

Geibe Garcia Fernandes

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Sarcorrhachis obtusa* - PIPERACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

**Setor de Ciências Exatas,
Departamento de Química,
Universidade Federal do Paraná.**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. BEATRIZ HELENA L. N. SALES MAIA

Co-Orientador:

Dr. FRANCISCO DE ASSIS MARQUES

CURITIBA

JUNHO/ 2006

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Beatriz Helena L. N. Sales Maia pela orientação, motivação, amizade e auxílio nas dificuldades durante todo o trabalho.

Ao professor Francisco de Assis Marques pela co-orientação e amizade.

Aos professores do Departamento que participaram durante minha formação acadêmica, intelectual e profissional.

Ao CPQBA, pelas análises fornecidas.

Aos funcionários do departamento (técnicos e técnicos administrativos) pelos auxílios durante dificuldades enfrentadas durante a Pós-Graduação.

Aos professores Maria Elida Alves Stefanello e Anderson Barison, pelas importantes observações e correções durante o Exame de Qualificação.

À Sirlei Dias Teixeira pela amizade.

Aos colegas: Denise, Sandra, Emmanuel, Andréia, Mayara, Cleiton, Ademir, Carlos, Edison, Zé, Tico, Patrícia, Keller e Érica, pelos bons momentos compartilhados e incentivos.

Ao André Luis Vagheti pelo apoio.

À minha família e ao Giovani pelo apoio durante este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

Abreviaturas	iv
Lista de Esquemas	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumo	x
Abstracts	xi
1. Introdução	1
1.1 Família Piperaceae	2
1.2 O gênero <i>Sarcorhachis</i>	6
1.3 Família Piperaceae e a relação com amidas	8
1.4 Síntese da <i>aegelina</i>	11
1.5 Óleos Essenciais	12
2. Objetivo	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1 Métodos Gerais	17
3.2 Estudo Fitoquímico da espécie <i>Sarcorhachis obtusa</i>	18
3.2.1 Coleta e obtenção dos extratos	18
3.2.2 Extrato Diclorometânico dos caules	19
3.2.3 Extrato Etanólico dos caules	20
3.3 Testes de Atividade Antimicrobiana	23
3.4 Óleos essenciais de <i>Sarcorhachis obtusa</i>	23
3.5 Síntese	24
3.5.1 Preparação de Mandelonitrila	24
3.5.2 Preparação de 1 amino-2-feniletanol	25
3.5.3 Preparação de N-2-fenil-2-hidroxietil-4-metoxicinamamida	25
4. Resultados e Discussão	26
4.1 Substância A	27
4.2 Substância B	34
4.3 Óleos Essenciais de <i>Sarcorhachis obtusa</i>	36
4.4 Testes de Atividade Antimicrobiana	40
4.5 Biossíntese de amida	41
4.6 Síntese de N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4-metoxicinamamida	44
5. Conclusão	50
6. Referências Bibliográficas	51
7. Anexos	55

ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	Correlação homonuclear (H x H)
CH_2Cl_2	Diclorometano
DEPT	Espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
ED	Extrato diclorometânico
EE	Extrato etanólico
EPP	Extrato éter de petróleo
EM	Espectrometria de massas
HETCOR	Correlação heteronuclear (C x H)
HMBC	Coerência heteronuclear em ligações múltiplas
IV	Infravermelho
OMe	Metoxila
Me	Metila
NOE	Efeito Overhauser Nuclear
R_f	Fator de retenção
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

LISTA DE ESQUEMAS

1. Síntese da <i>R-aegelina</i>	12
2. Resumo dos fracionamentos dos extratos dos galhos de <i>S. obtusa</i>	21
3. Síntese racêmica de N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4 metoxicinamamida, isômero da <i>aegelina</i> .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coluna Filtrante do ED dos caules de <i>S. obtusa</i> .	18
Tabela 1.1. Frações da coluna cromatográfica de F III do extrato diclorometânico.	18
Tabela 2. Extração líquido-líquido do EE dos caules de <i>S. obtusa</i> .	20
Tabela 3. Dados referentes a análises de RMN ¹ H e RMN ¹³ C associados à análise de HETCOR para o composto A .	27
Tabela 4. Dados referentes à substância aegelina (substância A), analisados através do HMBC	31
Tabela 5. Assinalamentos do RMN ¹³ C das substâncias B1 e B2 comparados com dados da literatura.	35
Tabela 6. Principais constituintes dos óleos das folhas de <i>S. obtusa</i> .	37
Tabela 7. Principais constituintes dos óleos dos caules de <i>S. obtusa</i> .	38
Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>S. obtusa</i> e de aegelina (A - II).	40
Tabela 9. Dados de RMN ¹³ C de A – I, A – II, A - I ^a e A - II ^a .	48
Tabela 10. Tabela referente aos óleos essenciais de <i>Sarcorhachis obtusa</i> .	54

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Exemplos de espécies dos gêneros <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i>	3
Figura 2. Ocorrência do gênero <i>Piper</i> no mundo	6
Figura 3. Foto da coleta de <i>Sarcorhachis obtusa</i> , município de Morretes, estrada da Graciosa, Recanto Bela Vista – PR 410.	7
Figura 4. Fotos de <i>Sarcorhachis obtusa</i> coletada no Paraná, Serra do Mar	8
Figura 5. Monoterpenos: Núcleos básicos: p-mentano, pinano, canfeno, isocanfeno, fencheno, carano e tujano.	13
Figura 6. Tipos de Sesquiterpenos	14
Figura 7. Possibilidades do posicionamento da metoxila nos anéis aromáticos do composto A	28
Figura 8. Espectro de Massas de alta resolução da substância A .	28
Figura 9. Propostas de Fragmentações da substância A	29
Figura 10. Principais interações observadas no experimento HMBC do composto A .	31
Figura 11. Espectro de HMBC	32
Figura 12. Expansão do HMBC mostrando, principalmente, as correlações entre os H-8' com C-7' (J^2) e H-8' com o C-2' (J^3).	33
Figura 13. Análise do experimento NOE realizado com a substância A .	33
Figura 14. Representação de folhas e caules de <i>Sarcorhachis obtusa</i> .	36

Figura 15. Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de <i>Sarcorrhachis obtusa</i> .	36
Figura 16. Cromatograma do óleo essencial dos caules de <i>Sarcorrhachis obtusa</i> .	38
Figura 17. Sobreposição dos cromatogramas dos óleos essenciais das folhas e caules de <i>Sarcorrhachis obtusa</i> ; região de monoterpenos.	39
Figura 18. Sobreposição dos cromatogramas dos óleos essenciais das folhas e caules de <i>Sarcorrhachis obtusa</i> ; região de sesquiterpenos.	40
Figura 19. Proposta de biossíntese para a aegelina	42
Figura 20. Primeira etapa da síntese racêmica de N-2'-fenil-2'-hidroxi-etil-4 metoxicinamamida	45
Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância A - I .	46
Figura 22. Espectro RMN ^1H (400MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância A - II .	46
Figura 23. RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância A - II .	47
Figura 24. RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância A - I .	47
Figura 25. Estrutura das substâncias natural e sintética.	48
Figura 26. Estruturas dos compostos extraídos dos óleos essenciais das folhas e caules de <i>S. obtusa</i> . (Anexo I)	55
Figura 27. CG/EM dos óleos essenciais das folhas e caules de <i>Sarcorrhachis obtusa</i>	56
Figura 28. Espectro de RMN ^1H (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%), substância A . (Anexo II)	57

Figura 29. Espectro parcial ampliado RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃ /MeOD 10%) de A .	57
Figura 30. Espectro parcial ampliado de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃ /MeOD 10%) de A	58
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C (75MHz, CDCl ₃ /MeOD 10%) da substância A	58
Figura 32. Espectro parcial ampliado de RMN ¹³ C (75MHz, CDCl ₃ /MeOD 10%) de A .	59
Figura 33. Espectro parcial ampliado de RMN ¹³ C (75MHz, CDCl ₃ /MeOD 10%) de A .	60
Figura 34. Espectro de HMBC (9,4 tesla, CDCl ₃ /MeOD 10%) da substância A .	61
Figura 35. Espectro de RMN ¹ H (400MHz tesla, CDCl ₃) das substâncias B1 e B2 . (Anexo III)	62
Figura 36. Espectro de RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido das substâncias B1 e B2	63
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDCl ₃ , MeOD) da substância A - I . (Anexo IV)	64
38. Espectro de RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃ , MeOD) da substância A - I .	65
Figura 39. Espectro no Infravermelho do 2-amino-1-feniletanol e da mandelonitrila. (Anexo V)	66
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDCl ₃) do 2-amino-1-feniletanol.	67
Figura 41. Espectro de RMN ¹³ C (75MHz, CDCl ₃) do 2-amino-1-feniletanol.	68

RESUMO

O estudo fitoquímico dos galhos de *Sarcorrhachis obtusa*, família Piperaceae foi realizado obtendo-se três extratos, éter de petróleo, diclorometânico e etanólico. O fracionamento do extrato diclorometânico resultou no isolamento e identificação de uma mistura de esteróides (sitosterol e estigmasterol) e de aegelina, uma amida já isolada do gênero *Sarcorrhachis*. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos, e da aegelina, utilizando cinco bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermides*), onde o extrato éter de petróleo apresentou forte atividade para o microrganismo *B. subtilis* e fraca atividade para *M. luteus* e *S. epidermides*, enquanto o extrato diclorometânico apresentou forte atividade apenas para *S. epidermides*. O extrato etanólico e a aegelina não apresentaram atividade para os microrganismos testados.

O estudo dos óleos essenciais das folhas e caules de *S. obtusa* foi realizado pela técnica de hidrodestilação e as análises foram realizadas por CG/EM. Observou-se como componente majoritário nos óleos das folhas o β -felandreno (17,4%) seguido do α -pineno (15,1%) enquanto que no óleo do caule, além do β -felandreno (17,2%) foi observado o cariofileno (15,6%) em quantidades significativas. Não existe nenhum relato sobre os óleos essenciais do gênero *Sarcorrhachis* na literatura.

A síntese do isômero da aegelina foi realizada a partir da reação de benzaldeído e cianeto de potássio, obtendo-se a mandelonitrila, com rendimento de 69%. Posterior redução desta para aminoálcool e condensação com ácido cinâmico, forneceu o produto final com 80% de rendimento.

ABSTRACT

The branches from *Sarcorhachis obtusa* (Piperaceae) were extracted with petroleum ether, dichloromethane and ethanol. The study of the dichloromethane extract resulted in the isolation and identification a mixture of steroids sytosterol and stygmasterol and aegeline, an amide already isolated from the genus of *Sarcorhachis*. The antimicrobial activity of the extracts and of aegeline were evaluated against five microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Staphyloccus epidemides*). The petroleum ether extract showed strong activity against *B. subtilis* and weak activity against *M. luteus* and *S. epidermides*, while the dichloromethane extract showed strong activity only against *S. epidermides*. The ethanolic extract and aegeline did not show any activity against the microorganisms tested.

Essential oils of the leaves and branches of *S. obtusa* was obtained by hydrodistillation and analysed by GC/MS. The major constituents identified in the leaf oil were β -felandrene (17.4%) and α -pinene (15.1%), while in the branches oil were β -felandrene (17.2) and caryophyllene (15.6). There is no any report about the essential oils of *Sarcorhachis* on literature.

The synthesis of the isomer of the aegeline was done through condensation of benzaldehyde and the cyanide anion which furnished mandelonitrile in 69% yield. The desired amide was prepared after the reduction of mandelonitrile to its corresponding aminoalcohol which was reacted with cinnamic acid leading to the amide in 80% yields.

1. INTRODUÇÃO

A importância do estudo de produtos naturais se torna cada vez mais evidente e necessário no nosso país e no mundo. Atualmente, a comunidade científica preocupa-se com questões como: Qual sua função no organismo que a produz? Qual sua atividade? Qual sua rota biossintética? Como se pode aproveitá-lo em benefício da humanidade?

O estudo de produtos naturais é considerado uma ciência interdisciplinar, ou seja, depende de um botânico na identificação e coleta da planta, de um químico no isolamento e identificação dos compostos e de um farmacólogo ou biólogo para os testes de atividade biológica ou atividades de campo com herbívoros.

O uso de plantas como fonte de medicamentos é muito antigo e relatos do uso são encontrados em documentos das civilizações da China e Índia. As plantas são quase que exclusivamente a única fonte de fármacos para a maioria da população mundial, sendo que ainda hoje muitos países ou regiões utilizam-se das plantas como única fonte de cura. Mais de 80% da população mundial usa as plantas diretamente no tratamento das doenças, sendo que em muitos países é reconhecida a medicina tradicional (popular)(CORDELL, 1995).

Mesmo nos países industrializados, 25% dos remédios são extraídos de plantas, movimentando um mercado de 70 bilhões de dólares por ano (HOSTETTMANN *et al*, 1991; BERNARDES, 1997).

Devido ao grande uso de plantas pela população em tratamento de doenças, muitos trabalhos científicos têm sido realizados com o intuito de isolar os princípios ativos. Foi no século XIX que ocorreu o primeiro isolamento de princípios ativos como, por exemplo, o alcalóide morfina (HOSTETTMANN *et al*, 1991).

Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados com plantas medicinais, tendo-se obtido resultados satisfatórios quanto ao isolamento e comprovação da atividade biológica de vários constituintes de determinada planta. É o caso dos alcalóides vinblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) (NEUSS *et al*, 1964). Estes dois compostos são atualmente comercializados e tem atividade antitumoral.

Etoposide (VePesid[®]) é um exemplo de um composto sintético que surgiu baseado no produto natural podofilotoxina, isolado de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae). Esta planta é tradicionalmente usada contra o câncer e o etoposide tem sido usado para o tratamento de

tumores de testículo e pulmão, mostrando-se menos tóxico e mais potente que o composto natural (KINGHORN, 1987).

1.1 Família Piperaceae

As plantas da família Piperaceae são angiospermas que apresentam seu corpo vegetativo diferenciado em raiz, caule e folha. As Angiospermas estão divididas em duas classes: dicotiledônea e monocotiledônea. As plantas desta família são dicotiledôneas e estão classificadas neste trabalho seguindo a linha filogenética de Arthur Cronquist. Em 1968, A. Cronquist propôs a classificação das Magnoliophytas baseando-se em Armen Takhtajan, considerando diversos aspectos morfo-fisiológicos. Divisão *Magnoliophyta*; classe Magnoliopsida; subclasse Magnoliidae; ordem Piperales e família Piperaceae (AGAREZ , 1994). Estudos taxonômicos feitos no Brasil determinaram as características das plantas desta família. São plantas eretas ou escandentes, arbustos ou arvoretas, terrestres ou epífitas; folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, inteiras, sésseis ou pecioladas de consistência e formatos os mais diversos, bem como de indumento muito variado, geralmente dotadas de glândulas translúcidas (VALENTE, M. C.*et al*, 1994). A família Piperaceae tem larga distribuição no mundo, sendo composta por 10 gêneros contendo em torno de 2300 espécies. No Brasil esta família está representada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*.

Na figura 1 podem-se observar as fotos de algumas espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

Piper solmsianum*Piper nigrum**Peperomia nivences**Peperomia scandens*

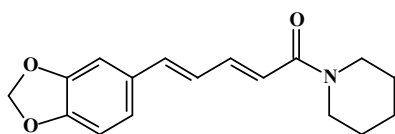
Figura 1. Exemplos de espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

O gênero *Piper* tem 700 espécies distribuídas em ambos os hemisférios. As plantas do gênero *Piper* são geralmente arbustos ou árvores. Possuem importância: comercial, econômica e medicinal. Economicamente as plantas desta família, são importantes no mundo para o mercado de condimentos – a pimenta. Os frutos maduros de *Piper nigrum* são a fonte da pimenta branca, enquanto os frutos imaturos da mesma espécie são da pimenta preta. (PARMAR, *et al*, 1997) As propriedades inseticidas de extratos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae) são conhecidas desde 1924. E mostraram-se tóxicos para a mosca doméstica *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), o mosquito *Culex pipiens* Paless (Diptera: Culicidae) e o gorgulho-do-caupi *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) (ESTRELA *et al*, 2003).

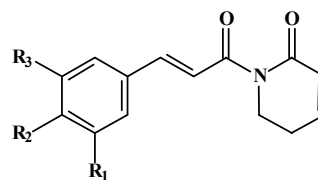
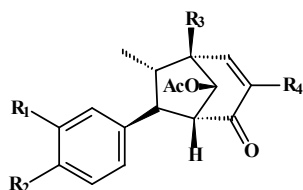
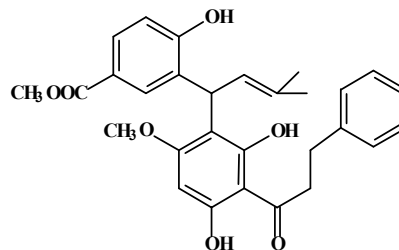
Além de apresentar importância econômica para o mercado de condimentos e atividades inseticidas esta família apresenta grande diversidade estrutural em relação aos seus constituintes químicos: lignanas, flavonóides, alcalóides e amidas (quadro I).

A maioria dos trabalhos, na área medicinal, é realizado por pesquisadores principalmente da China e Índia e com o gênero *Piper* (PARMAR, *et al*, 1997). Piperina (**1**, quadro I) é um dos alcalóides mais encontrado no gênero *Piper*. Vários estudos foram realizados quanto às suas propriedades farmacológicas, dentre elas analgésica e antiinflamatória, com o objetivo de elucidar o seu mecanismo de ação (MUJUNDAR *et al*, 1990). *Piper aborescens* (originária da China), apresentou atividade citotóxica devido aos alcalóides piridônicos presentes nas folhas e caules, (compostos **2**, **3**, **4**, quadro I) (WU, *et al*,

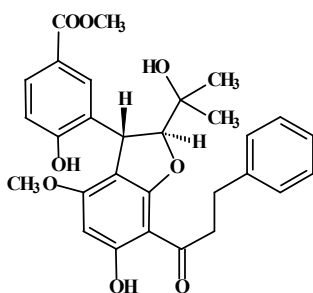
1990). A espécie *Piper puberulum* (originária da China) é usada popularmente contra asma e artrite. Seu estudo químico levou ao isolamento das neolignananas puberulinas A, B e C (5, 6, 7, quadro I) e testes de atividade foram feitos para inibição PAF (fator de agregação de plaquetas) (CHEN *et al*, 1995). Outra classe de compostos presentes nas espécies de *Piper*, as diidrochalconas (8, 9, 10, quadro I), apresentam atividade citotóxica e antibacteriana; este estudo foi realizado com as folhas de *Piper aduncum*, coletada na Nova Guiné (OJARLA *et al*, 1994). Mais um exemplo da utilização de plantas desta família é a espécie *Ottonia frutescens*, que apresenta conhecida atividade anestésica devido à presença do composto piperovatina (11, quadro I), uma isobutilamida. Esta planta tem sido largamente usada para aliviar dores de dente, de garganta e de lesões superficiais (KINGHORN, 1987).

Quadro I: Substâncias encontradas em algumas espécies de *Piper*

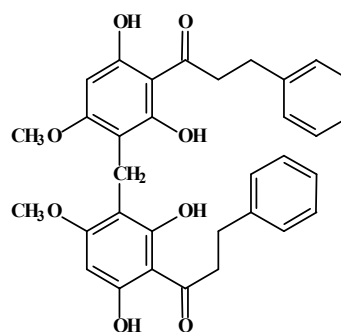
(1)

(2) $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 + R_3 = \text{OCH}_2\text{O}$ (3) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OMe}$ (4) $R_1 = R_2 = \text{OMe}$; $R_3 = \text{H}$ (5) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OMe}$; $R_4 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (6) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = \text{OMe}$; $R_4 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (7) $R_1 = R_4 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 

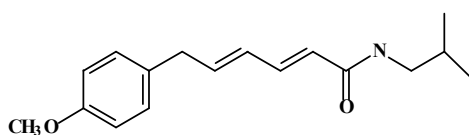
(8)



(9)



(10)



(11)

O estudo da atividade analgésica em extratos de *Piper aduncum* foi realizado com os extratos diclorometânico das inflorescências e os hexânicos das folhas e dos caules. Constatou-se que o extrato das inflorescências possui maior atividade que os extratos das folhas e caules (KAPLAN *et al*, 1996).

Os extratos de *Piper tuberculatum* e *P. marginatum* apresentaram efeito hipotensor em ratos. Estes resultados sugerem diminuição da pressão arterial no rato acordado e livre de

estresse, através de um efeito relaxante sobre a musculatura lisa vascular (ARAÚJO *et al*, 1996; SANTOS *et al*, 1996).

Duas espécies de *Piper* (*P.arboreum* e *P.umbellata*) foram estudadas quanto à atividade leishmanicida, apresentando uma inibição da proliferação do parasita de 76 e 83% respectivamente (KAPLAN *et al*, 1996a).

