4.2.6. Especificidade ao Substrato

As frações capazes de converter o *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano foram testadas frente à especificidade a outros substratos: ácido *p*-cumárico, álcool *p*-cumárico, para confirmar a proposta de Gottlieb de que neolignanas são produtos da dimerização de alil e propenil fenóis, não convertendo fenilpropanóides oxidados no C-9.

Análise do produto de dimerização do álcool *p*-cumárico: Este produto (Figura 47) foi obtido pela reação do álcool *p*-cumárico com FeCl₃, e foi analisado por CLAE, na mesma condição que o álcool *p*-cumárico (Figura 48) e por ES-EM, revelando um pico M⁺+1 299, referente a C₁₈H₁₈O₄. Este produto serviu de referência para o ensaio enzimático com o álcool *p*-cumárico.

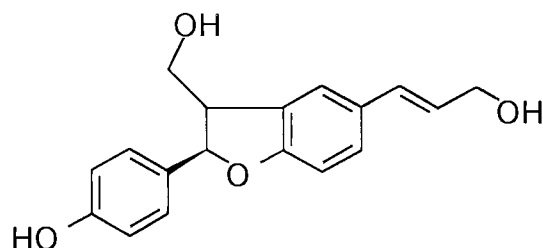


Figura 47: Produto de dimerização do álcool *p*-cumárico

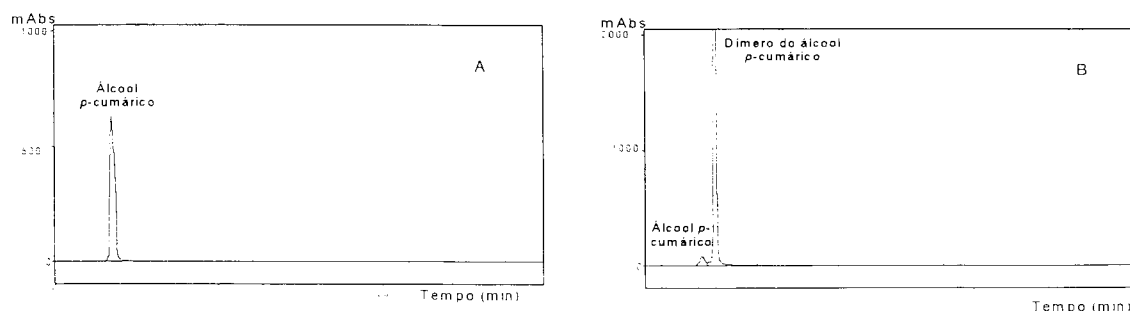


Figura 48: Cromatograma em CLAE-fase reversa de A: álcool *p*-cumárico, B: produto de dimerização do álcool *p*-cumárico

Purificação parcial da conocarpano sintase: A partir da análise dos cromatogramas foi calculada a atividade da conocarpano sintase em nKat/mL_{ext.}, para obter a atividade específica, o valor obtido foi dividido pela quantidade de proteínas totais obtidas pelo ensaio de Peterson. Observa-se que a atividade da CS é intensificada nas frações 22-34 (Figura 49).

Essas frações foram ensaiadas com o álcool *p*-cumárico e ácido *p*-cumárico, sendo que não foi observada a conversão do álcool *p*-cumárico e nem do ácido *p*-cumárico em nenhum produto. Conclui-se, então que a enzima conocarpano sintase é específica para propenil-fenóis.