Um extraordinário número de espécies do gênero *Piper* aparece em farmacopéias por todo o mundo. O gênero *Piper* é um dos mais estudados e também um dos maiores (PARMAR, *et al*, 1997). Na América do Sul, várias espécies de *Piper* são utilizadas como anestésico local (MCFERREN *et al*, 1998; MCFERREN *et al*, 2002).

O mapa mostrado na figura 2 apresenta a ocorrência do gênero *Piper* no mundo (JARAMILLO M. A. *et al*, 2001)

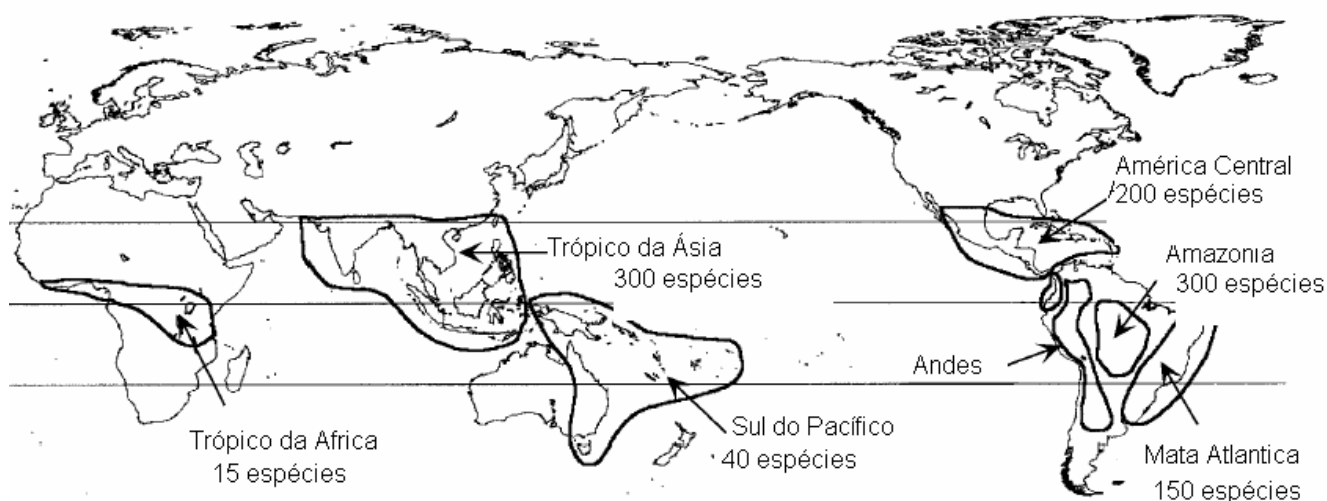


Figura 2. Ocorrência do gênero *Piper* no mundo.

1.2 O gênero *Sarcorrhachis*

As plantas do gênero *Sarcorrhachis* são rastejantes ou trepadeiras, com raízes grimpantes e folhas alternas. Espigas terminais e axilares; flores hermafroditas sésseis com bractéolas cuculadas; raque carnosa. Estames 3-4; anteras alongadas providas de conectivo dilatado. Ovário imerso na raque; estigmas 3-4, sésseis. Drupa pequena com uma única semente, parcialmente imersa e coalescente à raque, quando madura (VALENTE, M. C.*et al*, 1994).

As plantas de Piperaceae podem ser encontradas em áreas úmidas, com luz difusa e altitude variável entre 800-1400m, onde ocorrem numerosos representantes, dentre elas *Sarcorrhachis obtusa* que foi coletada para este trabalho na flora Paranaense (VALENTE, M. C. *et al*, 1994). A foto abaixo (figura 3) foi tirada no momento da coleta da planta *S. obtusa*, na estrada da Graciosa, município de Morretes, Estado do Paraná.



Sarcorrhachis obtusa

Figura 3. Foto da coleta de *Sarcorrhachis obtusa*, município de Morretes, estrada da Graciosa, Recanto Bela Vista – PR 410.

Esta planta, *S. obtusa*, não possui nenhum relato em literatura relacionado a estudo fitoquímico. A única espécie deste gênero citada na literatura é *S. naranjoana*, com a qual foi feito um estudo sobre a atividade leishmanicida utilizando o extrato metanólico e um único metabólito isolado, chamado aegelina (WILLIAMS, C. *et al*, 2003). Além deste relato, o gênero *Sarcorrhachis* possui apenas estudos botânicos em literatura (JARAMILLO M. A. *et al*, 2001; VALENTE, M. C. *et al*, 1994). As fotos da figura 4 mostram a planta *Sarcorrhachis obtusa*. As plantas do gênero *Sarcorrhachis* são trepadeiras e a foto mostra também as folhas em formato de coração que a planta possui.



Figura 4. Fotos de *Sarcorhachis obtusa* coletada no Paraná, Serra do Mar.

O estudo completo de nossas plantas é importante para comprovar, ou não, as fontes populares. Portanto é de grande importância o estudo químico desta planta, bem como a verificação quanto a sua atividade biológica. Nosso grupo de trabalho vem estudando as espécies de Piperaceae que ocorrem no Paraná, visando o isolamento de metabólitos secundários com atividades biológicas ou suas interações com animais. Neste trabalho, foi realizado o estudo fitoquímico da *Sarcorhachis obtusa*, para que se conheça um pouco mais deste gênero pertencente a uma família de interesse em aspectos econômicos bem como medicinais (PARMAR, *et al*, 1997).

1.3 Família Piperaceae e a relação com amidas/alcalóides

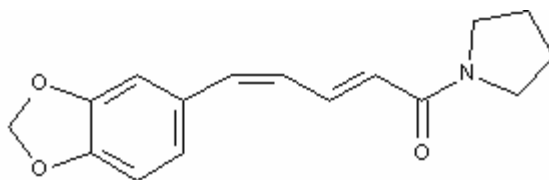
Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas em muitas plantas, porém podem ser encontrados também em microrganismos e animais, onde podem estar presentes compostos com um ou mais átomos de nitrogênio (DEWICK, 2001). Pode-se observar a presença do átomo de nitrogênio em peptídeos e proteínas, onde ambos são conceituados como poliamidas, compostos de α -aminoácidos. A participação de aminoácidos como precursores tanto de alcalóides como de peptídeos e proteínas (DEWICK, 2001) são

indicativos de que podemos ter a função amida em alcalóides. Desse modo à utilização de amidas e/ou alcalóides para denominar os constituintes isolados, estão presentes em muitas referências e por isso neste trabalho não faremos distinção entre os dois grupos.

A piperina (**1**, quadro I) foi a primeira amida a ser isolada dos frutos das espécies de *Piper* (PARMAR, *et al*, 1997). Os constituintes químicos isolados têm sido freqüentemente estudados, dentre os quais as amidas lipofílicas insaturadas. Estas além de constituírem o principal grupo de metabólitos da planta, são os principais responsáveis pelas atividades inseticidas (PARMAR, *et al*, 1997). A atividade inseticida da piperina sobre *M. domestica*, mostrou-se maior do que a das piretrinas (ESTRELA *et al*, 2003).

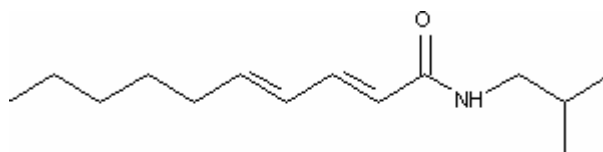
Um estudo farmacológico da piperina demonstrou atividade depressora no sistema nervoso central, atividades antipiréticas, analgésicas e antiinflamatórias (MIYAKADO *et al*, 1989). Miyakado isolou a pipericida de *Piper nigrum*, que mostrou atividade inseticida contra o inseto praga do feijão adzuki (*Callosobruchus chinensis*). Outro alcalóide/amida isolado de *Piper nigrum* causa a dilatação no coração de coelhos. A amida extraída de *Piper longum*, deidropiperonalina, tem atividade vasodilatadora de coronárias (PARMAR, *et al*, 1997).

A química do gênero *Piper* tem sido investigada revelando amidas inseticidas (MCFERREN *et al*, 1998). Estas amidas suscitaram interesse por ter potencial inseticida e fungicida. As amidas isoladas das folhas de *Piper hispidum* (ALÉCIO *et al*, 2000), *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*, como exemplo a arboreumina (**12**), que através de testes de bioautografia direta em CCD inibiram o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (VASQUES *et al*, 2002).



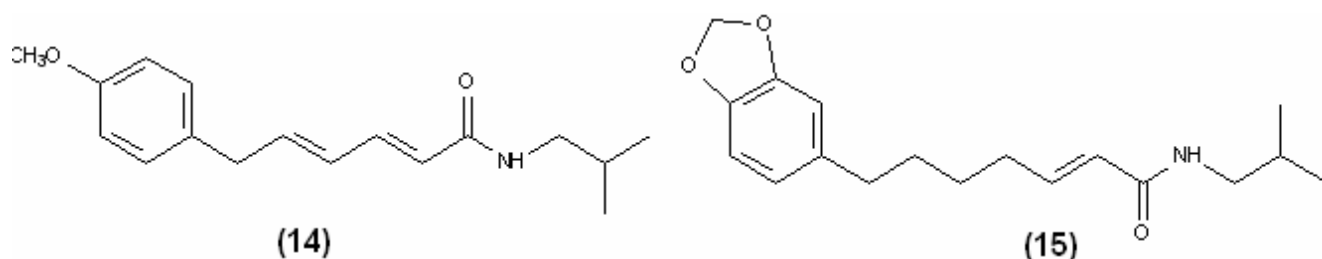
(12)

Outro exemplo de amida isolada de *Piper tuberculatum* (VASQUES *et al*, 2002) e *Piper sarmentosum* (RUKACHAISIRIKUL *et al*, 2004) é a piletorine (**13**), que possui atividade fungicida.



(13)

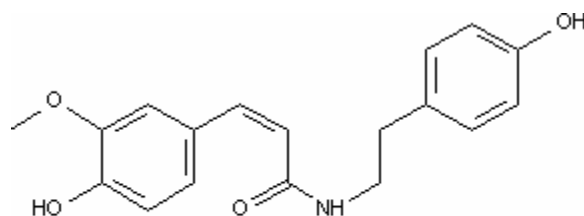
As amidas presentes em *Piper* têm sido investigadas em seus aspectos inseticidas e anestésicos. O extrato metanólico *Piper piscatorum* revelou a presença de piperovatina (**14**), uma substância que causa intoxicação em peixes. Estudos recentes indicam o efeito de alquil isobutilamidas que podem afetar o funcionamento dos canais de sódio dos peixes, atuando como veneno. É possível que o anestésico local e a propriedade piscicida da piperovatina (**14**) sejam produzidas por um mecanismo similar (MCFERREN *et al*, 1998). Outra amida isolada de *P. piscatorum* que também possui atividade inseticida, porém menor, é a pipericalosidina (**15**) (MCFERREN *et al*, 1998; ALÉCIO *et al*, 1998).



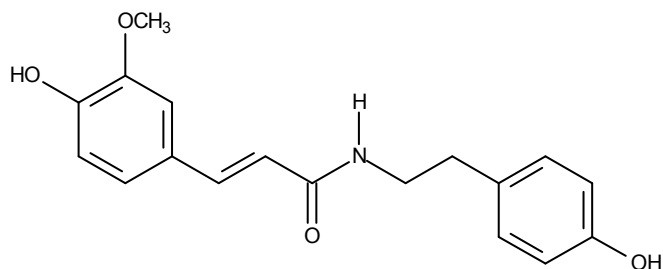
(14)

(15)

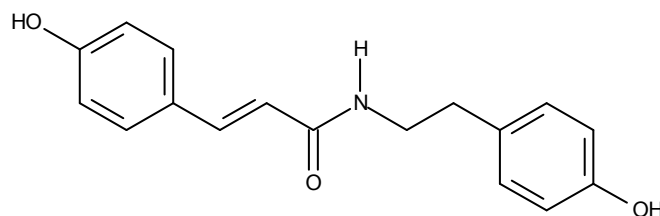
Outros exemplos de amidas isoladas de *Piper argyrophyllum* são dadas a seguir: (*Z*)-*N*-ferruloiltiramina (**16**), 4-*N*-*p*-coumaroiltiramina (**17**) e 5 (*E*)-*N*-ferruloiltiramina (**18**) (SINGH *et al*, 1996).



(16)



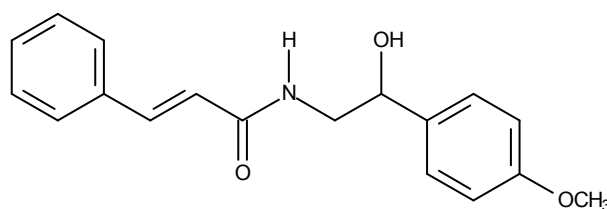
(17)



(18)

As amidas não são exclusivas do gênero *Piper* e têm sido isoladas de duas espécies do gênero *Ottonia*: *Ottonia frutesces* e *O. corcovadenses* (FACUNDO *et al*, 2005).

A única substância isolada do gênero *Sarcorhachis* é a amida aegelina (19). Esta amida foi inicialmente isolada de *Aegles marmelos* – Rutaceae (SHARMA *et al*, 1981) e posteriormente de *S. naranjoana*, em um estudo sobre atividade leishmanicida (WILLIAMS, C. *et al*, 2003).

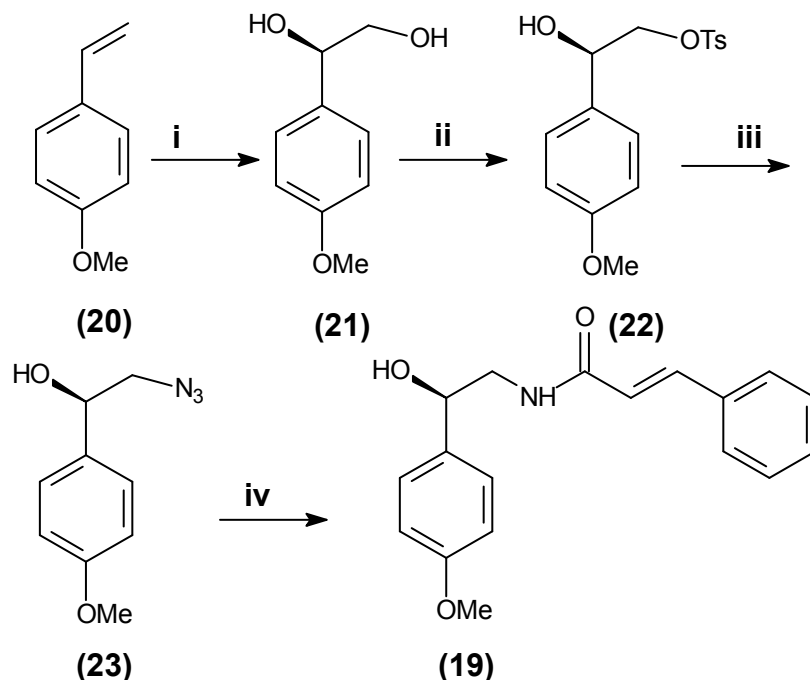


(19)

1.4 Síntese da aegelina

A partir do isolamento de substâncias em plantas (sendo substâncias com atividades biológicas ou não), os químicos orgânicos têm realizado sínteses destes compostos ou proposto metodologias para sintetizá-los. Muitas amidas têm sido sintetizadas, dentre elas a aegelina (19) (CHO B. T *et al*, 2002; PATRA *et al*, 1981; RAMALINGAM *et al*, 2005).

O esquema abaixo apresenta uma das metodologias utilizadas para a preparação da *R*-aegelina (19).



Esquema 1. (i) (DHQD)₂PHAL, K₃Fe(CN)₆, K₂CO₃, OsO₄, t-BuOH/H₂O (1:1), 0°C, 18 h, 93%; (ii) *p*-TsCl, piridina, -15°C, 8 h, 80%; (iii) NaN₃, DMF, 80°C, 4 h, 93%; (iv) (a) Pd/C, H₂, (b) 50% aq. NaOH, CH₂Cl₂, RCOCl, tolueno, 10°C, 30 min, 90-92%.

A dihidroxilação assimétrica do 4-metoxiestireno (**20**) com o ligante (DHQD)₂PHAL produziu o diol (**21**) em 93% de rendimento e 97,5% de excesso enantiomérico. A conversão seletiva do álcool primário em tosilato, seguida da substituição nucleofílica com NaN₃ produziu o azidoálcool (**23**). A redução da azida por hidrogenação sob paládio e carvão em metanol forneceu o aminoálcool que em subsequente acilação com cloreto de cinamoíla rende a *R*-(-)-aegelina (**19**) em 90% de rendimento tendo $[\alpha]_D^{20} = -35,21$. (RAMALINGAM *et al*, 2005).

1.5 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze átomos de carbono (mono e sesquiterpenos),

mas, dependendo do método de extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial.

Os monoterpenos podem ser agrupados em diversos tipos, de acordo com a sua estrutura química. Para os monoterpenos podem ser encontrados os do tipo: *p*-mentano, pinano, canfeno (bornano), isocanfeno, fencheno, careno e tujano (figura 5) (DEWICK, 2001). Destes esqueletos básicos vários outros monoterpenos derivados são encontrados. O estudo da fragmentação destes compostos por Espectrometria de Massas é uma importante ferramenta para a sua identificação.

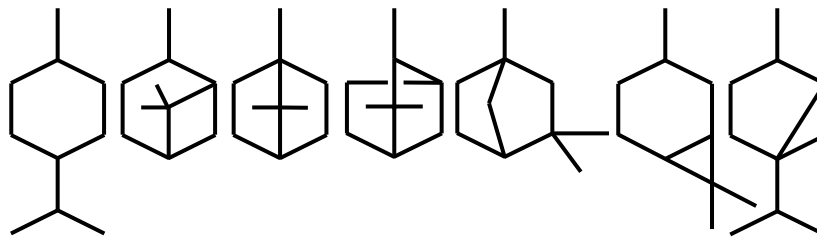


Figura 5. Monoterpenos: esqueletos básicos da esquerda para direita: *p*-mentano, pinano, canfeno, isocanfeno, fencheno, carano e tujano.

O estudo de sesquiterpenos é muito mais complexo em relação aos monoterpenos, fato este relacionado a maior variabilidade dos esqueletos básicos (figura 6). Em muitos casos, apenas os índices de retenção e comparação de seus espectros de massas mostram-se insuficientes para identificação do composto, sendo necessário outra técnica de identificação. (PINTO *et al*, 1996a; VAN DEN DOOL, 1964)

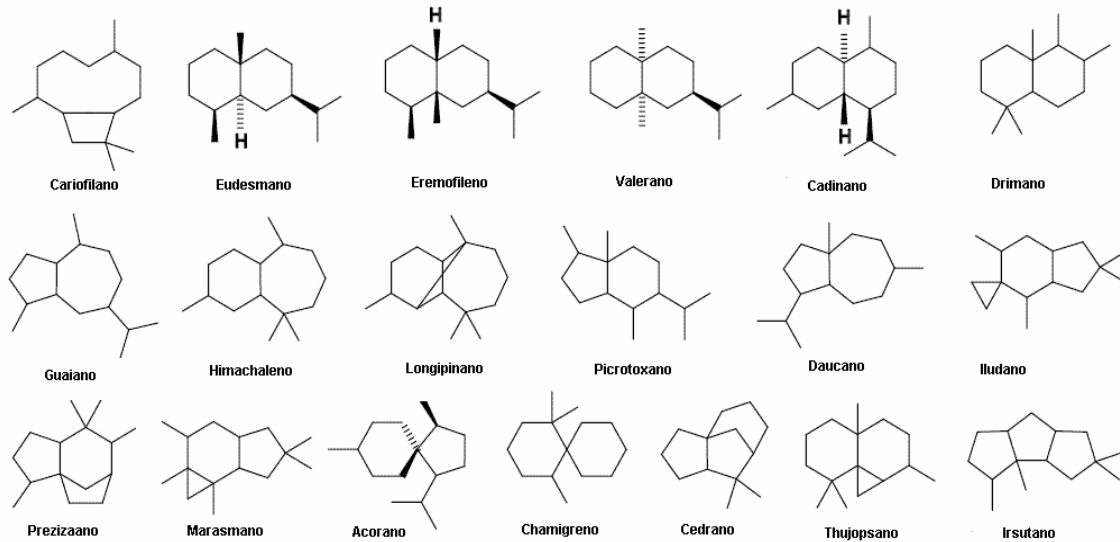


Figura 6. Tipos de esqueletos de sesquiterpenos.

Na família Piperaceae, encontra-se vários estudos de óleos essenciais envolvendo principalmente o gênero *Piper*. Foi realizado, em Minas Gerais, o estudo comparativo dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *P. amalago*, *P. arboreum*, *P. cernuum*, *P. hispidum*, *P. regnellii*, *P. vicosanum* e *Pothomorphe umbellata* se isolou e identificou vários mono e sesquiterpenos (Mesquita *et al*, 2005). A porcentagem de identificação entre monoterpenos e sesquiterpenos tiveram variações em relação à data de coleta, para a mesma espécie. Os dados desta comparação apresentou, dentre os compostos majoritários, os mais frequentes nas 8 espécies estudadas foram β -pineno e espatulenol, seguidos por *E*-cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D, α -pineno e limoneno.

A composição do óleo essencial de *Piper cernuum* e *Peperomia emarginella* coletadas no Vale do Itajaí em Santa Catarina, foi descrita por meio de análise em Cromatografia gasosa e CG/EM. A espécie *Piper cernuum* forneceu um óleo constituído principalmente por α -pineno (2.5%), 13-elemeno (2.6%), 3-cariofileno (4.4%), germacreno D (2.7%), 3-diidroagarofurano (31.0%), elemol (12.0%), e 10-epi-eudesmol (13.0%). Já a espécie *Peperomia emarginella* forneceu o óleo mais interessante devido a seu odor agradável e intenso, onde o limoneno (29.0%) e o decanal (33.0%) descrevem 62.0% da composição total (ABREU, *et al*2005). O óleo essencial das folhas de *Piper carniconectivum* coletadas no

sul da floresta amazônica foram analisadas e seus componentes majoritários foram o óxido de cariofileno (21,3%) e o β -pineno (19,0%) (FACUNDO *et al*, 2006).

Na mesma linha de estudo de óleos essenciais, estudaram três espécies de *Piper* (*P. amalago*, *P. cernum* e *P. truncatum*) comparando a eficiência de duas técnicas de extração (“headspace” e coobação) (PINTO *et al*, 1996a).

O gênero *Sarcorrhachis* não possui nenhum relato de estudos de óleos essenciais em literautra.

2. OBJETIVOS

Este trabalho consiste da avaliação fitoquímica de *Sarcorrhachis obtusa*, uma planta da família Piperaceae de ocorrência na Flora Paranaense, ainda não estudada quimicamente. A avaliação fitoquímica engloba o isolamento e identificação dos metabólitos secundários presentes nos galhos e o estudo dos óleos essenciais das folhas e caules. Também será realizada a síntese do isômero da aegelina, uma amida encontrada no mesmo gênero da espécie proposta para estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Métodos Gerais

- Os reagentes e solventes empregados nos procedimentos, quando necessário, foram previamente tratados de acordo com procedimentos descritos em literatura (PERRIN, 1998).
- Os solventes foram removidos em um evaporador rotativo Büchi, operando à pressão reduzida de 30mmHg.
- Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN¹³C) e hidrogênio (RMN ¹H) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini operando a 7,3 Tesla (DQ-UEM) e/ou em um espectrômetro BRUKER[®] AC 200 operando a 4,7 Tesla. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃) e metanol deuterado (CD₃OD) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).
- Os espectros HMBC e NOE foram registrados em espectrômetros BRUKER[®] AVANCE 400 BB operando a 9,4 Tesla. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃) e metanol deuterado (CD₃OD) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).
- As medidas de α_D foram feitas em um polarímetro Rudolph modelo Autopol III com λ 589 nm e padrão interno de calibração com leitura de $33,9732^\circ \pm 0,0001$ com cubeta de comprimento de 1 dm.
- Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um Micromass VG-AutoSpec (IQ - UNICAMP) e o modo de ionização foi impacto eletrônico.
- As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em sílica gel 60 PF254 da Merck, sobre suporte de vidro (espessura 0,50 mm). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada de UV (366 e 254 nm) e posterior revelação com anisaldeído e aquecimento.

- As cromatografias em coluna foram feitas com sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) da Merck, como fase estacionária. A proporção da sílica foi cerca de 20 vezes o peso do produto bruto a ser purificado.
- As análises de cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo VARIAN SATURN 3800 equipado: VA-5 (30 x 0,25 x 0,25.) temp. de inj. 250°C rampa de aquecimento 60°C – 3C°/min -240°C, gás hélio fluxo de 1mL/min.
- A hidrodestilação foi realizada em laboratório, utilizando um aparelho de Clevenger modificado (DEUTSCHES, farmacopéia alemã).
- O espectro de absorção na região do infravermelho foi registrado em um equipamento BIORAD Modelo: FTS-3500 GX. As amostras foram preparadas na forma de um filme líquido sobre pastilhas de KBr e as absorções são expressas em número de onda (cm^{-1}).

3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *Sarcorhachis obtusa*

3.2.1 COLETA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O presente trabalho iniciou-se com a coleta do material vegetal, *Sarcorhachis obtusa*. A coleta foi realizada na estrada da Graciosa, Reserva Florestal do Estado do Paraná. A planta foi identificada pelo botânico Gert Hatschbachii. O material vegetal foi separado em caules e folhas. O caule foi seco em estufa a 40° C, moído, obtendo-se a massa de 116,517g e em seguida extraído por percolação. A percolação foi realizada com solventes de diferentes polaridades: éter de petróleo, diclorometano e etanol. O volume do solvente utilizado para cada extração foi de 150 mL. As massas obtidas dos extratos foram: extrato em éter de petróleo (EEP) 1,08 g; extrato diclorometânico (ED) 1,16 g e extrato etanólico (EE) 1,15g.

As análises dos extratos foram feitas através de placas de CCD, as quais foram submetidas à lâmpada de UV e reveladas em anisaldeído. Após análise dos três extratos por CCD, em lâmpada de UV, e revelação em anisaldeído, foram submetidos à análise em RMN ^1H , para então dar início à purificação do extrato diclorometânico.

3.2.2 EXTRATO DICLOROMETÂNICO DOS CAULES.

A purificação deste extrato iniciou-se com uma coluna filtrante de sílica gel e gradientes de eluição conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Coluna Filtrante do ED dos caules de *S. obtusa*.

Extrato	Volume Solvente	Solvente	Massa
I	150mL	EP/ CH ₂ Cl ₂ 50%	0.0836g
II	130mL	CH ₂ Cl ₂	0.0643g
III	150mL	CH ₂ Cl ₂ / MeOH 50%	0.9429g
IV	150mL	MeOH	0.0534g

Foi realizada uma coluna cromatográfica com Fração III resultando em 132 frações, as quais foram agrupadas após análise por CCD, conforme a tabela 1.1:

Tabela 1.1. Frações da coluna cromatográfica de F III do extrato diclorometânico.

Frações (agrupadas)	Eluente	Massa em g
01 – 49	CH ₂ Cl ₂	0,0144
40 – 53	CH ₂ Cl ₂ 5% MeOH	0,0091
42	CH ₂ Cl ₂ 5% MeOH	0,0007
54	CH ₂ Cl ₂ 10% MeOH	0,0036
55 – 58	CH ₂ Cl ₂ 10% MeOH	0,0377
59 – 65	CH ₂ Cl ₂ 10% MeOH	0,728
66 – 67	CH ₂ Cl ₂ 10% MeOH	0,0335
68 – 75	CH ₂ Cl ₂ 15% MeOH	0,0820
76 – 85	CH ₂ Cl ₂ 15% MeOH	0,0034
86 – 100	CH ₂ Cl ₂ 15% MeOH	0,0066
101 - 103	CH ₂ Cl ₂ 15% MeOH	0,0044

104 – 106	CH ₂ Cl ₂ 25% MeOH	0,0073
107 – 112	CH ₂ Cl ₂ 50% MeOH	0,0044
113 – 132	MeOH	0,0025
	soma	0,9385

A fração III foi purificada, por sucessivas colunas cromatográficas e cromatografia em camada preparativa, resultando no isolamento da substância **A** (30,0mg), também presente em várias outras frações e de uma mistura esteroidal de sitosterol e estigmasterol (2,0mg), substância **B1** e **B2** (esquema 2).

3.2.3 EXTRATO ETANÓLICO DOS CAULES

O extrato etanólico, com massa de 1,15g, submetido à extração líquido-líquido com gradientes de solventes, utilizando um volume aproximado de 50mL para cada um. Esta extração gerou frações que foram agrupadas. A tabela 2 apresenta as frações obtidas da extração com os solventes utilizados e suas respectivas massas.

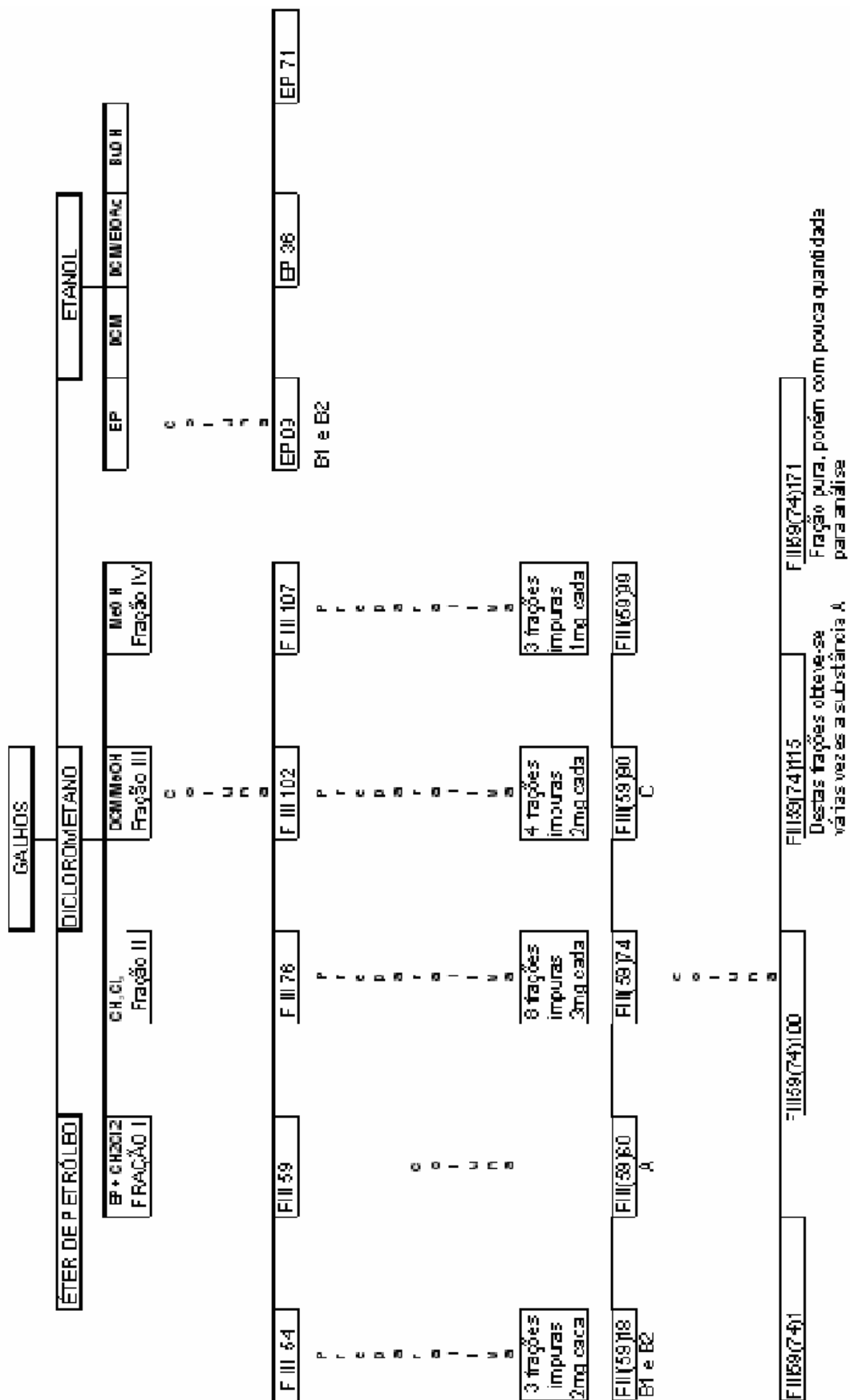
Tabela 2. Extração líquido-líquido do EE dos caules de *S. obtusa*.

Frações Agrupadas	Massas (mg)
EE – F: Éter de Petróleo	448,2 mg
EE – F: CH ₂ Cl ₂	501,1 mg
EE – F: CH ₂ Cl ₂ e Acetato de Etila 25%	48,4 mg
EE – F: N-Butanol	56,4 mg

As frações foram analisadas por CCD, lâmpada de UV e reveladas com anisaldeído. Elas apresentaram várias substâncias com R_f próximos, demonstrando que seria necessário outros métodos cromatográficos para melhor separação. Com a fração em éter de petróleo do extrato etanólico (EE – EP) de massa 448,2mg, foi realizada uma coluna cromatográfica com gradiente de polaridade. Desta coluna obteve-se 100 frações, das quais uma delas, a fração 9 (2,0mg) continha a mistura de esteróides (substâncias **B1** e **B2**). As outras frações

demonstraram alta complexidade e baixa quantidade, dificultando o isolamento de substâncias puras.

O esquema a seguir apresenta um resumo em forma de fluxograma, do trabalho fitoquímico realizado em laboratório:

Esquema 2. Resumo dos fracionamentos dos extratos dos caules de *S. obtusa*.

3.3 Testes de Atividade Antimicrobiana

Para verificar a atividade antimicrobiana dos EEP, ED e EE dos caules de *S. obtusa* e da substância (A) foram utilizadas cinco bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*).

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos e da substância (A), de acordo com o método da microdiluição (ELOFF, 1998), descrito a seguir:

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços são depositados 100 µL de caldo Mueller-Hinton, com exceção da coluna 12, que é utilizada para os controles. Na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL da amostra, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), até a concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio Nutriente Agar e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, 100 µL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº 0,5 e diluídos para concentração final de 10^4 células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 h à 37°C. Após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5%, e a placa re-incubada por 3 h na referida temperatura. A MIC é definida como a menor concentração do extrato ou substância capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Foi também incluído nos testes controle o antibiótico cloranfenicol, para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento do microrganismo.

3.4 Óleos essenciais de *Sarcorrhachis obtusa*

Os óleos essenciais foram extraídos dos caules (100g) e das folhas (100g) através da técnica de hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger durante quatro horas. (DEUTSCHES, farmacopéia alemã) Os óleos foram coletados em éter etílico e armazenados em frascos mantendo-os sob refrigeração até análise por CG/EM.

Os óleos foram analisados num aparelho VARIAN 3800 equipado com uma coluna capilar (30 X 0,25 X 0,25), fase estacionária: 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxana acoplada a um detetor seletivo de massas. As condições de injeção foram: Temperatura do injetor 250°C; rampa de aquecimento numa temperatura programada de 60-240°C, 3 °C/min; split; gás hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min; volume injetado de 1 µL. Os constituintes foram identificados pelos índices de retenção calculados através da co-injeção de uma mistura de *n*-alcanos e comparação dos seus espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2001; SATCH *et al*, 1969).

Equação de Van den Dool e Kratz

Onde:

$$IR = 100 \cdot N \frac{[t_x - (t_{n-1})]}{[t_n - (t_{n-1})]} + 100 (C_{n-1})$$

$$N = C_n - (C_{n-1})$$

C_n = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada.

C_{n-1} = número de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada.

t_x = tempo de retenção da substância analisada.

t_n = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada.

t_{n-1} = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância

3.5 Síntese

3.5.1 Preparação de Mandelonitrila (25, esquema 3). Em um balão mantido sob agitação magnética e a 0°C, adicionou-se bissulfito de sódio (10,4 g) em 35mL de água e benzaldeído (**24**) (10,2 mL). Em seguida adicionou-se lentamente cianeto de potássio (6,51g em 20 mL de água). Após uma hora de agitação à 10°C aumentou-se à temperatura a 25°C por mais duas horas sob agitação. Adicionou-se éter etílico, mantendo-se sob agitação por 12 horas, separou-se as fases, extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (5 x 20mL), lavou-se com solução de NaCl (2 x 75 mL) e secou-se com sulfato de magnésio (aproximadamente 5

g de MgSO_4 para 400 mL de solução) por 20 minutos. Depois de filtrada, a solução foi mantida por dois dias à -10°C . Rendimento de 69% (SATCH *et al*, 1969).

IV(ν máx, filme cm^{-1}): 3410, 2652, 2308, 1495. (anexo V)

3.5.2 Preparação de 1-amino-2-feniletanol (26, esquema 3). Em um balão, contendo metanol (45,0 mL) e mandelonitrila (**25**) (1,0g) sem purificação prévia, foi adicionado cloreto de cobalto hexaidratado (3,5 g) e lentamente boroidreto de sódio (2,8 g), permanecendo sob agitação por uma hora a 20°C . Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico (15,0 mL, 3,0 mol/L) até que o precipitado preto fosse dissolvido. Destilou-se o metanol, coletou-se a fase aquosa e adicionou-se hidróxido de amônio concentrado até pH 9 -10. Em seguida foi extraída a fase aquosa com éter etílico (4 x 40 mL). A fase etérea foi lavada com cloreto de sódio saturado secando-se com sulfato de sódio anidro. Obteve-se 78% do produto bruto.⁴⁰

RMN ^1H (200MHz – CDCl_3) δ : 2,63 – 2,82 (m, 2H); 4,50 – 4,55 (m, 1H); 7,25 (m, 5H), figura 38, anexo VI.

RMN ^{13}C (75MHz – CDCl_3) δ : 49,1; 74,0; 142,8; 125,7; 127,2; 128,2, figura 39, anexo VI.

3.5.3 Preparação de N-2-fenil-2-hidroxi-4-metoxicinamamida (A - I, esquema 3). Em um balão equipado com agitação magnética sob atmosfera de argônio, solubilizou-se o ácido p-metoxicinâmico (**27**) (178,0mg) em diclorometano anidro, em seguida, adicionou-se cloreto de oxalila (0,09mL). Paralelamente, em outro balão, também equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, contendo 1-amino-2-feniletanol (**26**) (164,4mg) e acrescentou-se trietilamina (0,2mL), misturou-se ao balão contendo a solução de ácido p-metoxicinâmico. A condensação foi realizada sob temperatura ambiente. Rendimento de 0,1315g (80%).

RMN ^1H (200MHz – CDCl_3 , MeOD) δ : 3,40 (*dd*, 1H); 3,60 (*dd*, 1H); 3,8 (s, 3,H); 4,78 (*dd*, 1H); 6,26 (*d*, 1H); 6,79 (*d*, 2H); 7,22 (*m*, 9H), figura 35, anexo IV.

RMN ^{13}C (100MHz – CDCl_3 , MeOD) δ : 47,0; 54,9; 72,6; 113,9; 117,5; 125,5; 127,2; 127,3; 128,0; 129,1; 140,5; 141,7; 160,7; 167, figura 36, anexo IV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância de se estudar um gênero quimicamente desconhecido desta família tão interessante em seus aspectos farmacológicos, despertou a realização da atual pesquisa, onde se obteve os resultados descritos abaixo.

A espécie foi coletada na Estrada da Graciosa, município de Morretes, Recanto Belo Vista-PR, sendo classificada pelo botânico Gerdt Hatchbach do Museu Botânico de Curitiba. Após a coleta, secagem e moagem do caule, realizou-se a extração com três solventes de diferente polaridade (éter de petróleo, diclorometano e metanol). Estes possibilitaram uma separação inicial dos metabólitos secundários nos extratos, ou seja, substâncias apolares presentes no EEP; média polaridade no ED e alta polaridade no EE.

Análise de RMN¹H dos extratos EEP e EE demonstraram claramente distinção entre eles. O espectro do EEP apresentou muito poucos sinais, sendo todos concentrados na região de compostos alifáticos (1-2ppm). Provavelmente são ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia longa, devido ao sinal de maior intensidade em 1,25 ppm, característicos de grupos metileno nestes compostos.

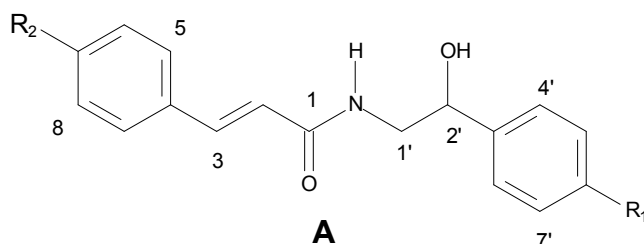
O espectro de RMN ¹H do EE apresentou sinais em torno de 4,0 e 7,0 ppm, sendo respectivamente sinais característicos de hidrogênios ligados a heteroátomos ou sobre ligação dupla e hidrogênios de aromáticos. O espectro também apresentou o sinal característico de grupos metilenos em hidrocarbonetos (1,25ppm).