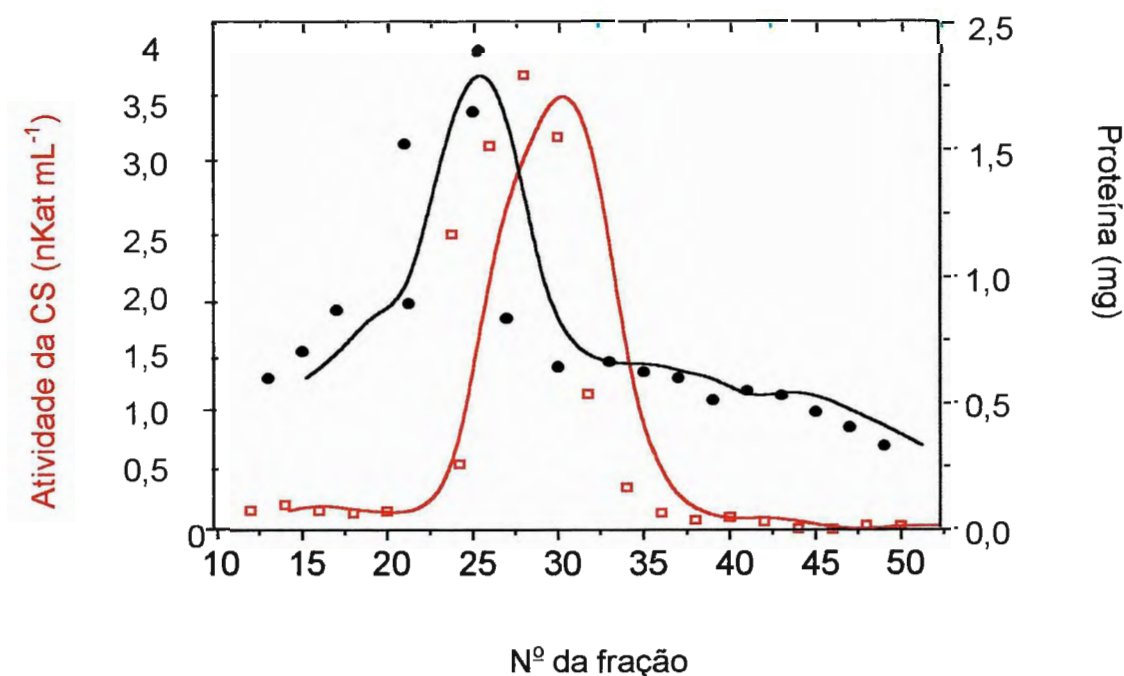


Figura 49: Purificação parcial da CS por filtração em gel Sephacril S 200 HR

5. Considerações Finais

Metabólitos secundários: Os dados obtidos a partir do isolamento e identificação estrutural dos metabólitos secundários presentes em *P. regnellii*, revelaram que esta espécie acumula principalmente substâncias oriundas da via do ácido chiquímico: fenilpropanóides e neolignanas benzofurânicas. As neolignanas pertencentes a esta sub-classe possui ocorrência restrita e têm sido bem descritas em espécies de Piperaceae como em *P. solmsianum* (Moreira *et al.* 1995), *P. aequale* (Maxwell *et al.* 1999) e outras (Jensen *et al.* 1993).

Estudo Biossintético: A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a ocorrência das neolignanas benzofurânicas em *P. regnellii* é determinada pela presença de uma enzima altamente enantiosseletiva, confirmado pela análise em CLAE quiral, que mostrou formação do enantiômero (+)-conocarpano (85% ee) e (-)-*epi*-conocarpano (100% ee) a partir do ensaio com frações semi-purificadas da conocarpano sintase. Esta enzima mostrou-se específica para o *p*-hidróxi-propenil-benzeno, uma vez que não dimerizou fenilpropanóides oxidados no C-9 (ácido e álcool *p*-cumárico). Esta é a primeira demonstração de uma enzima específica envolvida na biossíntese de neolignana como dímero de propenil-fenol, e fornece subsídios que apoiam a proposta de Gottlieb, de que neolignanas são dímeros de alil e propenilfenol (Gottlieb, 1974 e 1978).

Com esses resultados, pode-se propor a seguinte rota biossintética para essas neolignanas benzofurânicas, esquematizada na Figura 50. Esta tem início com a desaminação da fenilalanina (1) catalisada por PAL, que mostrou-se bastante ativa em folhas de *P. regnellii*. A partir desta reação origina-se o ácido cinâmico, que pode ser hidroxilado na posição para levando à formação do ácido *p*-cumárico (2), que pode então seguir por duas vias: ser novamente hidroxilado na posição *orto* a hidroxila levando a uma estrutura intermediária (ácido cafeico) e ser metilado nessa segunda hidroxila levando à formação do ácido ferulíco (3), ou então ser reduzido até o álcool *p*-cumárico (6), e este por sua vez pode ser

reduzido até o *p*-hidróxi-propenil-benzeno (**9**). Este último pode ser dimerizado para o (+)-conocarpano (**13**) e o seu isômero *cis* (-)-*epi*-conocarpano (**14**), pela ação da conocarpano sintase. Observa-se que a partir do álcool *p*-cumárico não se forma lignanas. O conocarpano, por sua vez, é o precursor das outras neolignanas monooxigenadas como o eupomatenóide-6 (**15**) que é desidrogenado nas posições 7 e 8, e o decurrenal (**16**) que teve a perda de dois átomos de carbono. As outras neolignanas como a **17** poderia ser obtida a partir do acoplamento cruzado entre *p*-hidróxi-propenil-benzeno e *E*-isoeugenol (**11**), e esta **17** seria o precursor da eupomatenóide-5 (**20**) e da regnellina (**21**). Foi observado também que o *E*-isoeugenol administrado à fração solúvel da folhas de *P. regnellii* foi dimerizado em licarina-A racêmica (**18**), mas ela pode ser considerada como sendo obtida pela dimerização não específica pela ação de peroxidases, uma vez que ela não é um produto natural de *P. regnellii*. O *E*-isoeugenol pode sofrer uma etapa adicional de hidroxilação/metilação resultando na formação de 5-metoxi-*E*-isoeugenol (**12**) e ser isomerizado ao alilfenol correspondente levando à formação dos fenilpropanóides miristicina (**23**), o dilapiol (**24**) e o apiol (**25**) em *P. regnellii*.