No espectro de RMN ¹H do extrato ED verificou-se sinais na região de compostos alifáticos em torno de 2,0ppm, sinais de hidrogênios ligados a heteroátomos e também sinais de hidrogênios em região de aromáticos em torno de 7,0 ppm.

4.1 Substância A

Foram realizadas análises de RMN ^1H (300MHz) e RMN ^{13}C (75MHz) da fração F-III-59(60) identificada neste trabalho como substância A (36mg). Observou-se no espectro de RMN ^1H (figuras 26, 27 e 28, anexos II) sinais em 3,40ppm como duplo dubleto (dd) com constante de acoplamento de 8,3 e 14Hz, integrando para 1 hidrogênio (1H); em 3,60ppm (dd, $J= 4$ e 14Hz, 1H) e em 4,8Hz (dd, $J= 4$ e 8Hz, 1H). Pelas constantes de acoplamento, sabe-se que os hidrogênios em 3,40 e 3,60ppm são geminais ($J=14\text{Hz}$) e, portanto deve ser um metileno acoplando com um grupo metino (CH) em 4,8ppm ($J= 4$ e 8Hz). Observou-se também a presença de um grupo metoxila ligado no anel aromático (3,80ppm, s, 3H) e dois dubletos em 6,5 e 7,6 ppm (1H, $J= 15,6\text{Hz}$) referente a hidrogênios sobre ligação dupla em posição *trans*. E finalmente dois multipletos em região de aromáticos (7,37 ppm, 3H e 7,50 ppm, 2H) que é típico de anel aromático monosubstituído e dois dubletos em 6,9ppm ($J=8,7\text{Hz}$, 2H) e em 7,31ppm ($J=8,7\text{Hz}$, 2H), típico de aromático *para* substituído. Análise do espectro de RMN ^{13}C (figuras 29, 30 e 31, anexos II) mostrou os sinais esperados para o sistema metileno - metino (C-1' em 47,7 e C-2' em 72,8 ppm), para o sistema da ligação dupla *trans* (141,7 e 120,9 ppm), para a metoxila (55,4 ppm), e para a carbonila (168 ppm). Os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C estão na tabela 3.

Através dos dados obtidos pelo experimento HETCOR pode-se definir os hidrogênios diretamente ligados aos carbonos, representados na estrutura (**A**) e mostrados na tabela 3.



A - I
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OCH}_3$

A - II
 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$

Tabela 3. Dados referentes a análises de RMN¹H e RMN¹³C associados à análise de HETCOR para o composto **A**.

Nº Carbono	¹³ C (ppm)	¹ H
1	168,3	-
2	120,9	6,50 ppm (d, J= 15,6Hz, 1H).
3	141,7	7,60 ppm (d, J= 15,6Hz, 1H).
4	135,4	-
5, 9	128,3	7,50 ppm (m, 2H).
6, 7, 8	129,3	7,37 ppm (m, 3H).
1'	47,7	3,40 ppm (dd, J= 14 e 8,3Hz, 1H). 3,60 ppm (dd, J= 14 e 4,0Hz, 1H).
2'	72,8	4,80 ppm (dd, J= 8,3 e 4,0Hz, 1H).
3'	134,8	-
4', 8'	127,7	7,31 ppm (d, J= 8,7Hz, 2H).
5', 7'	114,3	6,80 ppm (d, J= 8,7Hz, 2H).
6'	159,8	-
Me	55,4	-

Diante dos dados determinou-se a estrutura descrita na figura 7, porém sem definir a localização da metoxila nos anéis aromáticos.

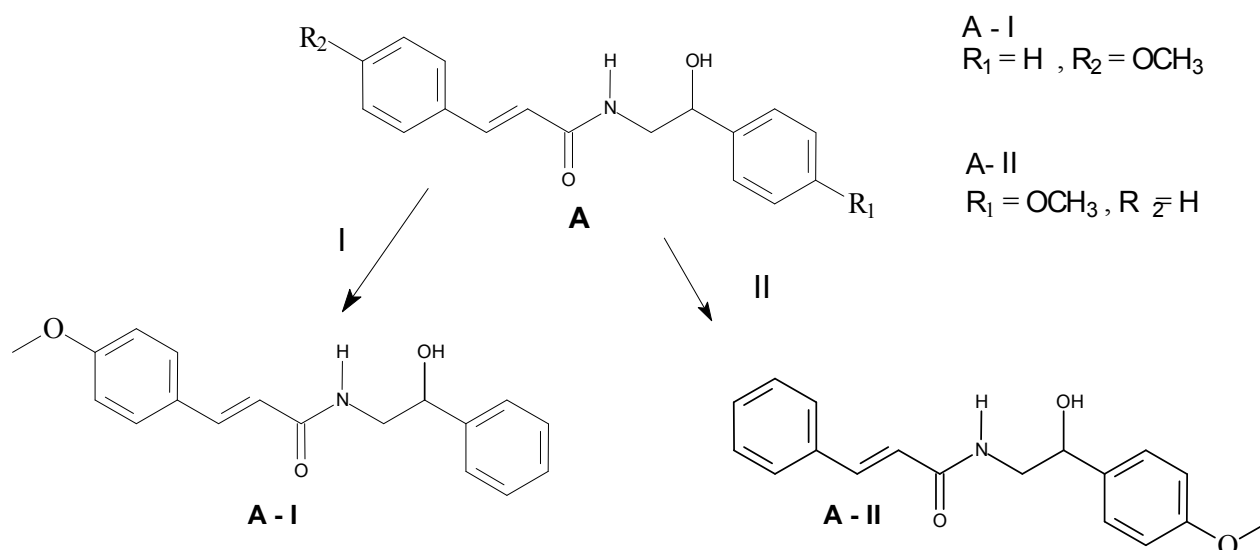


Figura 7. Possibilidades do posicionamento da metoxila nos anéis aromáticos do composto **A**.

Foi também realizada a análise do espectro de massas de alta resolução (figura 8).

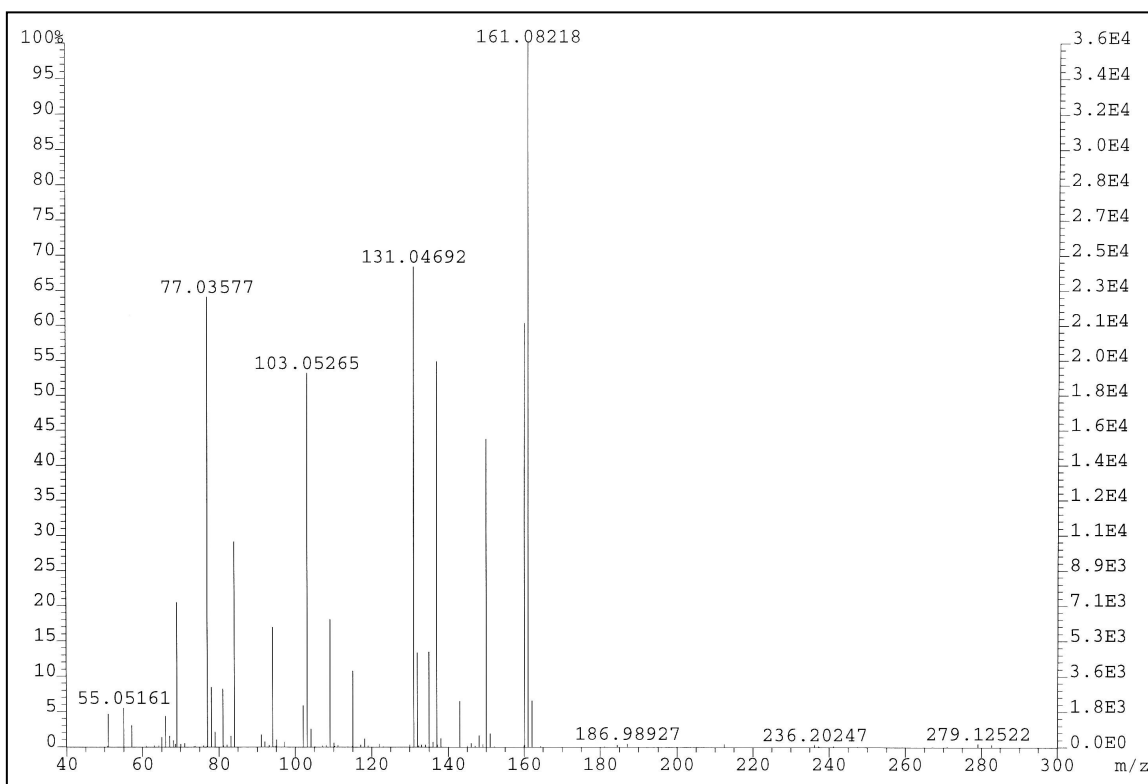


Figura 8. Espectro de Massas de alta resolução da substância **A**.

Através da análise do espectro de massas pode-se definir em qual anel aromático a metoxila está ligada. A massa molar do composto (M^+ 297) analisado não foi detectada, devido à rápida perda de uma molécula de água e a confirmação da presença do nitrogênio na estrutura se deu pela massa ímpar do fragmento m/z 279,12522. Pelo fato do experimento realizado ser de alta resolução, o pico base m/z 161,0822 aproxima-se da proposta de fragmentação da estrutura **A - II** (figura 9).

As propostas de fragmentações para o composto **A** podem ser visualizadas na figura 9.

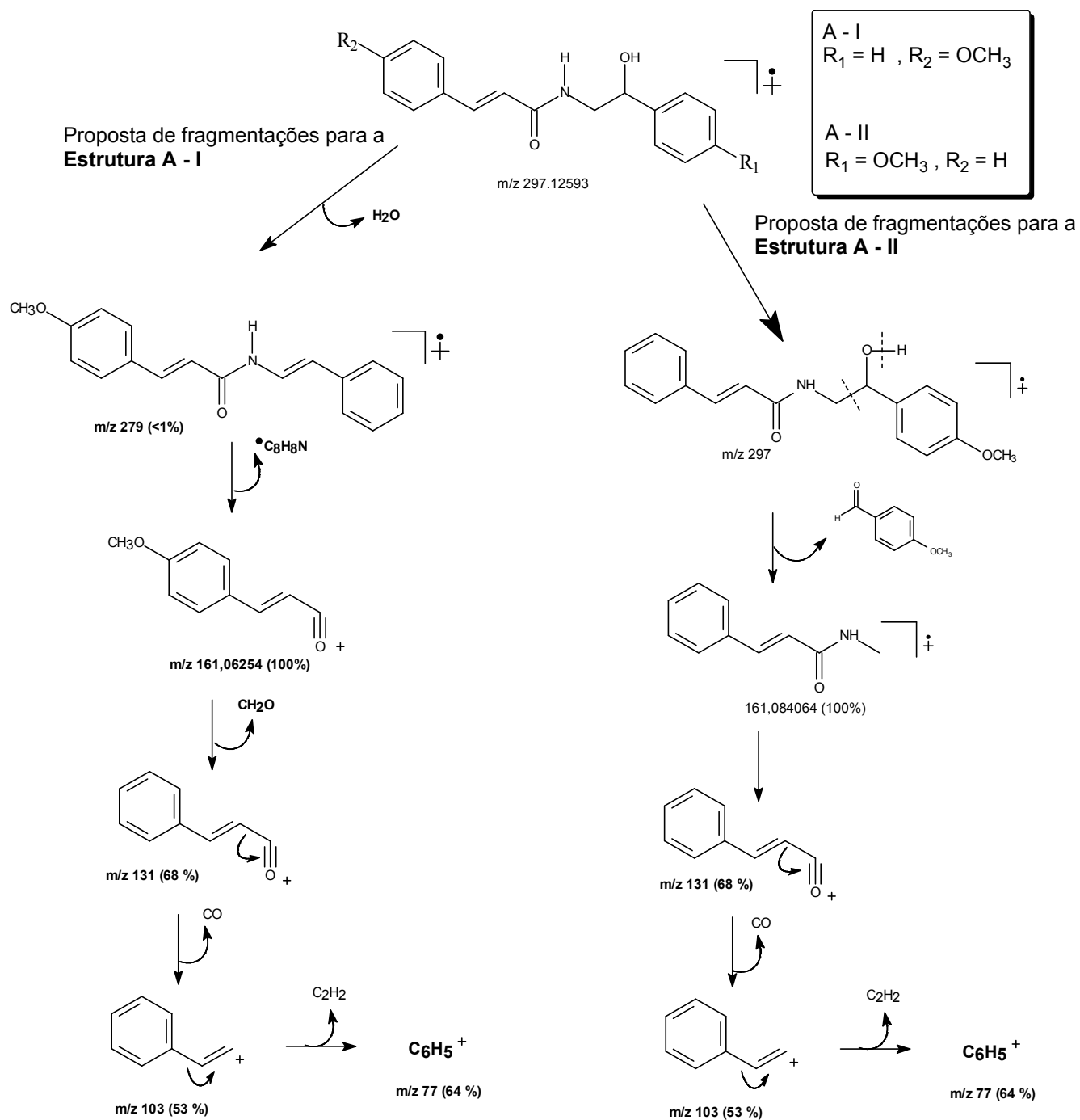


Figura 9. Propostas de Fragmentações da substância **A**.

Foram realizados também, os experimentos HMBC e NOE dessa substância. A seguir a tabela 4 representa os dados obtidos através do experimento HMBC, confirmado pelo NOE.

Tabela 4. Dados referentes à substância aegelina (substância **A**), analisados através do HMBC (figura 32, anexo II).

Nº Carbono	Carbono (ppm)	Hidrogênio (ppm)
1	167,4	6,45 (J^2); 7,64 (J^3); 3,76(J^3); 3,44(J^3)
2	120,2	7,64 (J^2)
3	141,6	6,45 (J^2)
4	134,9	7,64 (J^2); 7,5 (J^2); 7,37 (J^3)
5, 9	128,0	7,37 (J^2); 7,64 (J^3)
6, 7,8	129,9	7,50 (J^2); 7,37 (J^3)
1'	47,5	4,84 (J^2)
2'	72,9	3,44 (J^2); 3,76(J^2); 7,34(J^3).
3'	134,2	4,84 (J^2);3,44, (J^3); 3,76 (J^3); 6,98 (J^3).
4', 8'	127,3	6,98 (J^2); 4,8 (J^3).
5', 7'	114,1	7,34 (J^2); 6,98 (J^3).
6'	159,4	6,98 (J^2) 7,34 (J^3); 3,8 (J^3).
Me	55,4	-

A figura 10 apresenta a análise do experimento HMBC, ressaltando as principais interações.

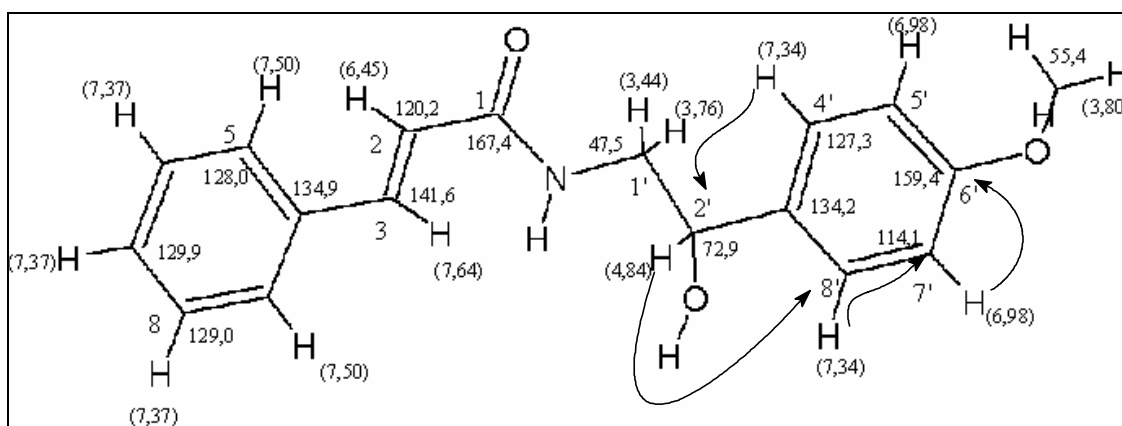


Figura 10. Principais interações observadas no experimento HMBC do composto **A-II**.

Pode-se observar pelo espectro de correlação HMBC (figura 11 e 11a), a correlação a três ligações (J^3) do hidrogênio 2' (4,84 ppm) com os carbonos 8' e 4' (127,3 ppm) e vice-versa, os hidrogênios 8' e 4' (7,34 ppm) com o carbono 2' (72,9ppm).

Verifica-se também, a correlação a duas ligações (J^2) dos hidrogênios 4' e 8' (7,34ppm) com os carbonos 5' e 7' (114 ppm), e os H-5' e H-7' (6,98ppm) com o C-6' (159,4ppm). Com estas correlações observadas, considerando a seqüência de H-2' / C-8', H-8' / C-7' e H-7' / C-6', confirmou como a estrutura **A - II** como a correta (figura 7).

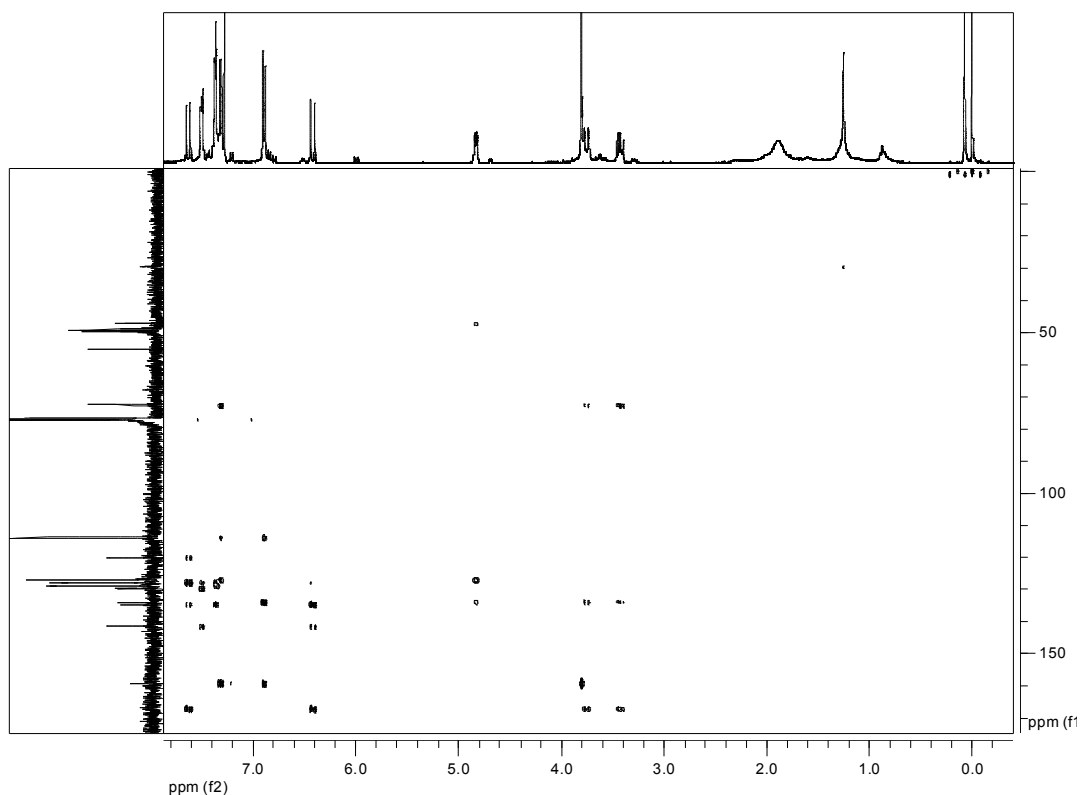


Figura 11. Espectro de HMBC do composto **A-II**, operando a 9,4 Tesla.

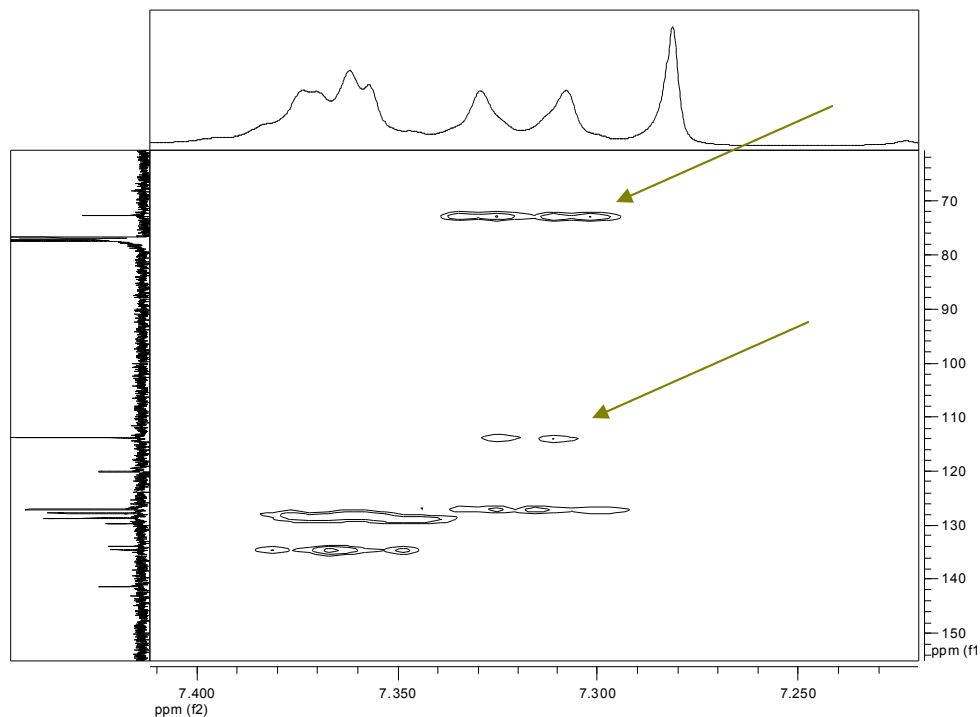


Figura 11a. Expansão do HMBC da substância **A-II** mostrando, principalmente, as correlações entre os H-8' com C-7' (J^2) e H-8' com o C-2' (J^3).

O experimento NOE indicou, após irradiação de H-2', interação espacial com os H-4' e H-8'. A irradiação do H-3 mostrou relação com H-5 e H-9, pertencentes ao anel aromático monossustituído (figura 12).

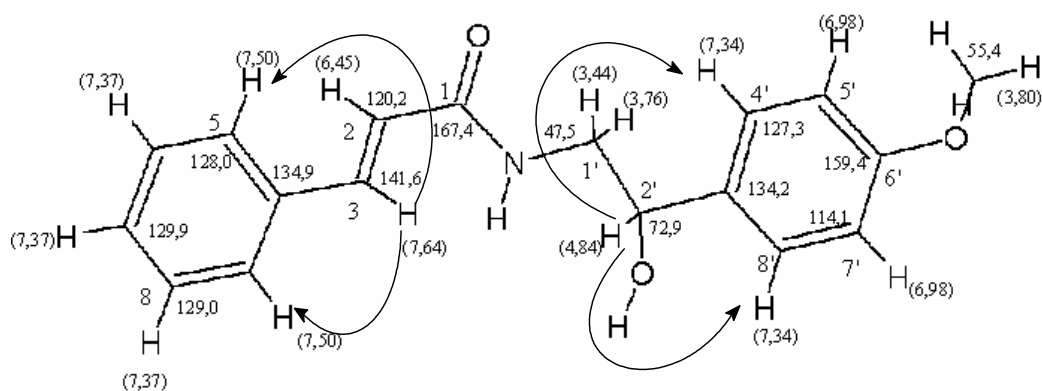
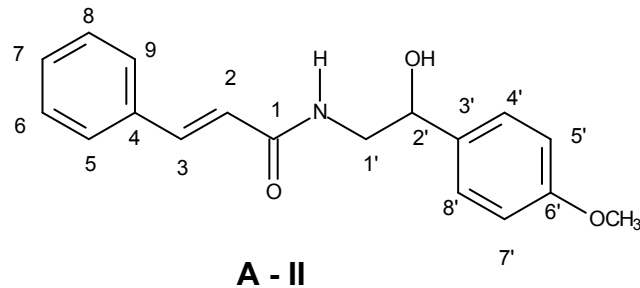


Figura 12. Análise do experimento NOE realizado com a substância **A-II**.

Através das análises envolvendo todos os experimentos discutidos acima, pode-se definir a estrutura correta para a substância **A**, como sendo a (2E)-N-[2'-hidróxi-2'-(6'-metoxifenil) etil]-3-fenil-2-propenamida (estrutura **A - II**).



Esta substância (**A - II**) é abundante nos caules de *S. obtusa*, pois foi isolada na maioria das outras frações do ED estudadas. É conhecida na literatura como aegelina (**19**) e foi à única substância isolada de *Sarcorhachis naranjoana* dentre outras fontes naturais (WILLIAMS, C. *et al*, 2003). Aegelina é bastante estudada, principalmente sua síntese, devido a sua atividade biológica. (CHO B. T *et al*, 2002; PATRA *et al*, 1981; RAMALINGAM *et al*, 2005)

4.2 Substância B

A análise fitoquímica do ED resultou também no isolamento da mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (substância **B**), a qual foi isolada da fração III deste extrato (esquema 2).

Os sinais característicos da mistura de esteróides (substância **B**) podem ser evidenciados como sendo: duplete com deslocamento químico em 5,3 ppm, integração para 2 hidrogênios e atribuído ao H-6 do β -sitosterol (**B1**) e do estigmasterol (**B2**); dois duplos dubletos em 5,0 ppm com integração para 1 hidrogênio cada, atribuídos ao H-22 e H-23 do estigmasterol. A presença de um multiplete em 3,5 ppm, característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico foi atribuído ao H-3 dos estigmasterol e sitosterol. A atribuição dos hidrogênios e carbonos das duas moléculas estão de acordo com os dados de literatura (GOAD, 1991) e com o padrão disponível em nosso laboratório. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C estão no anexo III.

4.3 Óleos essenciais de *Sarcorhachis obtusa*

Os óleos essenciais das folhas e caules de *S. obtusa*, obtidos através da técnica de hidrodestilação, foram analisados por CG/EM e os cromatogramas estão apresentados a seguir. Óleos essenciais são largamente estudados e no gênero *Piper* tem-se vários relatos em literatura, mas para *Sarcorhachis*, este trabalho é o primeiro que descreve a composição dos óleos. A figura 13 mostra as partes aéreas de *S. obtusa*.

Observa-se no cromatograma dos óleos das folhas (figura 14) a presença de mono (42%) e sesquiterpenos (24,9%) em teores distintos. Os monoterpenos majoritários são β -felandreno (17,4%) e α -pineno (15,1%), enquanto que os sesquiterpenos majoritários são *E*-cariofileno (9,4%) e biciclogermacreno (7,9%) (tabela 6).



Figura 13. Representação de folhas e caules de *Sarcorhachis obtusa*.

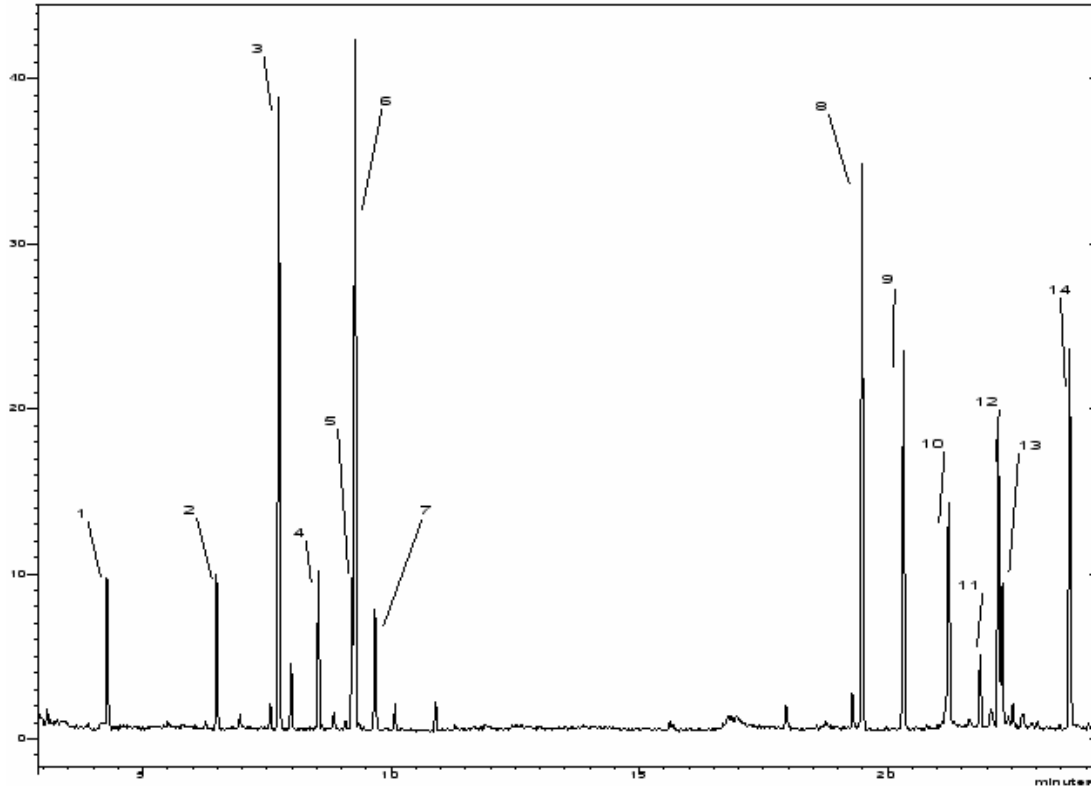


Figura 14. Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Sarcorrhachis obtusa*.

Tabela 6. Principais constituintes dos óleos das folhas de *S. obtusa*.

Picos	Nome do composto	IR(Literatura)	IR _C	Teor(%)
Monoterpenos - hidrocarbonetos				
3	α -Pinoeno	939	939	15,1
4	α -Felandreno	1003	1009	3,5
5	Limoneno	1029	1032	3,2
6	β -Felandreno	1030	1034	17,4
8	(Z) β -Ocimeno	1037	1047	2,8
Sesquiterpenos Oxigenados				
9	(E) Cariofileno	1419	1426	9,4
10	α -Humuleno	1455	1462	5,7
11	Germacreno-D	1485	1488	1,9
12	Biclogermacreno	1500	1502	7,9
Não Identificados				33,2

IR = Índice de Retenção

IR_C = Índice de Retenção calculado. (VAN DEN DOOL, 1964)

O óleo essencial dos caules apresenta teores muito próximos de mono (31,5%) e sesquiterpenos (33,4%) (figura 15, tabela 6). Os componentes majoritários são β -felandreno (17,2%) e *E*-cariofileno (15,6%).

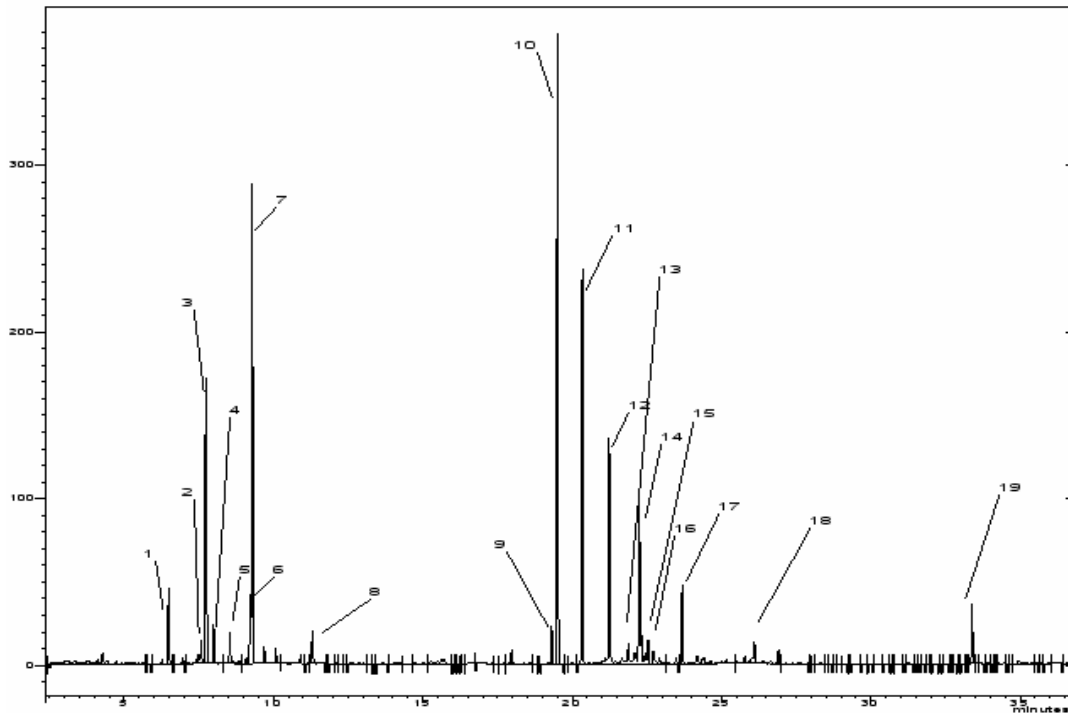


Figura 15. Cromatograma do óleo essencial dos caules de *Sarcorrhachis obtusa*.

Tabela 7. Principais constituintes dos óleos dos caules de *S. obtusa*

Picos	Nome do composto	IR(Literatura)	IR _C	Teor(%)
Monoterpenos Hidrocarbonetos				
3	α -Pinoeno	939	939	9,7
5	α -Felandreno	1003	1009	1,1
6	Limoneno	1029	1032	2,2
7	β -Felandreno	1030	1034	17,2
Monoterpeno Oxigenado				
8	Linalool	1097	1101	1,3
Sesquiterpenos Oxigenados				
11	(<i>E</i>) Cariofileno	1419	1426	15,6
12	α -Humuleno	1455	1463	8,7
13	Germacreno-D	1485	1487	0,7
14	Biciclogermacreno	1500	1503	7,7
16	γ -Cadineno	1514	1523	0,7
Não Identificados				35,1

IR = Índice de Retenção

IR_C = Índice de Retenção calculado. (VAN DEN DOOL, 1964)

O cromatograma a seguir representa a confirmação de que tanto nas folhas como nos caules pode-se observar a mesma distinção entre monoterpenos e sesquiterpenos (figura 16a e b). Verifica-se também que o componente majoritário tanto das folhas como nos caules foi o β -felandreno, onde nas folhas seu teor foi de 17,42% e nos caules de 17,15%. Pode-se constatar que há uma inversão de teores entre monoterpenos e sesquiterpenos nos cromatogramas analisados das folhas e caules, em que a maior porcentagem nas folhas está com os monoterpenos e nos caules esta porcentagem maior é dos sesquiterpenos. Isto está relacionado aos teores do α -pineno (folhas: 15,1% e caule: 9,7%) e do *E*-cariofileno (folhas: 9,4% e caule: 15,6%).

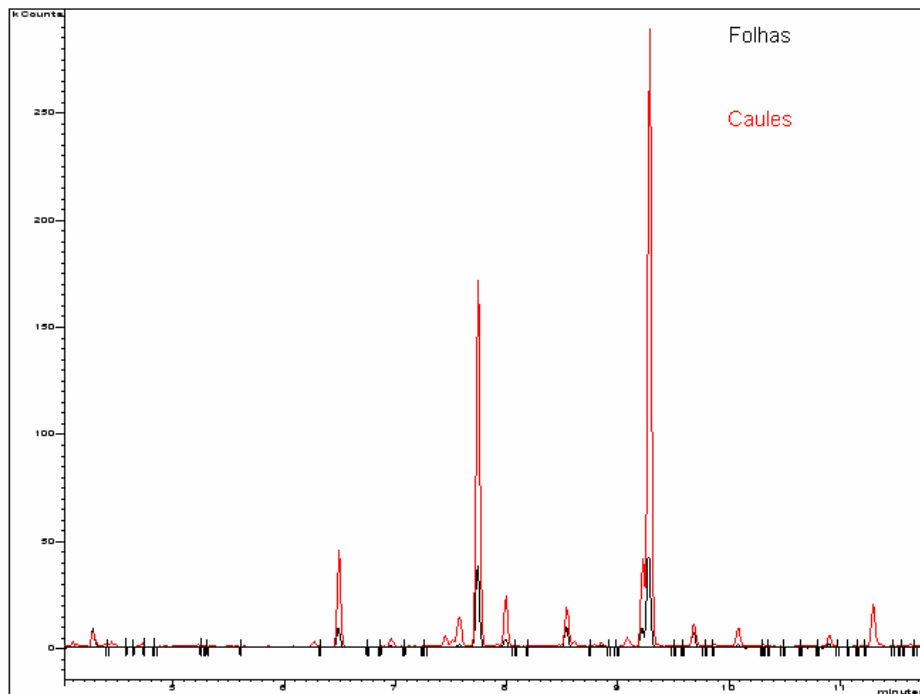


Figura 16a. Sobreposição dos cromatogramas dos óleos essenciais das folhas e caules de *Sarcorrhachis obtusa*; região de monoterpenos.

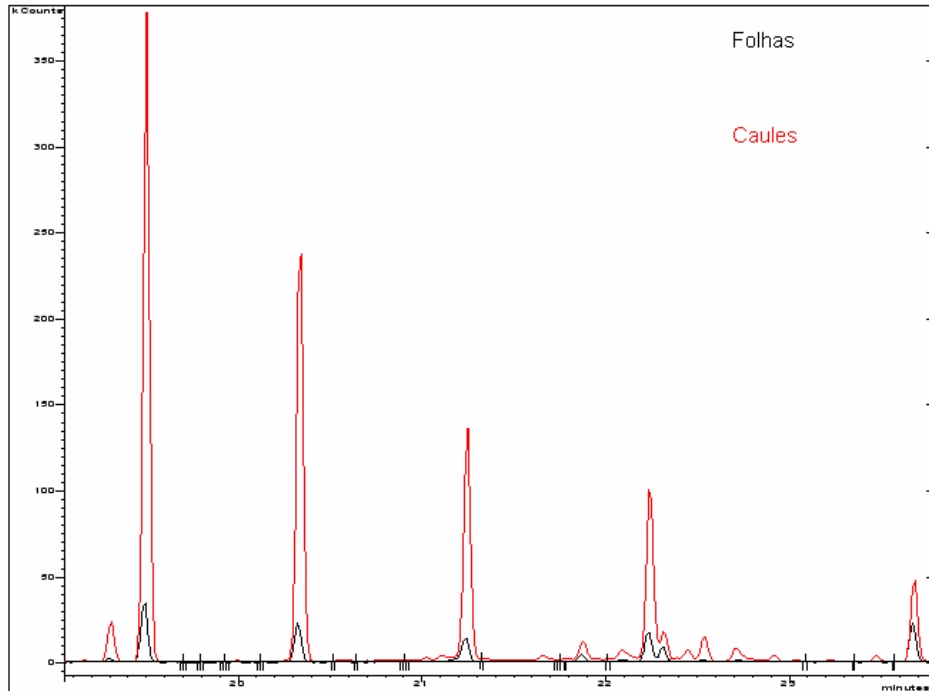


Figura 16b. Sobreposição dos cromatogramas dos óleos essenciais das folhas e caules de *Sarcobachis obtusa*; região de sesquiterpenos.

No anexo XIII, pode-se observar a estrutura dos compostos analisados nos cromatogramas das folhas e caules de *S. obtusa*.

4.4 Testes de Atividade Antimicrobiana

Os testes, de atividade antimicrobiana, realizados com os extratos brutos e a *aegolina* (A -II) estão representados na tabela 8

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *S. obtusa* e de aegelina (**A - II**).

Microrganismos	EEP	ED	Subst. A-II	EE	Cloranfenicol ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	20µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	40µg/mL
<i>Staphylococcus epidermides</i>	800µg/mL	300µg/mL	-	-	40µg/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	400µg/mL	-	-	-	20µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i>	800µg/mL	-	-	-	50µg/mL

(-) >1000µg/mL

^a = droga de referência.

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana, realizados com os extratos brutos foram positivos para os extratos éter de petróleo e diclorometânico. O extrato bruto de éter de petróleo revelou moderada atividade para os microrganismos *S. epidermides* e *M. luteus* e forte atividade para o *B. subtilis*. O extrato bruto de diclorometano revelou forte atividade antimicrobiana para *S. epidermides*.

A substância (**A - II**) não apresentou atividade para nenhum microrganismo testado, apesar do ED ser fortemente ativo contra *S. epidermides* e da aegelina ser a substância majoritária neste extrato.

4.5 Biossíntese de amidas

As espécies de Piperaceae encontram-se evolutivamente na base das Angiospermas e têm sido investigadas como modelos visando reconstruir suas linhagens evolutivas. O processo evolutivo envolve fatores abióticos e bióticos, entre os quais a predação por insetos e a presença de microrganismos associados podem ter afetado de forma considerável a especiação. Os dados disponíveis sobre a composição química demonstram a potencialidade de seus metabólitos quanto a bioatividade. No entanto, o papel dos metabólitos secundários no processo evolutivo de Piperaceae é muito pouco conhecido.

Estudos têm possibilitado caracterizar os diversos grupos de Piperaceae contendo amidas, (oriundos das vias do chiquimato e de policetídeos) (RESEM, 2004).