Outras etapas biossintéticas envolvendo as neolignanas derivadas do acoplamento oxidativo entre *p*-hidróxi-propenil-benzeno e *E*-isoeugenol requerem também o desenvolvimento de ensaios enzimáticos específicos para cada etapa. As confirmações das etapas de conversão poderão ser realizadas utilizando frações enzimáticas mais purificadas. Tal purificação poderá ser realizada utilizando-se etapas cromatográficas diversas, avaliando-se a conversão do *p*-hidróxi-propenil-benzeno em conocarpano.

6. Referências Bibliográficas

- Accatino L., Pizarro M., Solis N. e Koenig C. S. (1998). Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology*, **28**, 129-140.
- Achenbach, H., Groß, J., Dominguez, X. A., Cano, G., Star, J. V., Brussolo, L. D. C., Muñoz, G., Salgado, F. e Lopes, L. (1987). Lignans, neolignans and norneolignans from *Krameria cystisoides*. *Phytochemistry*, **26**, 1159-1166.
- Achenbach, H., Utz, W., Usubillaga, A. e Rodriguez, H. A. (1991). Lignans from *Krameria ixina*. *Phytochemistry*, **30**, 3753-3757.
- Ahmad, F., Bakar, S. A., Ibrahim, A. Z., Read, R. W. (1997). Constituents of the leaves of *Piper caninum*. *Planta Med.*, **63**, 193-194.
- Ahmad, F., Bakar, S. A., Read, R. W. (1998). Benzofurans from the leaves of *Piper magnibacum* C. DC.. *Chem. Res. Commun.*, **7**, 33-37.
- Alecio, A. C., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Kato, M. J., Furlan, M. (1998). Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 637-639.
- Alencar J. W., Craveiro A. A. e Matos F. J. A. (1984). Kovats indexes as a preselection routine in mass-spectra library searches of volatiles. *J. Nat. Prod.*, **47**, 890-892.
- Aiba, C. J., Alvarenga, M. A., Castro, O. C., Giesbrecht, A. M., Gottlieb, O. R. e Pagliosa, F. M. (1977). Benzofuranoid neolignans from *Aniba simulans*. *Phytochemistry* **16**, 741-743.
- Aiba, C. J., Fernandes, J. B., Gottlieb, O. R. e Maia, J. G. S. (1975). Neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry* **14**, 1597-1604.
- Aiba, C. J., Alvarenga, M. A., Castro, O. C., Giesbrecht, A. M., Gottlieb, O. R. e Pagliosa, F. M. (1977). Chemistry Brazilian Lauraceae.39. Benzofuranoid neolignans from *Aniba simulans*. *Phytochemistry* **16**, 741-743.
- Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B., Santos, A. S., Maia, J. G. S. (1998). Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C.DC. *J. Essent.Oil*

- Res., **10**, 465-467.
- Araujo Jr., J. X., Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. O. e Gray, A. I. (1997). Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, **44**, 559-561.
- Araujo Jr., J. X., Chaves, M. C. O., Cunha, E. V. L. e Gray, A. I. (1999). Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27** (3), 325-327.
- Arnone, A., Modungo, V. D., Nasini, G. e Venturini, I. (1988). Isolation and structural determination of new active neolignans and norneolignans from *Ratanhia*. *Gazz. Chim. Ital.*, **118**, 675-682.
- Badheka, L. P., Prabhu, B. R. e Mulchandani, N. B. (1986). Dibenzylbutyrolactone lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry*, **25**, 487-489.
- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M. e Furlan, M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **51**, 899-902.
- Benevides, P. J. C. (1996) Estudo Químico e Biossintético de *Piper regnellii* (Miquell) (Piperaceae) Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P. e Kato, M. J. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*, **52**, 339-343.
- Bernard, C. B., Krishnamurty, H. G., Chauret, D., Durst, T., Philogène, B. J. R., Vindas, P. S., Hasbun, C., Poveda, L., Róman, L. S. e Arnason, J. T. (1995). Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.*, **21**, 801-814.
- Bernhard H. O. e Thiele k. (1978). Isolation of (+/-)-tembamid from bark of *Zanthoxylum-tingoassuiba* L (Rutaceae). *Helv. Chim. acta*, **61**, 2269-2272.
- Bhandari, S. P. S., Babu, U. V. e Garg, H. S. (1998). A lignan from *Piper chaba* stems. *Phytochemistry*, **47**, 1435-1436.
- Boll, P. M., Parmar, V. S., Tyagi, O. D., Prasad, A., Wengei, J. e Olsen, C. E. (1994). Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. *Pure App. Chem.*, **66**, 2339-2342.