Como a principal substância isolada de *S. obtusa* foi a aegelina (**A - II**), a qual também foi o único composto isolado de *S. naranjoana*, propõe-se aqui sua biossíntese via rota do chiquimato (figura 17). O ácido chiquímico é o precursor comum para gerar as duas unidades envolvidas na condensação final da biossíntese. São elas, a fenilalanina através de desaminação levando ao ácido cinâmico, e a tirosina através de descarboxilação e posterior hidroxilação levando a β -hidroxitiramina. A condensação destes dois compostos (ácido cinâmico e β -hidroxitiramina) resulta na aegelina.

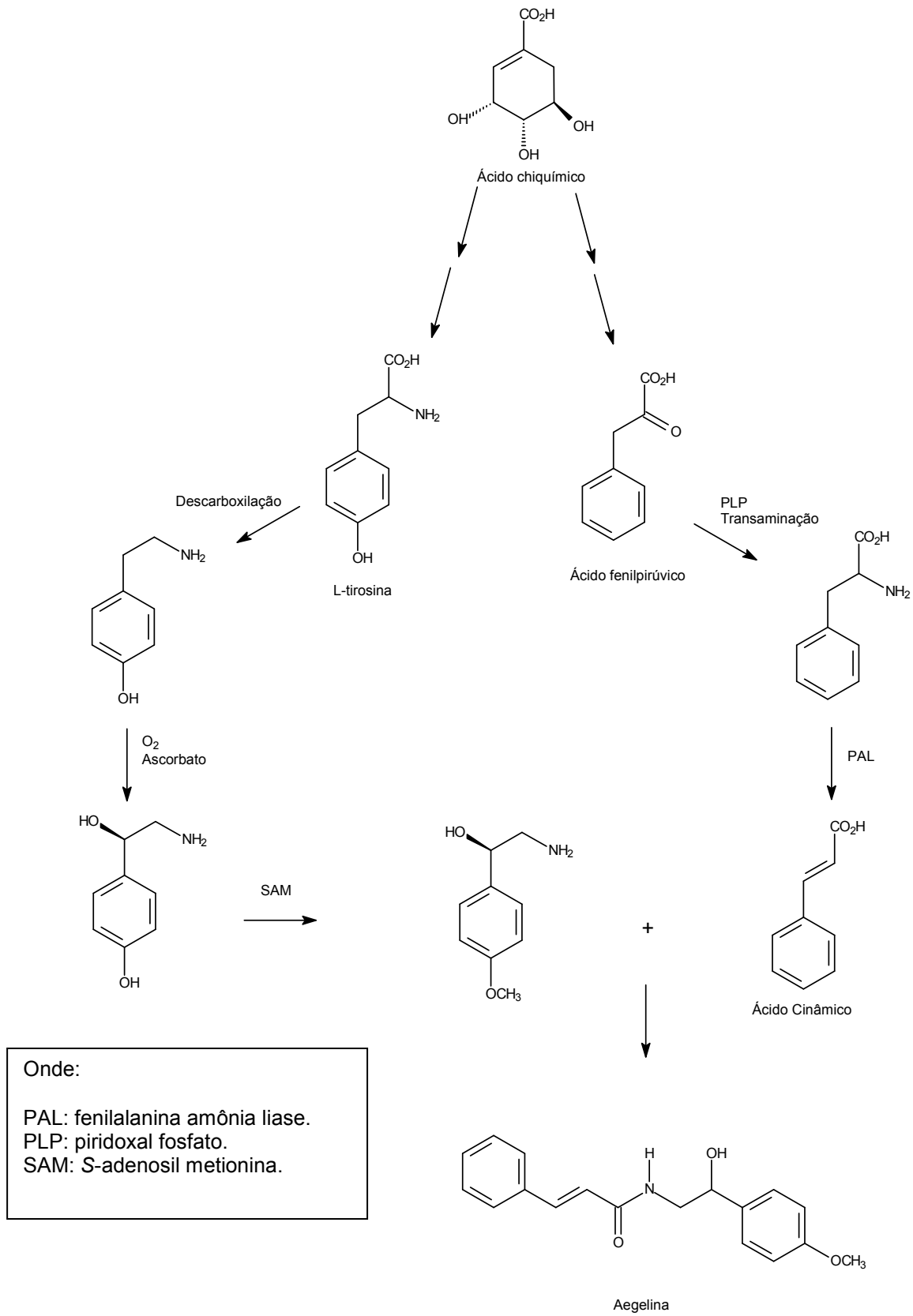
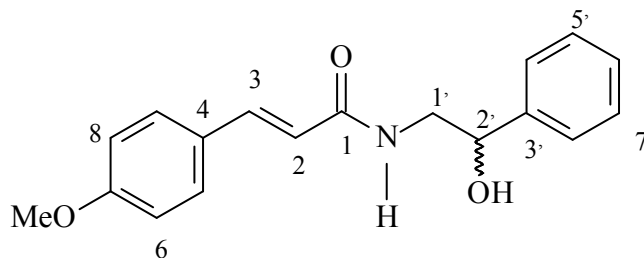


Figura 17. Proposta de biossíntese para a aegelina (**A-II**).

4.6 Síntese da N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4-metoxicinamamida

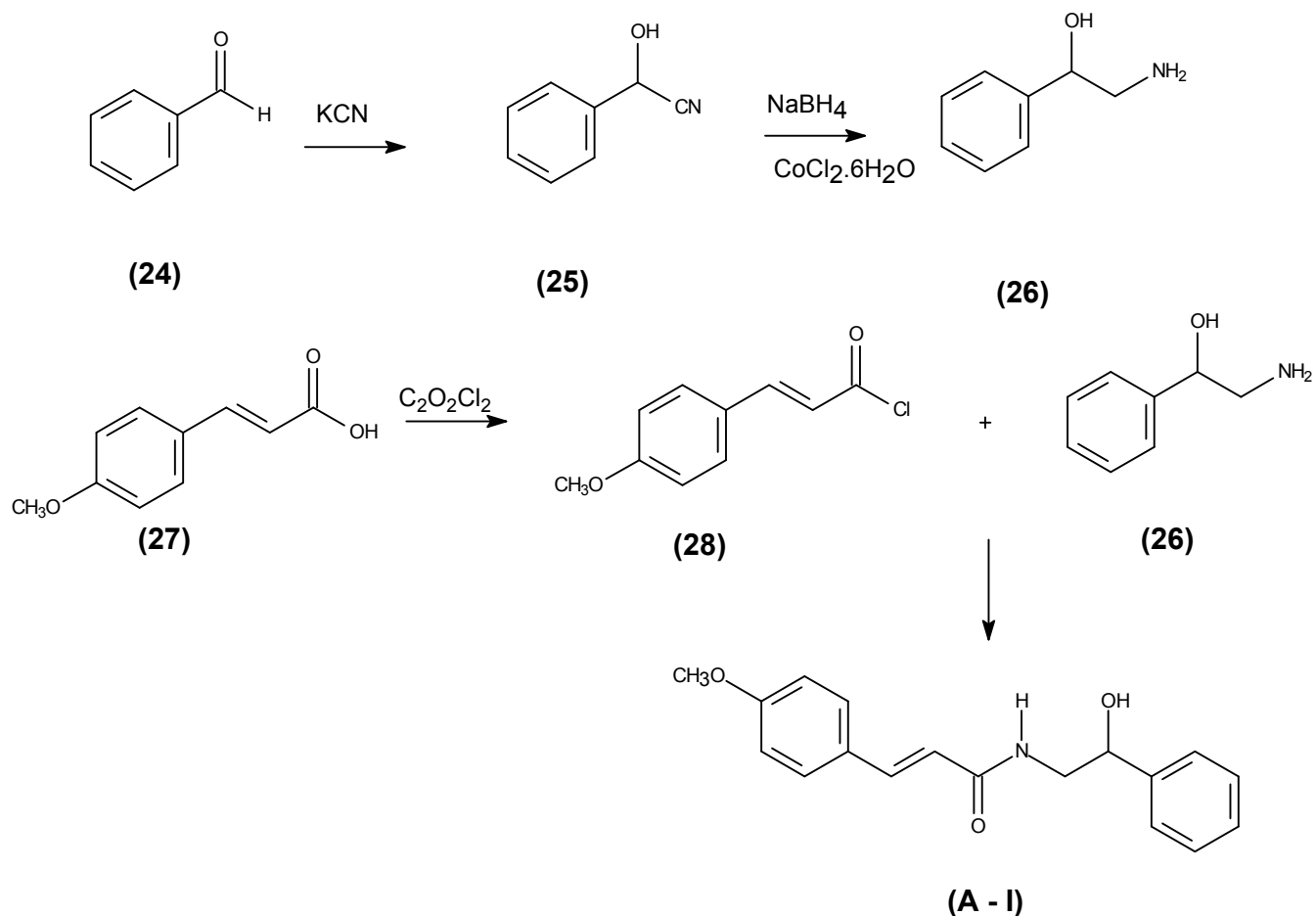
A estrutura **A - II** (figura 7), foi isolada do ED de *S. obtusa* e também verificada em várias outras frações desta mesma planta. Esta substância é chamada de aegelina, devido à ocorrência natural na planta *Aegle marmelos*. Vários métodos de síntese assimétrica da *R*-aegelina foram publicados por possuir atividade hipoglicêmica e propriedade leishmanicida (PATRA *et al*, 1981).

Inicialmente a substância isolada (**A - II**) teve sua estrutura determinada pela análise de EM de baixa resolução como sendo o composto **A - I** (N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4-metoxicinamamida, isômero da aegelina).



(A - I)

Com este resultado parcial, propôs-se sua síntese de acordo com o esquema 3.



Esquema 3. Síntese racêmica da substância **A - I**, N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4 metoxicinamamida, isômero da aegelinina (**A-II**).

A opção desta proposta de síntese (esquema 3), foi pelos reagentes disponíveis em nosso laboratório.

A primeira etapa do caminho sintético foi à preparação do 2-amino-1-feniletanol (**26**). Esta etapa envolveu a preparação da mandelonitrila (**25**), a partir da reação do benzaldeído (**24**) com cianeto de potássio (SATCH *et al*, 1969). Esta reação forneceu uma mistura a qual foi analisada por IV, onde se observou a presença do grupo nitrila em 2300cm^{-1} da mandelonitrila.

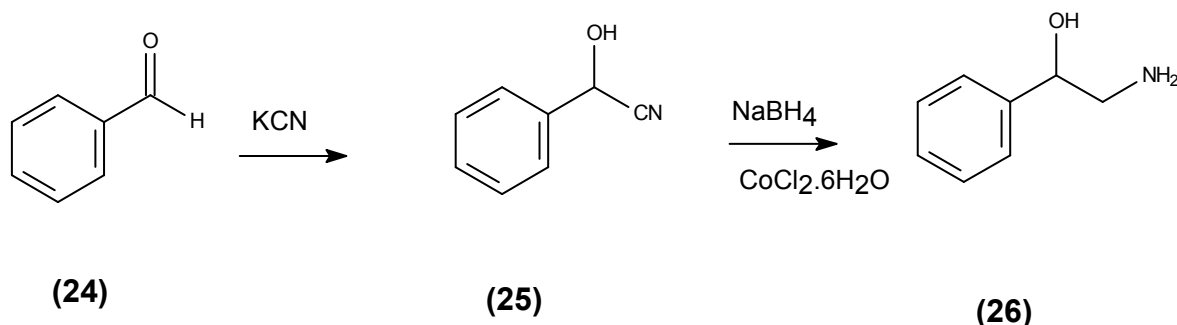


Figura 18. Primeira etapa da síntese racêmica de N-2'-fenil-2'-hidroxietil-4 metoxicinamamida.

Esta mistura reacional foi submetida à reação de redução com boroidreto de sódio utilizando cloreto de cobalto como catalisador (PRASAD *et al*, 1992) cujo produto foi analisado por IV. A formação do aminoálcool pode ser evidenciada pela ausência da banda de vibração na região de 2300 cm^{-1} característica de grupo nitrila e do aparecimento de uma banda larga por volta de 3400 cm^{-1} (anexo V) além das análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C (anexo IV).

O ácido *p*-metoxicinâmico (**27**) foi convertido no cloreto de *p*-metoxicinamoila (**28**) devido ao íon cloreto ser um melhor grupo abandonador que o íon hidroxila, facilitando a condensação com (**26**). A condensação do aminoálcool (**26**) com o cloreto do ácido *p*-metoxicinâmico levou ao produto esperado com 80% de rendimento.

Para confirmação da síntese da substância **A - I**, realizaram-se as análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C (anexo IV), os quais foram comparados com os resultados das análises obtidos para a substância natural (**A - II**) (anexo II).

Os espectros a seguir mostram as semelhanças encontradas pelas análises de RMN ^1H entre as substâncias sintética e seu isômero de origem natural de *S. obtusa*.

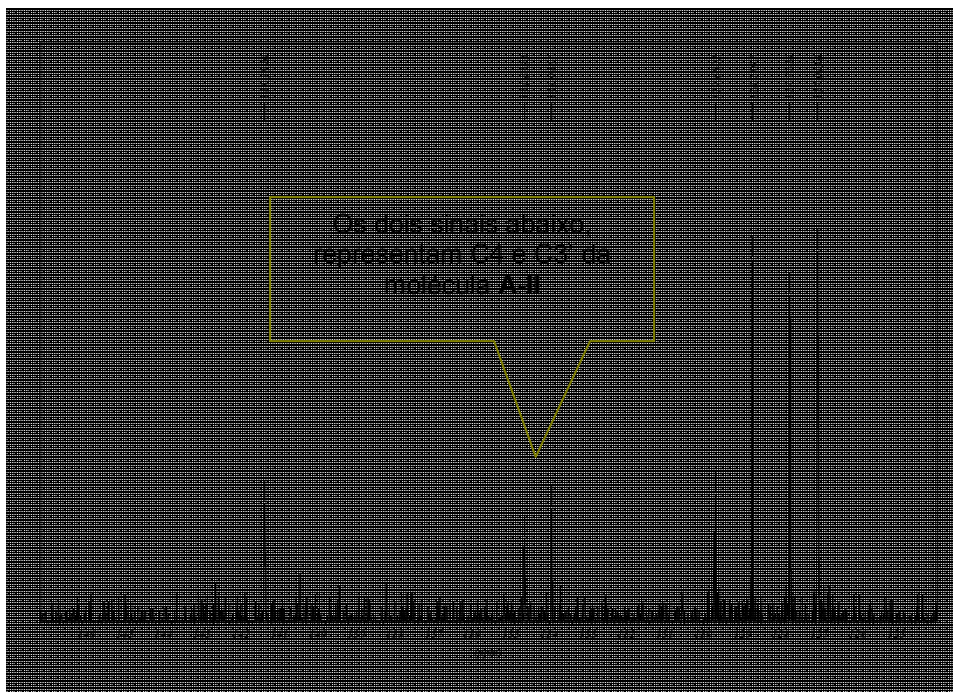


Figura 21. RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância **A - II**.

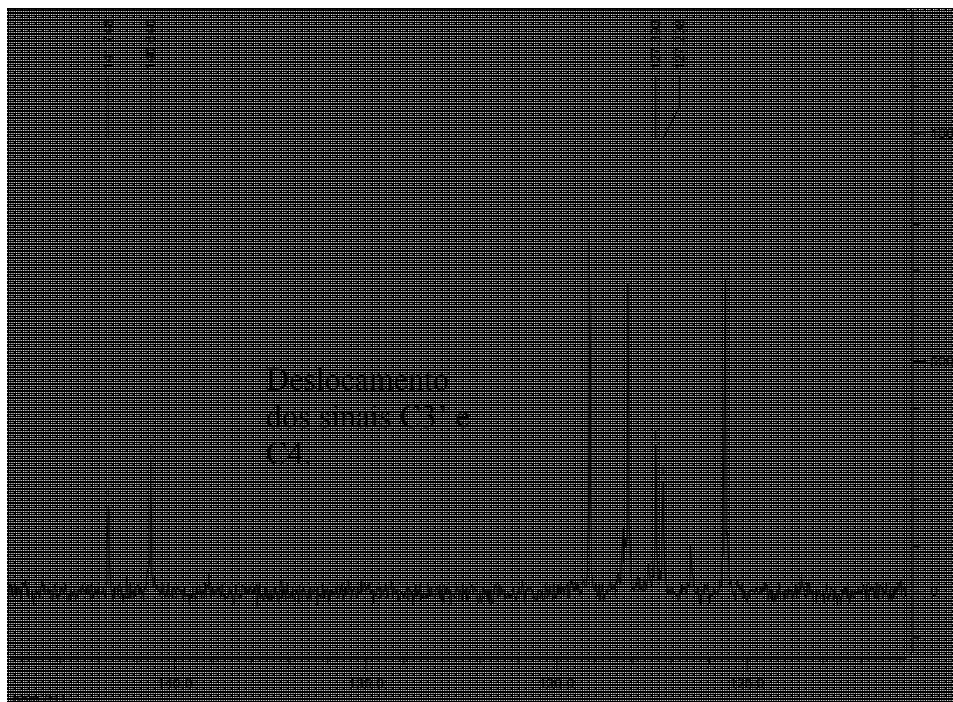
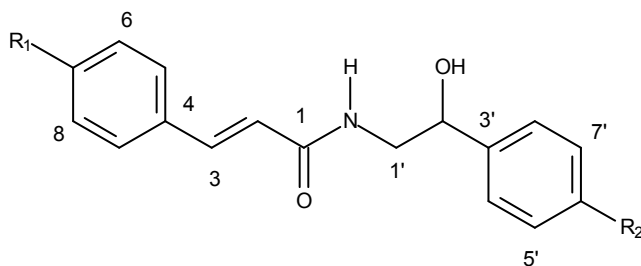


Figura 22. RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância **A - I**.

Na substância natural, os C-3' e C-4 absorvem respectivamente em 134,9 e 134,2 ppm. Estes sinais aparecem deslocados no espectro da sintética para 141,0 e 127,3 ppm, respectivamente (Figuras 21 e 22).

A figura 23 apresenta os dois isômeros, o isolado na planta *S. obtusa* e o sintetizado.



Natural (Estrutura **A - II**) R₁ = H e R₂ = OMe
Sintética (Estrutura **A - I**) R₁ = OMe e R₂ = H

Figura 23. Estrutura das substâncias natural e sintética.

A tabela 9 apresenta os dados de comparação entre as substâncias **A - I** e **A - II** e os dados de literatura referentes as mesmas substâncias (denominadas como: A - I^a e A - II^a) (PATRA *et al*, 1981).

Tabela 9. Dados de RMN ¹³C de A - I, A - II, A - I^a e A - II^a.

	A - I	A - I^a	A - II	A - II^a
C	RMN ¹³ C	RMN ¹³ C	RMN ¹³ C	RMN ¹³ C
1	167.8	165,4	168.3	165,2
2	117.5	119,8	120.9	122,4
3	140.5	138,3	141.7	138,6
4	127.3	127,5	135.4	135,7
5	129.0	129,0	128.3	128,9
6	113.9	114,3	129.3	127,4
7	160.7	160,2	129.3	129,3
8	113.9	114,3	129.3	127,4
9	129.0	129,0	128.3	128,9
Me	54.8	55,3	55.4	55,0
1'	46.5	47,2	47.7	47,1
2'	72.5	71,6	72.8	71,0
3'	141.0	143,7	134.8	135,0
4'	127.49	128,0	127.7	127,2
5'	124.99	126,0	114,3	113,5
6'	126.61	127,0	159,8	158,4
7'	124.99	126,0	114,3	113,5
8'	127.49	128,0	127.7	127,2

FONTE: ^a PATRA *et al*, 1981. Os espectros de carbono 13 foram feitos em aparelho Varian (Campo não mencionado).

5. CONCLUSÃO

Várias plantas da família Piperaceae são reconhecidamente detentora de compostos com atividades biológicas, justificando a importância da verificação dos componentes químicos de *S. obtusa*.

Os óleos essenciais das folhas e caules de *S. obtusa* foram muito semelhantes nos teores de mono e sesquiterpenos, sendo o composto majoritário em ambas as amostras, o β -felandreno. Não existe nenhum relato de óleos essenciais do gênero *Sarcorrhachis* até o momento, mas estão concordantes quando se compara aos óleos do gênero de *Piper*.

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico de *S. obtusa* forneceu como substância majoritária, a amida aegelina (**A-II**) e a mistura de sitosterol (**B1**) e estigmasterol (**B2**). Esta amida é conhecida por possuir atividade biológica, mas neste trabalho ela não se mostrou ativa para as bactérias testadas.