- Bowden, B. F., Ritchie, E. e Taylor, W. C. (1972). Constituents of *Eupomatia* species II. Isolation and structure determination of further eupomatenoid lignans from the bark of *Eupomatia laurina*. *Aust. J. Chem.*, **25**, 2659-2669.
- Braz Filho, R., Carvalho, M. G., Gottlieb, O. R., Maia, J. G. S. e Silva, M. L. (1981). Neolignans from *Licaria rigida*. *Phytochemistry*, **20**, 2049-2050.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Camm, E. L. e Towers, G. H. N. (1977). Phenylalanine ammonia lyase. *Progr. Chem.*, **4**, 169-188.
- Chauret, D. C., Bernard, C. B., Arnason, J. T. e Durst, T. (1996). Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 152-155.
- Chu, A., Dinkova, A., Davin, L. B., Bedgar, D. L. e Lewis N. G. (1993). Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 27026-27033.
- Ciccio, J. F. e Segnini, M. (1998), Essential oil of leaves and spikes of *Piper peltatum* L. from Costa Rica. *Ing. Cienc. Quim.*, **18**, 55-56.
- Das, B., Kashinatham, A. e Madhusudhan, P. (1998). Studies on phytochemicals. XXI. One new and two rare alkamides from two samples of the fruits of *Piper longum*. *Nat. Prod. Sci.*, **4**, 23-25.
- Das, B., Kashinatham, A. e Madhusudhan, P. (1998). Long chain esters and alkamides from *Piper longum*. *Boll. Chim. Farm.*, **137**, 319-320.
- Das, B. e Kashinatham, A. (1998). Studies on phytochemicals: futoamide from *Piper longum*. *Fitoterapia* **69**, 548.
- Davin, L. B., Bedgar, D. L., Katayama, T. e Lewis, N. G. (1992). On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor coniferyl alcohol. *Phytochemistry*, **31**, 3869-3874.
- Davin, L. B., Wang, W.B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Sarkanen, S. e Lewis, N. G. (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, **275**, 362-366.

- Delgado A. W., Auvella M. E., Diaz, A. M. P. (1998). Benzylisoquinoline alkaloids from the stem of *Piper augustum* Rudge. *Rev. Colomb. Quim.*, **27**, 13-21.
- Deutscher, M. P. (1990). Guide to Protein Purification. In Abelson, J. N. e Simon, M. I. (Eds) *Methods in Enzymology* **182** Academic Press, California.
- Dewick, P. M. (1990). Biosynthesis of lignans. In Rahman, A. (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, 459-503, Elsevier, Amsterdã.
- Diaz, P., P., D., Maldonado, E. e Ospina, E. (1984). Aceite esencial de *Piper aduncum* L.. *Rev. Latinoam. Quim.*, **15**, 136-138.
- Dinkova-Kostova, A. T., Gang, D. R., Davin, L. B., Bedgar, D. L., Chu, A. e Lewis, N. G. (1996). (+)-pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29473-29482.
- Dominguez, X. A., Sanchez, H. V., Espinoza, G. C. B., Verde, J. S., Achenbach, H. e Utz, W. (1990). Lignans and *nor*-neolignans from *Krameria interior*. *Phytochemistry*, **29**, 2651-2653.
- Erdtman, H. (1963). Studies on the degradation of lignin and model compounds. I. The configuration of dehydrodiisoeugenol. *Acta Chem. Scandinavica*, **17**, 535-536.
- Frias, I., Silverio, J. M., Gonzalez, C., Trujillo, J. M. e Perez, J. A. (1991). Purification of a new peroxidase catalysing the formation of lignans-type compounds. *Biochem. J.*, **273**, 109-113.
- Garg, S. C. e Jain, R. (1996). Volatile constituents of the essential oil of *Piper betle* L. (Cultiver Sagar Bangla). *Ind. J. Chem.*, **35B**, 874-875.
- Ghisalberti, E. L. (1997). Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. *Phytomedicine*, **4**, 151-166.
- Gleisler, J. G. e Gross G. G. (1990). The biosyntheseis of piperine in *P. nigrum*. *Phytochemistry*, **29**, 489-492.
- Grayer, R. J., Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher-plants. *Phytochemistry*, **37**, 19-42.
- Green. T. P., Treadwell, E., M. e Wiemer, D. F. (1999). Arieianal, a prenylated benzoic acis from *Piper arieianum*. *J. Nat. Prod.*, **62**, 367-368.

- Gordaliza, M., Castro, M.A., Corral, J. M. M., López-Vásquez, M. L., Feliciano, A. S. e Faircloth, G. T. (1997). *In vivo* immunosuppressive activity of some cyclolignans. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2781-2786.
- Gottlieb, O. R. (1972). Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, **11**, 1537-1570.
- Gottlieb, O.R. (1974). Lignans and neolignans. *Rev. Latinoam. Quím.*, **5**, 1-11.
- Gottlieb, O. R., Mourão, J. C., Yoshida, M., Mascarenhas, Y. P., Rodrigues, M., Resenstein, R. D. e Tomita, K. (1977). Absolute configuration of the benzofuranoid neolignans. *Phytochemistry* **16**, 1003-1006.
- Gottlieb, O. R. (1977) Chemistry of neolignans with potential biological activity. In: Wagner, H., Wolff, P. (Eds) *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Springer Verlag, Heidelberg, 227.
- Gottlieb, O.R. (1978). Neolignans. In: Herz W., Grisebach, H., Kirbi, G. W. (Eds.) *Progress In Chemistry Of Organic Natural Products*, **35**, 1. Springer Verlag, Viena.
- Gross, G. G. (1985) Biosynthesis and metabolism of phenolic acids and monolignols. In: Higuchi, T. (Ed) *Biosynthesis and Bidegradation of wood components*, 229, Academic Press, Orlando, Florida.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Byology and Medicine*, 2nd edition, Oxford University Press.
- Hamburger, M. e Hostettmann (1991). Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
- Harborne, J. B. (1993). Advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 327-348.
- Hatori, M., Yang, X. W., Miyashiro, H. e Namba, T. (1993). Inhibitory Effects of monomeric and dimeric phenylpropanoids from mace on lipid peroxidation *in vivo* and *in vitro*. *Phytoterapy Research*, **7**, 395-401.
- Haworth. R. D. (1942). The chemistry of the lignan group of natural products. *J. Chem. Soc.*, 448-456.

- Hayashi, T. e Thomson, R. H. (1975). New lignans in *Conocarpus erectus*. *Phytochemistry* **14**, 1085-1087.
- Hegnauer, R. e Hegnauer, M. (1992). Chemotaxonomie der planzen. Generalregister, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Heide L., Nishioka N., Fukui H. e Tabata, M. (1989). Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* **28**, 1873-1877.
- Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Tech.*, **24**, 23-63.
- Hoffmann, F. e Zhang, E. P. (1999). Pilocarpin and latanoprost fail to prolong orthotopic corneal allograft survival. *Invest. Ophth. Vis. scie.*, **40**, 1334B242.
- Ireland, R. E. e Walba, D. M. (1968). In Noland W. E. (Ed) *Organic Synthesis*, **Vi**, 567-570, Wiley, New York.
- Jackson, D. E. e Dewick, P. M. (1984). Biosynthesis of *Podophyllum* lignans-I. Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry*, **23**, 1029-1035.
- Jackson, D. E. e Dewick, P. M. (1985). Tumour-inhibitory aryltetralin lignans from *Podophyllum pleiantum*. *Phytochemistry*, **24**, 1029-1035.
- JBCN 25.3 (1992) Nomenclature of lignans and neolignans IUPAC-IUB Joint Comission on Biochemical Nomenclature.
- Jensen, S., Hansen, J. e Boll, P.M. (1993). Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochemistry*, **33**, 523-530.
- Jiao, Y., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1998). Furofuran lignan metabolism as a function of seed maturation in *Sesamun indicum*: methylenedioxy bridge formation. *Phytochemistry* **49**, 387-394.
- Joly, A. B. (1985). Introdução à Taxonomia vegetal, Ed. Nacional, São Paulo - SP, Brasil.
- Jones, D. H. (1984). Phenylalanine ammonialiase: Regulation of its induction, and role in plant development. *Phytochemistry*, **23**, 1349-1359.
- Joyce, C. (1993) Taxol: search for a cancer drug. *Bioscience*, **43**, 133-136.