Foi realizada a síntese racêmica do isômero (**A-I**) da aegelina, colaborando na identificação da estrutura do composto isolado (**A-II**).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, A. M; et al. Volatile Constituents of Piperaceae from Santa Catarina, Brazil: Essential Oil Composition of *Piper cernuum* Veil. and *Peperomia emarginella*. **J. Essent. Oil Res**, 17, p. 286-288, 2005.
2. ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois. 2001.
3. AGAREZ, PEREIRA; RIZZINI. **Botânica Angiospermae**. 2^o edição. Rio de Janeiro. Editora: Âmbito Cultural, 1994. 11-71 pp.
4. ALÉCIO A. C; et al. Antifungal Amide from Leaves of *Piper hispidum*. **J. Nat. Prod**, 61, p.637-639, 1998.
5. ARAÚJO Jr, J.X; et al. Avaliação da Atividade sobre o Sistema Cardiovascular da Fração F4.1-2 de *Piper tuberculatum* **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1996. resumo F-114.
6. BERNARDES, E. Piratas da Selva. **Veja**, Ed. Abril, 15/Janeiro, 1997. p 46-47.
7. CHEN, K. e Zhang, S.X. The Isolation and Structural Elucidation on Three New Neolignans, Puberulins A, B and C, as Platelet Activating Factor Receptor Antagonists from *Piper puberulum* **J. Nat. Prod**, 58 (4), p.540-547, 1995.
8. CHO B. T., Kang S. K. e Shin S. H.. Application of optically active 1,2-diol monotosylates for synthesis of β -azido and β -amino alcohols with very high enantiomeric purity. Synthesis of enantiopure (R)-octopamine, (R)-tembamide and (R)-aegeline. **Tetrahedron: Asymmetry**, 13, p. 1209–1217, 2002.
9. CORDELL, G.A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry **Phytochemistry**, 40 (6), p. 1585-1612, 1995.
10. DEUTSCHES A. 10. Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles in Drogen. Grundlfg. Vol 1, V.4.5.8. (Farmacopéia alemã DAB 10)
11. DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2 ed. Londres. John Wiley & Son LTD. p. 507, 2001.
12. ELLOF, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**. 64, p. 711–713.
13. ESTRELA J. L. V; GUEDES R. N. C; MALTHA C. R. A; FAZOLIN M. Toxicidade de Amidas Análogas à Piperina a Larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 32(2), p. 343-346, 2003.

14. FACUNDO V.A., SILVEIRA A.S.P., MORAIS S.M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 33(7), p. 753-756, 2005.
15. FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M; PINTO A. C. Essential oil of *Piper carniconectivum* C.CD. Leaves and Stems **J. Essent. Oil Res**, 18, p. 296-297, 2006.
16. GOAD, L.J. 1991. Phytosterols. In: Charlwood, B.V and Bathorpe, D.V. (Eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. **Academic Press**, London, p.399-434.
17. HOSTETTMANN, K; HAMBURGER, M. Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine **Phytochemistry**, 30 (12), p. 3864-3874, 1991.
18. JARAMILLO M. A; Manos P. S. Phylogeny and Patterns of Floral diversity in the Genus Piper (Piperaceae) **American Journal of Botany** 88(4), p. 706–716, 2001.
19. KAPLAN, M.A.C; et al. Estudo da Atividade Analgésica em Extratos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1996, resumo F-061.
20. KAPLAN, M.A.C; et al. Fitoquímica e Atividade Leishmanicida de Espécies de Piperaceae. **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1996a, resumo F-165.
21. KINGHORN, A.D. Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties **J. Nat. Prod**, 50 (6), p. 1009-1024, 1987.
22. MARRIOTT, J. P; SHELLIE, R; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography**, 936, p. 1–22, 2001.
23. MCFERREN, M. A; CORDOVA, D; RODRIGUEZ E; RAUH, J. J. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 83, p. 201-207, 2002.
24. MCFERREN, M. A., RODRIGUEZ E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology** 60, p. 183–187, 1998.
25. MESQUITA J. M. O; CAVALEIRO C; CUNHA A. P; LOMBARDI J. A; OLIVEIRA A.B; Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(1), p. 6-12, 2005.
26. MIYAKADO, M; NAKAYAMA I; OHNO N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads, p. 183-187. In J.T. Amason, B.J.R. Philogène & P. Morand (eds.). *Insecticides of plant origin*. ACS Symposium Series 387, **Am. Chem. Soc.**, New York, p. 320 1989.
27. MUJUNDAR, A.M.; DHULEY, J.N.; DESHMUKH, V.K.; RAMAN, P.H. e NAIK, S.R. Anti-Inflammatory Activity of Piperine **Jpn. J. Med. Sci. Biol**, 43, p. 95-100, 1990.

28. NEUSS, M.; et al. The Structure of the Oncolytic Alkaloids Vinblastine (VLB) and Vincristine (VCR). **J. Am. Chem Soc**, 86, p. 1440-1442, 1964.
29. ORJALA, J.; et al. O. Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from *Piper aduncum* **J. Nat. Prod**, 57 (1), p. 18-26, 1994.
30. PARMAR, V.S. et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, 46(4), p. 591, 1997.
31. PATRA, A; et al. Carbon-13 NMR Spectra of Tembamide, Aegeline and Amides. **Orgânico Magnetic Resonance**. 16(1), p. 65-67, 1981.
32. PERRIN, D.D; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. Pergamon Press. New York, 1998.
33. PINTO, A. C; et al. Extração dos Constituintes Químicos Voláteis por "Headspace" e Coobação de Três. Espécies do Gênero Piper **19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 1996a, resumo PN-058.
34. PRASAD, B. A.S; KANLH, B.J.V; PERIASAMY, M. **Convenient Methods for Reduction of amides, nitriles, carboxylic, esters, acid and hidroboration of alkenes using NaBH₄/I₂ system**. University of Hyderad, India. 1992.
35. RAMALINGAM S., Fernandes R. A., Kumar P. An asymmetric dihidroxylation route to (R)-(-) octopamine, (R)-(-) tembamide and (R)-(-) aegeline. **Divisão of Organic Chemistry: Tecnology, National, Chemical Laboratory**, Pune 411008. India. ARQUIVOC (iii) 36-43, 2005.
36. RAMINELLI, C; et al. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Cândida antártica* lipase (Novozyme) **Tetrahedron Asymmetry** 15, p. 3117-3122, 2004.
37. Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Evolução Metabólica em Espécies de Piperaceae Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 1 a 3 de dezembro de 2004. XXVI RESEM p. 27.
38. RUKACHAISIRIKUL.T, et al. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum* **Journal of Ethnopharmacology**, 93, p. 173-176, 2004.
39. SANTOS, B.V.O; CUNHA, E.L.V; CHAVES, M.C.O. Estudo Químico de *Piper marginatum* JACQ. var. Marginatum **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1996, resumo Q-045,.
40. SATCH, T; SUZUK, S. Reduction of Organic Compounds with Sodium Boro Hydride: Transition Metal Salt Systems. **Tetrahedron Lett**, 52, p. 4555-4558, 1969.
41. SHARMA, B. R; RATTAN, R. K; SHARMA, P. Marmeline, an alkaloid, and other components of unripe fruits of *Aegle marmelos*. **Phytochemistry**, 20, p. 2606-2671, 1981.

42. SILVERSTEIN R.M., WEBSTER F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. State University of New York, 6^a. edição, ed. LTC
43. SINGH S. K; et al. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum* **Phytochemistry**, 43(6), p. 1355-1360, 1996.
44. VALENTE, M. C; MAUTONE L; COSTA, M. L. N. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Periódicos brasileiro**. Vol XXXII, p. 103, 1994.
45. VAN DEN DOOL & KRATZ, P.D.J., 1964. A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. of Chromatography**, 11, p. 463-471, 1964.
46. VASQUES R. da S; et al. Antifungal amide from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* **Phytochemistry**, 59, p. 521-527, 2002.
47. WILLIAMS, C. et al. Hydrosoluble Formazan XTT: Its application to natural products drug discovery for *leishmania*. **J. Microbiological Methods**, 55, p. 813-816, 2003.
48. WU, Y.C; DUH, C.Y. Cytotoxic Pyridone Alkaloids from the Leaves of *Piper arborescens*. **J. Nat. Prod**, 53 (6), p. 1575-1577, 1990.

7. ANEXOS

ANEXO ITabela 10. Tabela referente aos óleos essenciais de *Sarcorhachis obtusa*

Nome do composto	IR(Literatura)	IR _C Folhas	Teor(%) Folhas	IR _C Caules	Teor(%) Caules
Monoterpenos hidrocarbonetos					
α-Pineno	939	939	15,1	939	9,7
α-Felandreno	1003	1009	3,5	1009	1,1
Limoneno	1029	1032	3,2	1032	2,2
β-Felandreno	1030	1034	17,4	1034	17,2
(Z) β-Ocimeno	1037	1047	2,8	-	-
Monoterpeno Oxigenado					
Linalool	1097	-	-	1101	1,3
Sesquiterpenos Oxigenados					
(E) Cariofileno	1419	1426	9,4	1426	15,6
α-Humeleno	1455	1462	5,6	1463	8,7
D-Germacreno	1485	1488	1,9	1487	0,7
Biciclogermacreno	1500	1502	7,9	1503	7,7
γ-Candineno	1514	-	-	1523	0,7
Não Identificados			33,2	35,1	

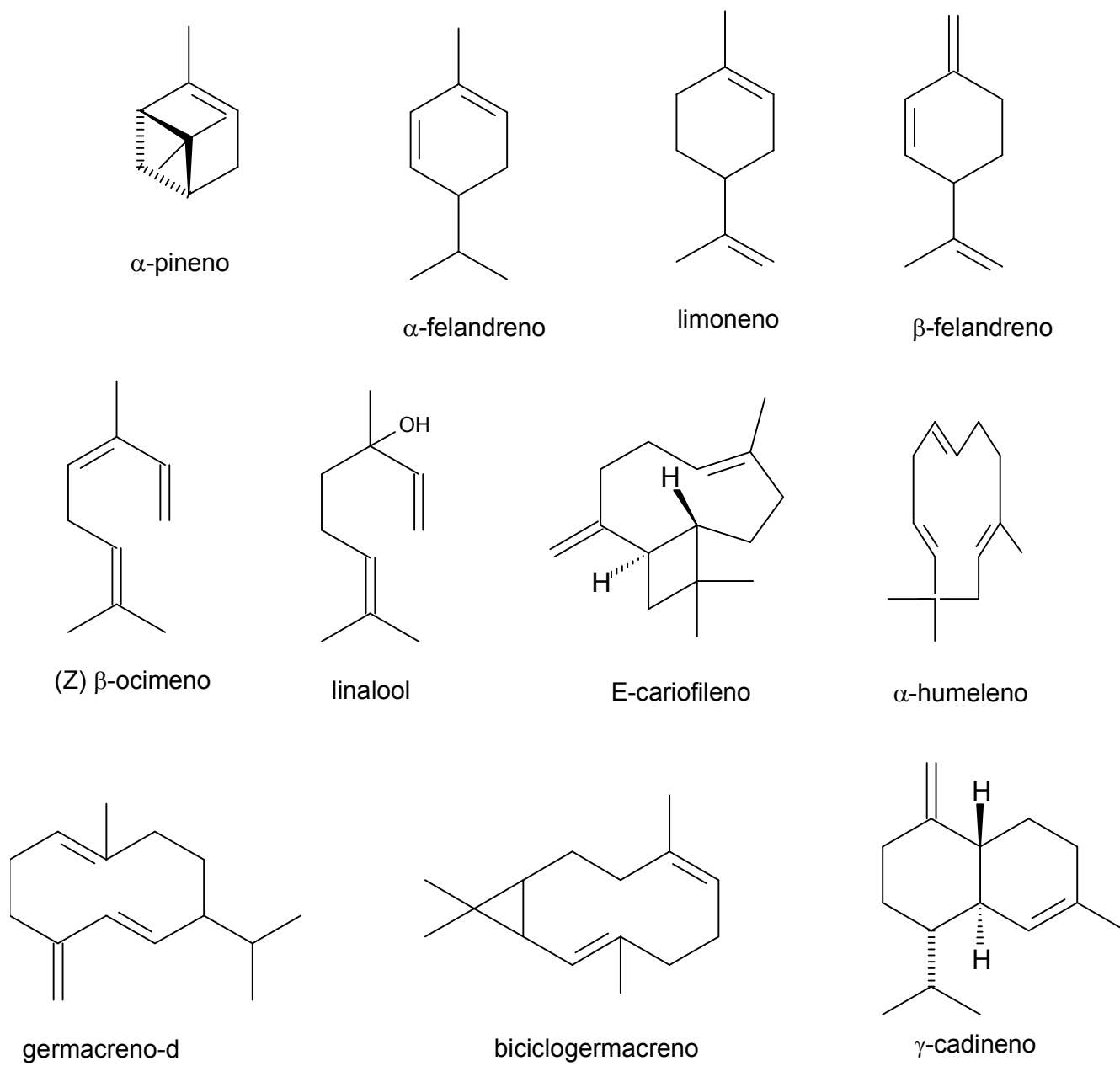


Figura 24. Estruturas dos compostos extraídos dos óleos essenciais das folhas e caules de *S. obtusa*.

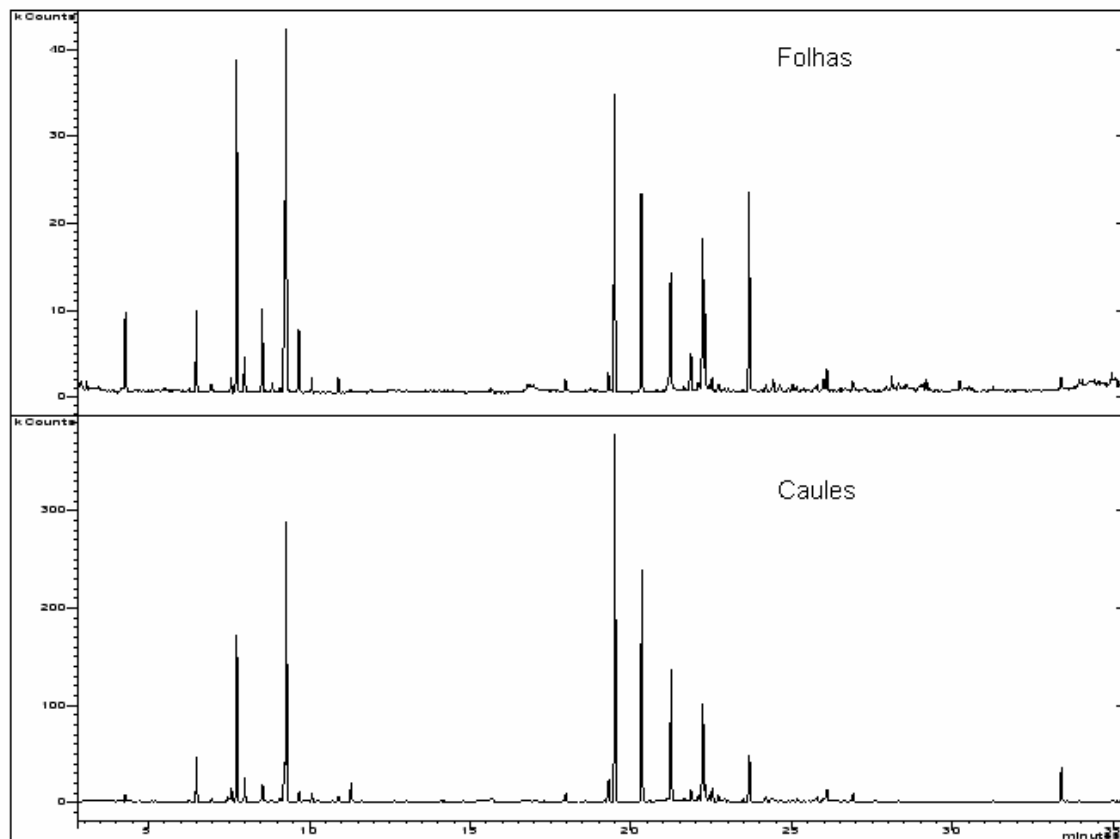


Figura 25. CG/EM dos óleos essenciais das folhas e caules de *Sarcorrhachis obtusa*.

ANEXO II

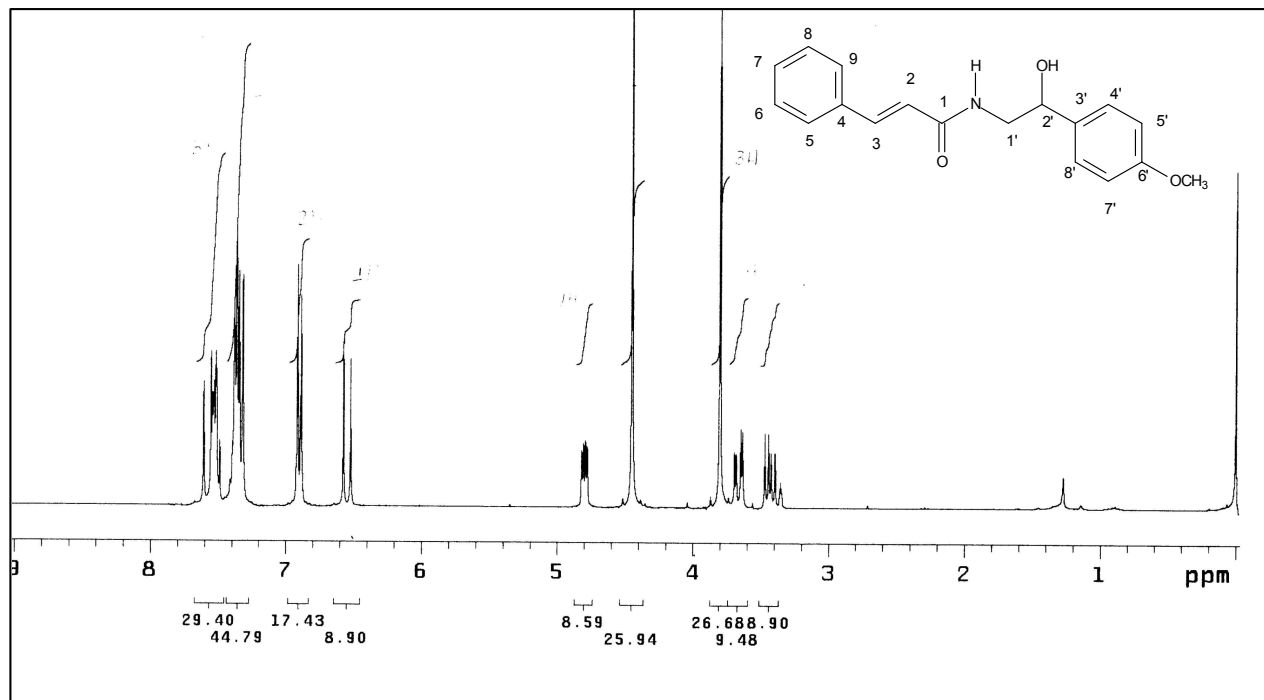


Figura 26. Espectro de RMN^1H (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%), substância **A-II**.

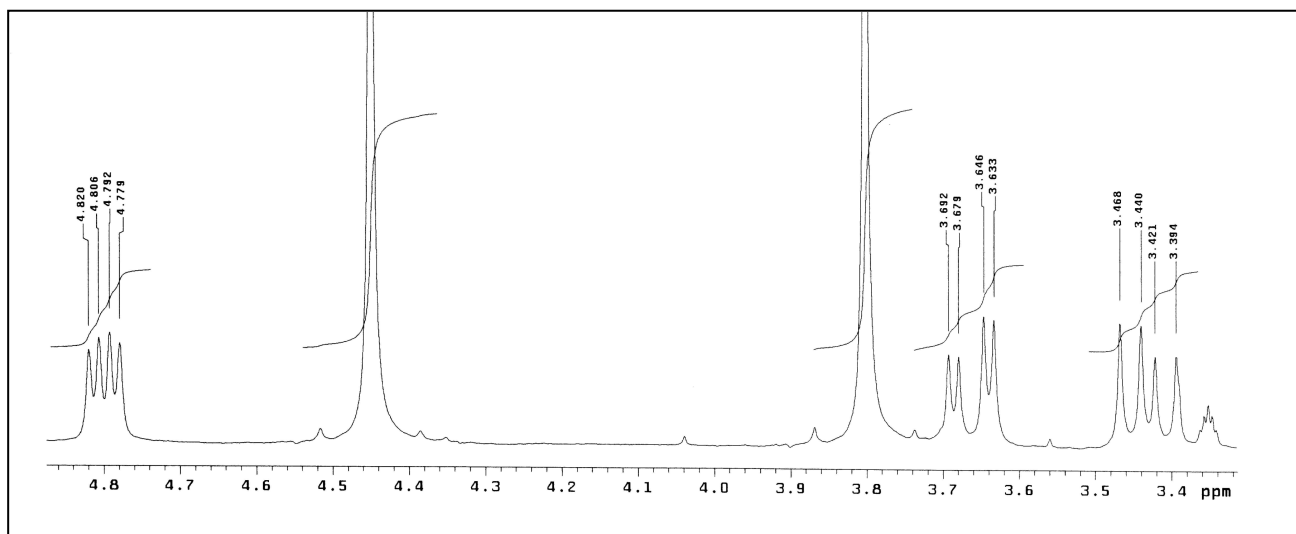


Figura 27. Espectro parcial ampliado RMN^1H (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) de **A-II**.