- Katayama, T., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1992). An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry*, **31**, 3875-3881.
- Katayama, T., Davin, L. B., Chu, A. e Lewis, N. G. (1993). Novel benzylic reductions in lignans biogenesis in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, **33**, 581-591.
- Kato, M. J., Chu, A., Davin, L. B. e Lewis, N. G. (1998). Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamun indicum* seeds. *Phytochemistry*, **47**, 583-591.
- Kingston, D. G., I., samaranayake, G. e Ivey, C. A. (1990). The chemistry of Taxol, a clinically useful anticancer agent. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1-12.
- Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K. e Yoshimura, H. (1988). Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in Pepper. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2452-2465.
- Koukol, J. e Conn, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698.
- Koul S. K. , Taneja S. C., Pushpangadan P., Dhar K. L. (1988). Lignans of *Piper trichostachyon*. *Phytochemistry*, **27**, 1479-1482.
- Kumar, R., Parmar, V. S., Errington, W., Wengel, J., Olsen, C. E. (1998). 1-(3,4-Dimethoxy- α,β -dihydrocinnamoyl)pyrrole, a novel amide from *Piper brachystachyum*. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **54**, 363-365.
- Leclercq, P. A., Van Genderen, M. H. P., Thanh, L., Van Khien, P. e Dung, N. X. (1997). Composition of the essential oil from the aerial parts of *Piper pierrei* C.DC. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, **9**, 721-724.
- Lewis, N. G. e Yamamoto, E. (1990). Lignin - occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **41**, 455-496.
- Lima, O. A., Gottlieb, O. R. e Magalhães, M. T. (1972). Burchellin, a neolignan from *Aniba burchellii*. *Phytochemistry* **11**, 2031-2037.

- Link H, Bernauer K (1972). Synthesis of *Pilocarpus* alkaloids, isopilosine and pilocarpine - absolute configuration of (+)-isopilosine. *Helv. Chim. Acta*, **55**, 1053.
- Lognay, G. C., Bouxin, P. e Marlier, M. (1996). Composition of the essential oil of *Piper acutifolium* Ruiz. And Pav. From Peru. *J. Essent. Oil Res.*, **8**, 689-691.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. e Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MacRae, W.D. e Towers, G.H.N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **23**, 1207.
- Mann, J. (1987). Secondary Metabolism, 2nd edition. Oxford University Press.
- Maraschin, M. e Verpoorte, R. (2000). Engenharia do metabolismo secundário. *Biotecnologia - Ciência & desenvolvimento*, **10**, 24-28.
- Martins, A. P., Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Canigueral, S., Casanova, J., Da Cunha, A. P. e Adzet, T. (1998). Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*, **49**, 2019-2023.
- Martins, R. C. C., Latorre, L. R., Sartorelli, P. e Kato, M. J. (2000). Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* (no prelo).
- Masuoka, C., Ono, M., Ito, Y. e Nohara, T. (1997). Antioxidative constituents from the arial part of *Piper elongatum* VAHL.. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 285-289.
- Maxwell, A., Dabideen, D., Reynolds, W. F., McLean, S. (1999). Neolignans from *Piper aequale*. *Phytochemistry*, **50**, 499-504.
- Messner, B, Boll, M. e Berndt, J. (1991). L-Phenylalanine ammonia-lyase in suspension culture cells of spruce (*Picea abies*). Induction by UV-light and fungal elicitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **27**, 267-274.
- McFerren, M. A. e Rodriguez, E. (1998). Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *J. Ethnopharmacol.*, **60**, 183-187.
- McLaughlin. J. (1991). Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In

- Dey, P.M. e Harborne, J.B. (Eds) *Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity*, **6**, 1.
- Miyauchi, T. e Osawa, S. (1998). Formation of (+)-eudesmin in *Magnolia kobus* DC. var *borealis* Sarg. *Phytochemistry*, **47**, 665-670.
- Moreira, D. L., Kaplan, M. A. C. e Guimaraes, E. F. (1995) Chemical constituents from *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Rev. Bras. Farm.* **76**, 106-109.
- Moreira, D. L., Guimaraes, E. F., Kaplan, M. A. C. (1998). A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **48**, 1075-1077.
- Moreira, D. L. , Kaplan, M. A. C., Guimaraes, E. F. (1998). Essential oil analysis of two *Piper* species (Piperaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.*, **70**, 751-754.
- Moreira, D. L., Guimaraes, E. F., Kaplan, M. A. C. (1998). Non-polar constituents from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry*, **49**, 1339-1342.
- Moreno, P. R. H., Van der Heijden, R. e Verpoorte, R. (1994). Induction of the secondary metabolism in *Catharanthus roseus* cell suspension culture in response to UV irradiation and the addition of a benzoic acid derivative. *Heterocycles*, **39**, 457-465.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Gupta, M. P., Adzet, T., Casanova, J. e Canigueral, S. (1998). Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. *Phytochemistry*, **47**, 1277-1282.
- Nabeta, K., Nakahara, K., Tonekubo, J., Okuyama, H. e Sasaya, T. (1991). Lignans biosynthesis in *Larix leptolepis* callus. *Phytochemistry*, **30**, 3951-3953.
- Nair, M. G. e Burke, B. A. (1990). Antimicrobial *Piper* metabolite and related compounds. *J. Agric. and Food Chem.*, **38**, 1093-1096.
- Neish, A. C. (1961). Formation of *m*- and *p*-coumaric acid by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry*, **1**, 1-24.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T. e Sticher, O. (1993). Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, **34**, 813-818.
- Orjala, J. Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T. e Sticher, O. (1993). Five new prenylated *p*-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.*, **59**, 546-551.

- Orjala, J., Wright, A. D., Behrends, G. F. E. Sticher, O. (1994). Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 18-26.
- Pan, J. X., Hensens, O. D., Zink, D. L., Chang, M. N. & Hwang, S. B. (1987). Lignans with platelet-activating-factor antagonist activity from *Magnolia biondii*. *Phytochemistry*, **26**, 1377-1379.
- Pande, A., Shukla, Y. N., Srivastava, R., Verma, M. (1997). 3-Methyl-5-decanoylpyridine and amides from *Piper retrofractum*. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, **36B**, 377-379.
- Patil, A. D., Freyer, A. J., Reichwein, R., Hofmann, G., Johnson, R. K. (1997). Piperpense, a tetrahydropyridine alkaloid from *Piper ponapense* stems and leaves. *Nat. Prod. Lett.*, **9**, 217-223.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. M., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E. e Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry*, **46**, 597-673
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N., Jain, R., Sharma, N. K., Tyagi, O. D., Lawrie, S.J., Errington, W., Howarth, O. W., Olsen, C. E., Singh, S. K. e Wengel, J. (1998). Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry*, **49**, 1069-1078.
- Pereda-Miranda. R., Bernard, C. B., Durst, T., Arnason, J. T., Sanchez V. P., Poveda, L. e San Roman, L. (1997). Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-Methyl-2'-Butenyl)benzoate. Major Insecticidal Principle from *Piper guanacastensis*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 282-284.
- Peterson, G. L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall. *Anal. Biochem.*, **100**, 201-220.
- Pino, J. A., Rosado, A., Rodriguez, M., Garcia, D. (1998). Composition of leaf oil of *Piper auritum* H.B.K. grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, **10**, 333-334.
- Pradhan, P., Banerji, A. (1998). Stereochemistry of diastereomeric neolignans from *Piper hookeri* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, **9**, 71-74.
- Price, N. C. (1996). In Hames, B. D. e Rickwood, D. (Eds) *Proteins LabFax*, **13** Academic Press.

- Rahman, M. M. A., Dewick, P. M., Jackson, D. E. e Lucas, J. A. (1990). Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, **29**, 1841-1846.
- Romoff, P. e Yoshida, M. (1997). Chemical constituents from Myristicaceae. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, **49**, 345-353.
- Rojas R., Alba J., Magana-Plaza I., Cruz F. e Ramos-Valdivia A. C. (1999). Stimulated production of diosgenin in *Dioscorea galeottiana* cell suspension cultures by abiotic and biotic factors. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 907-911.
- Saez, J., Granados, H., Escobar, G., Cardona, W., Atehortua, L., Callejas, R., Cortes, D. e Gonzalez, C. (1998). Piperlonguminine and stigmasterol, compounds from roots and stems of *Piper auritum*, and insecticidal activity of the extracts. *Rev. Colomb. Quim.*, **27**, 77-81.
- Santos, B. V. O., Cunha, E. V. L., Chaves, M. O., Gray, A. I. (1997). Croweacin from *Piper marginatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **25**, 471-472.
- Santos, B. V. O., Chaves, M. C. O., Cunha E. V. L. e Gray, A. I. (1998). Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry*, **49**, 1381-1384.
- Santos, B. V. O., Chaves, M. C. O. (1999). (*E,E*)-*N*-isobutyl-2,4-octadienamida from *Piper marginatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**, 113-114.
- Sarkanen, K. V. e Wallis A. F. A. (1973). Oxidative dimerizations of (*E*)- and (*Z*)-isoeugenol (2-methoxy-4-propenylphenol) and (*E*)- and (*Z*)-2,6-dimethoxy-4-propenylphenol. *J. C. S. Perkin I*, 1869-1881.
- Sartorelli, P., Young, M. C. M. e Kato, M. J. (1998). Antifungal lignans from arils of *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, **47**, 1003-1006.
- Sartorelli, P., Benevides, P. J. C., Ellensohn, R. M., Moreno, P. R. H. e Kato, M. J. (2000). Biosynthesis of (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. (submetido).
- Shankaracharya, N. B., Rao, L. J., Naik, J. P., Nagalakshmi, S. (1997). Characterization of chemical constituents of Indian long pepper (*Piper longum* L.). *J. Food Sci. Technol.*, **34**, 73-75.
- Siddiqui, B. S., Begum, S., Gulzar, T., Farhat, N. F. (1997). An amide from fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, **45**, 1617-1619.

- Silva, E. M. J. e Machado, S. R. (1999). Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Rev. Brasil. Bot.*, **22**, 117-124.
- Singh, Y. N. (1992). Kava: an overview. *J. Ethnopharmacology*, **37**, 13-45.
- Singh, S. K., Prasad, A. K., Olsen, C. E., Jha, A., Jain, S. C., Parmar, V. S. e Wengel, J. (1996). Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry*, **43**, 1355-1360.
- Srinivas, P. V. e Rao, J. M. (1999). Isopiperolien B: na alkamide from *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, **52**, 957-958.
- Strack, D., e Mock, H. P. (1993). Hydroxycinnamic acids and lignins. In: *Methods in Plant Biochemistry - Enzymes of Secondary Metabolism*, **9**, 45-97. Academic Press Limited, Great Britain, 1995.
- Stoehr, J. R., Xiao, P.G. e Bauer, R. (1999). Isobutylamides and a new (methylbutyl)amide from *Piper sarmentosum*. *Planta Med.*, **65**, 175-177.
- Stoll, D. P., Scales, T. A., Daughenbaugh, R., Jans, N. A. e Bailey, D. T. (1995). Taxol® (paclitaxel). Strategies to increase the supply of a new anticancer drug. *Appl. Biochem. Tech.*, **54**, 133-141.
- Taylor, D. e Hickey, L. (1992). Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiospermae. *Pl. Syst. Evol.*, **180**, 137-156.
- Terreaux, C., Gupta, M. P. e Hostettmann, K. (1998). Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*, **49**, 461-464.
- Tirilini, B., Velasquez, E. R. e Pellegrino, R. (1996). Chemical composition and microbial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med.*, **62**, 372-373.
- Ukita, T., Nakamura, Y., Kubol, A., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Kotera, J. e Ikeo, T. (1999). 1-arylnaphtalene lignan: a novel scaffold for type 5 phosphodiesterase inhibitor. *J. Med. Chem.*, **42**, 1293-1305.
- Umezawa, T., Davin, L. B., Yamamoto, E., Kingston, D. G. I. e Lewis, N. G. (1990). Lignan biosynthesis in *Forsythia* species. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1405-1408.

- Umezawa, T., Davin, L. B. e Lewis N. G. (1991). Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10210-10217.
- Ward, R. S. (1997). Lignans, neolignans and related compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **14**, 43-74.
- Wall, M. E. e Wani, M. C. (1994). Taxol: Discovery to clinic.. In Wagner, H. e Farnsworth, N. R. (Eds) Economic and medicinal plant research, 299-322 Academic Press, San Diego.
- Wallis, A. F. A. (1973). Oxidation of (*E*)- and (*Z*)- 2,6-dimethoxy-4-propenylphenol with ferric chloride. A facile route to the 2-aryl ethers of 1-arylpropan-1,2-diols. *Aust. J. Chem.*, **26**, 585-594.
- Ward, R. S. (1997). Lignans, neolignans and related compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **14**, 43-74.
- Whetten, R. e Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 1001-1013.
- Whittaker, R. H., e Fenny, P. P. (1971). Allelochemicals: Chemical Interactions between species. *Science*, **171**, 757-770.
- Wu, Q. L., Wang, S-P., Tu, G. Z., Feng, Y. X. e Yang, J. S. (1997). Alkaloids from *Piper puberullum*. *Phytochemistry*, **44**, 727-730.
- Zeng, H. W., Jiang, Y.Y., Cai, D. G., Bian, J., Long, K. e Chen, Z. L. (1997). Piperbetol, methylpiperbetol, piperol A, and piperol B. A new series of highly specific PAF receptor antagonists from *Piper betle*. *Planta Med.*, **63**, 296-298.
- Zhang, K., Ni, W., Chen, C. (1999). Chemical constituents of *Piper boehmeriaefolium* var. *Tonkinense*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, **11**, 44-47.
- Zollo, P. H. A., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G. e Bouchet, P. (1998). Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour Fragrance J.*, **13**, 107-114.
- Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, **40**, 779-784.