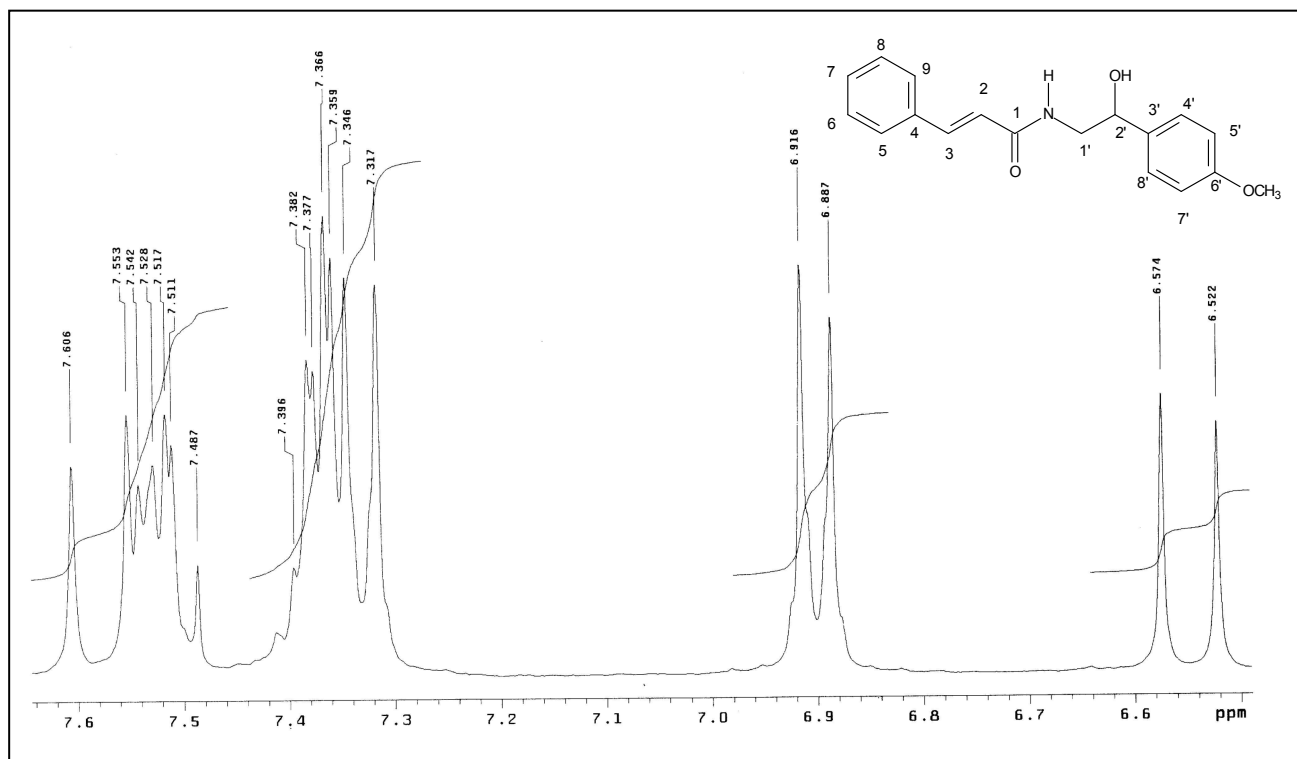


Figura 28. Espectro parcial ampliado de RMN ^1H (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) de **A-II**.

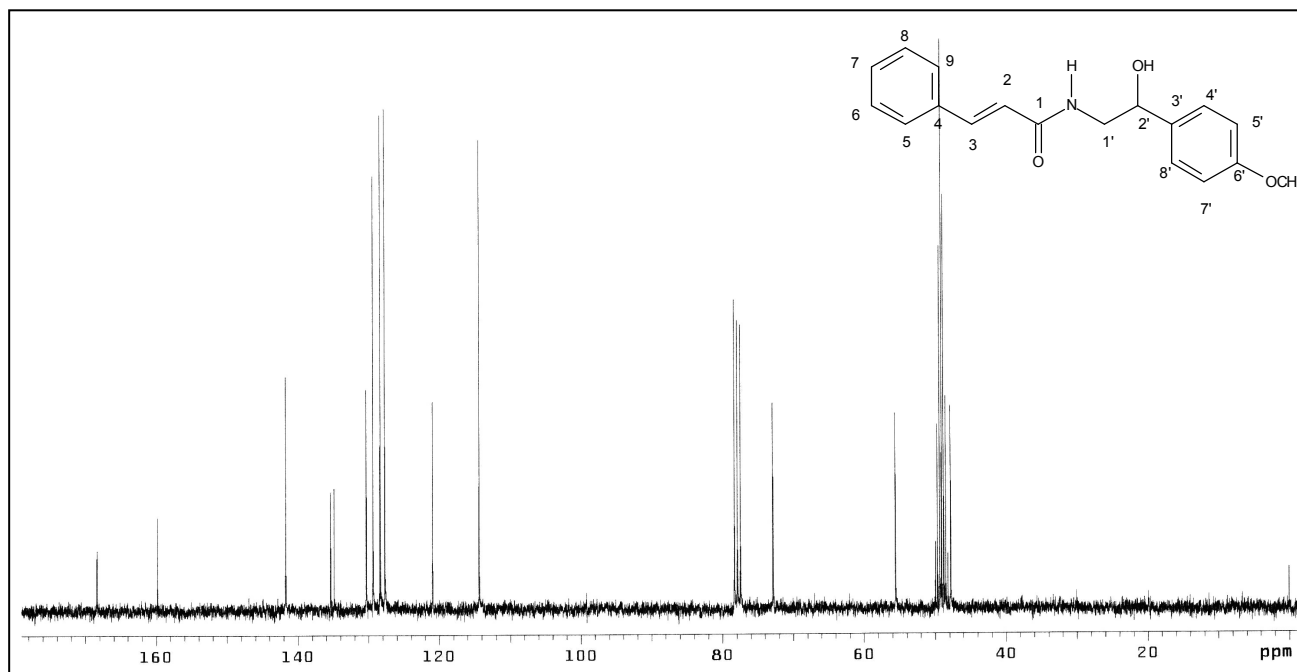


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância **A-II**.

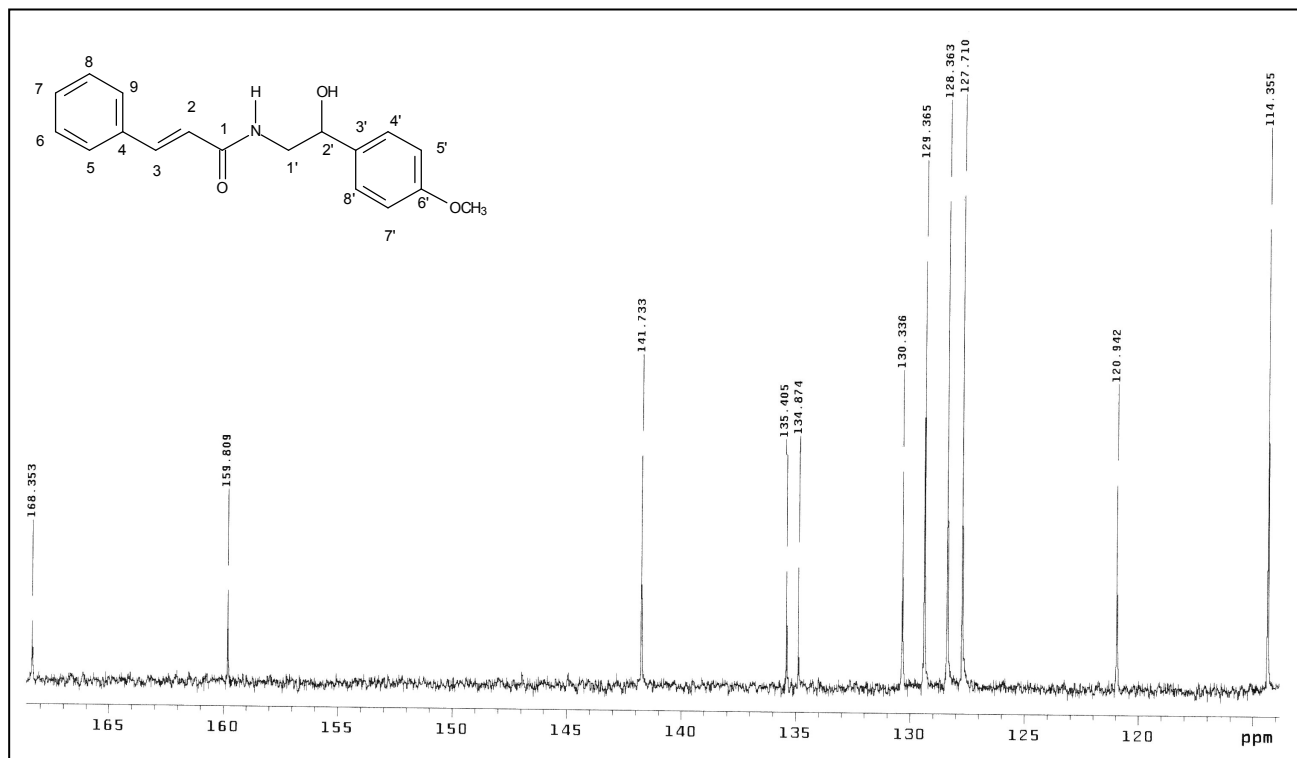


Figura 30. Espectro parcial ampliado de RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) de **A-II**.

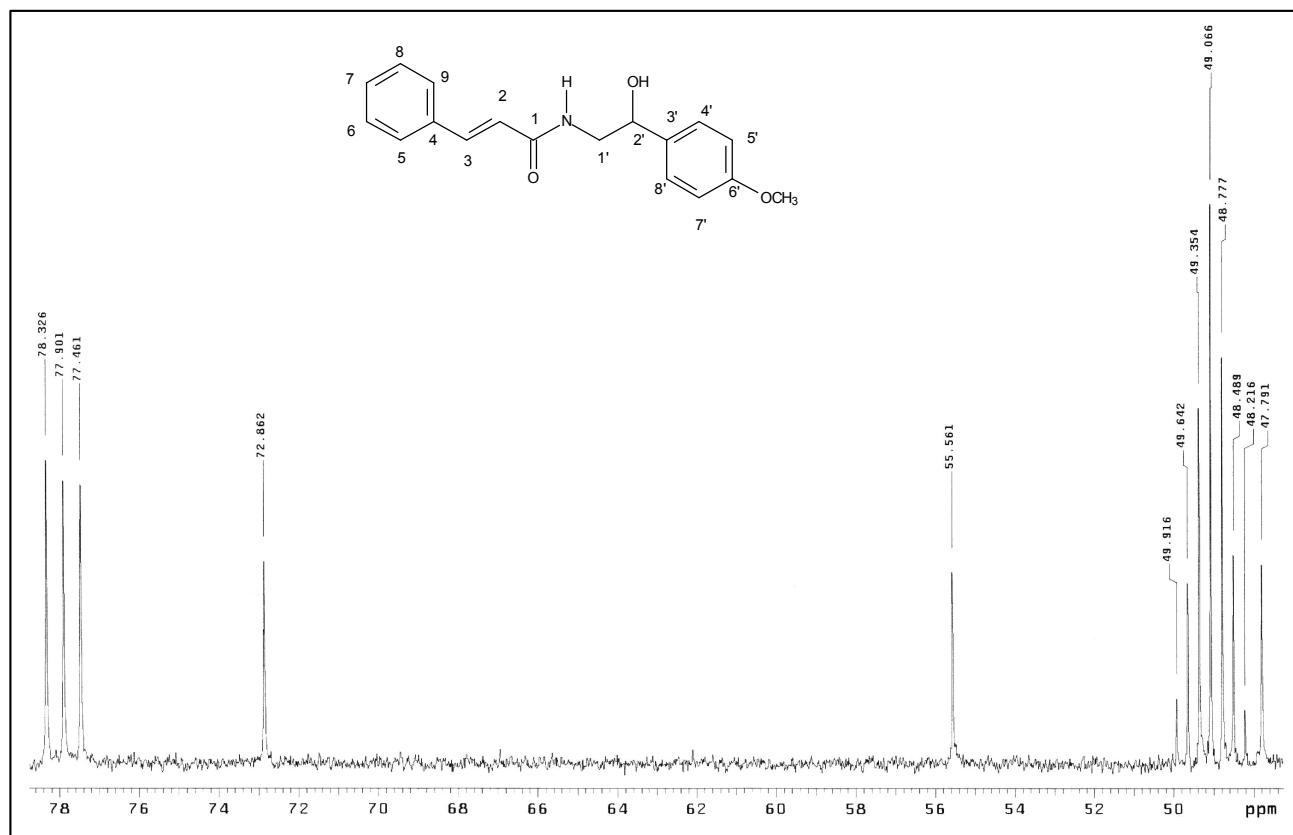


Figura 31. Espectro parcial ampliado de RMN ^{13}C (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) de **A-II**.

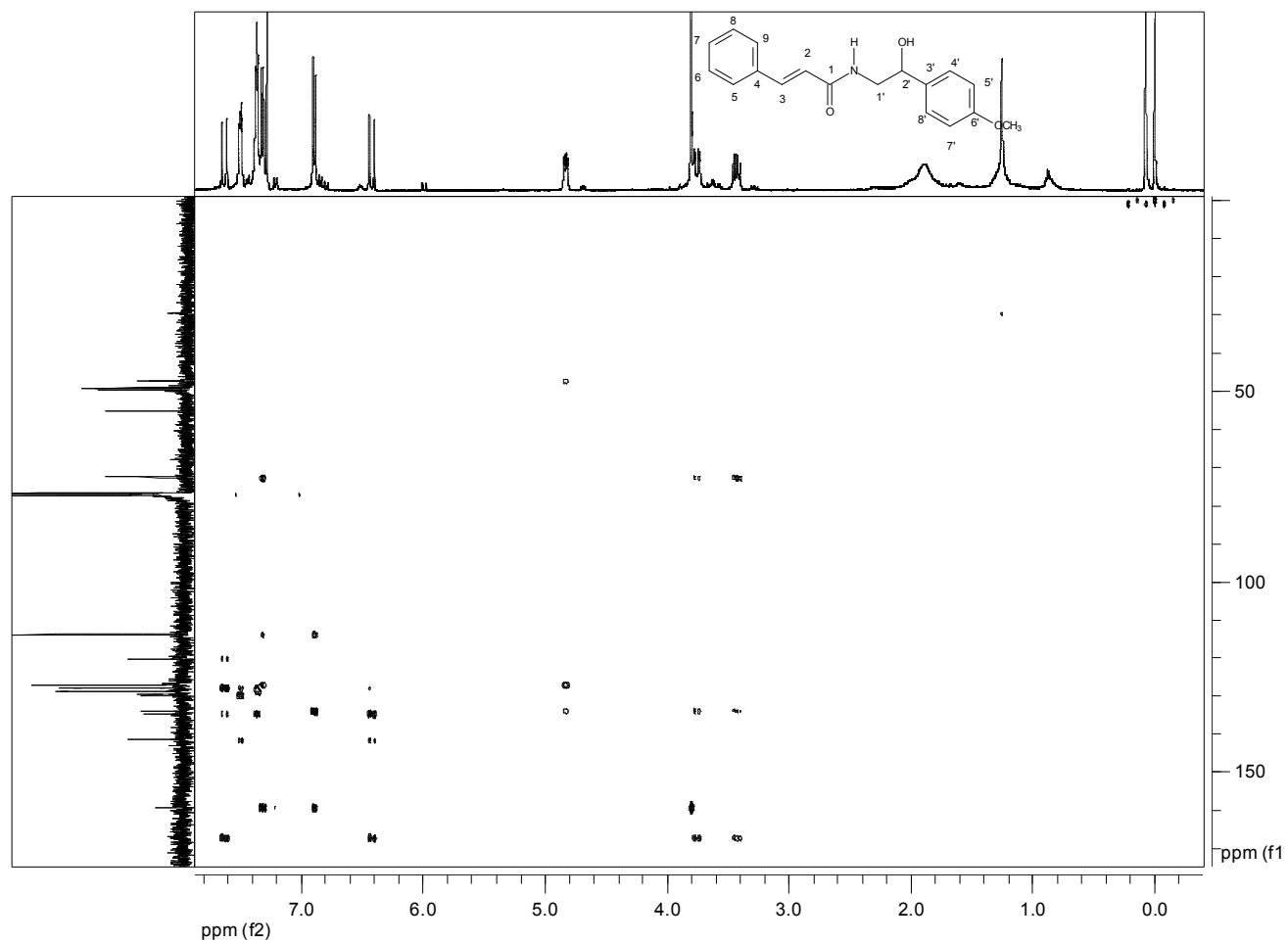


Figura 32. Espectro de HMBC (Correlação Heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de Longa Distância com Detecção de Hidrogênio) (9,4 tesla, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 10%) da substância **A-II**.

ANEXO III

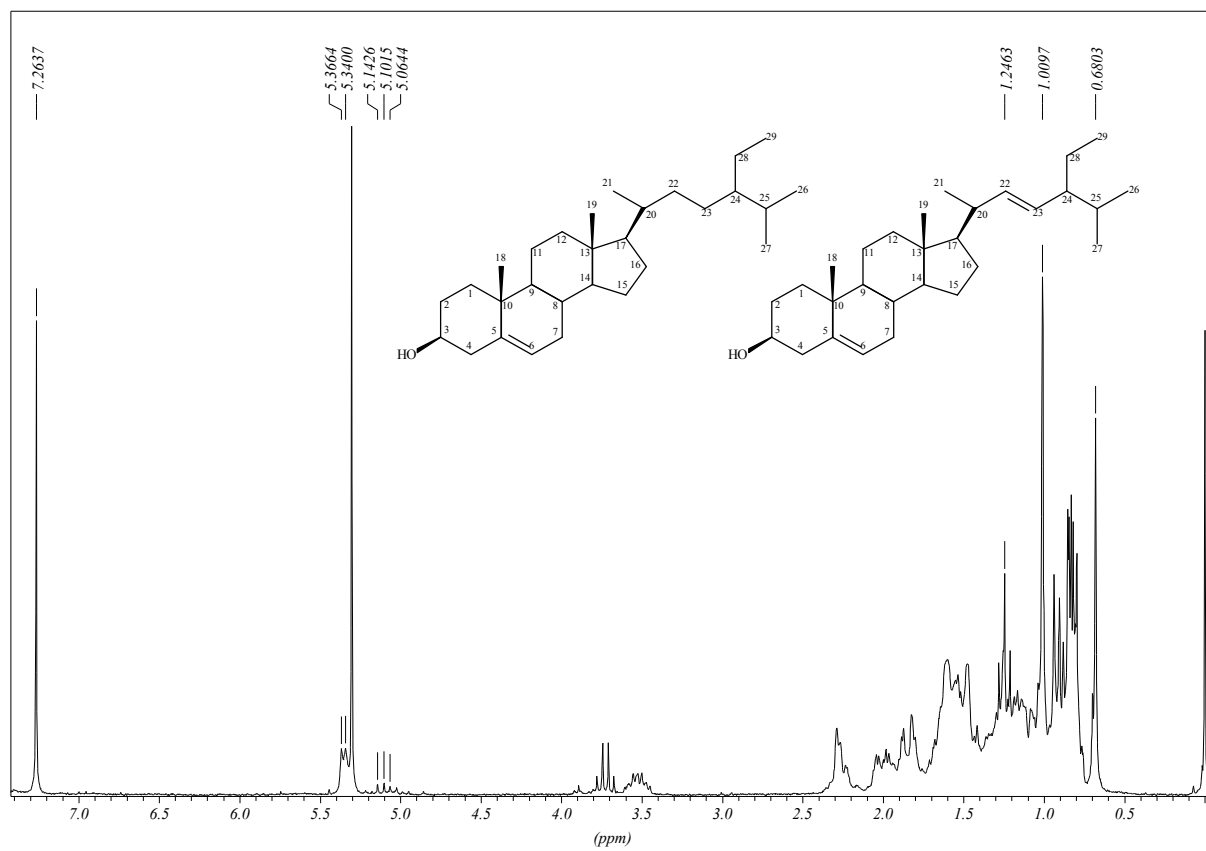


Figura 33. Espectro de RMN^1H (400MHz tesla, CDCl_3) das substâncias **B1** e **B2**.

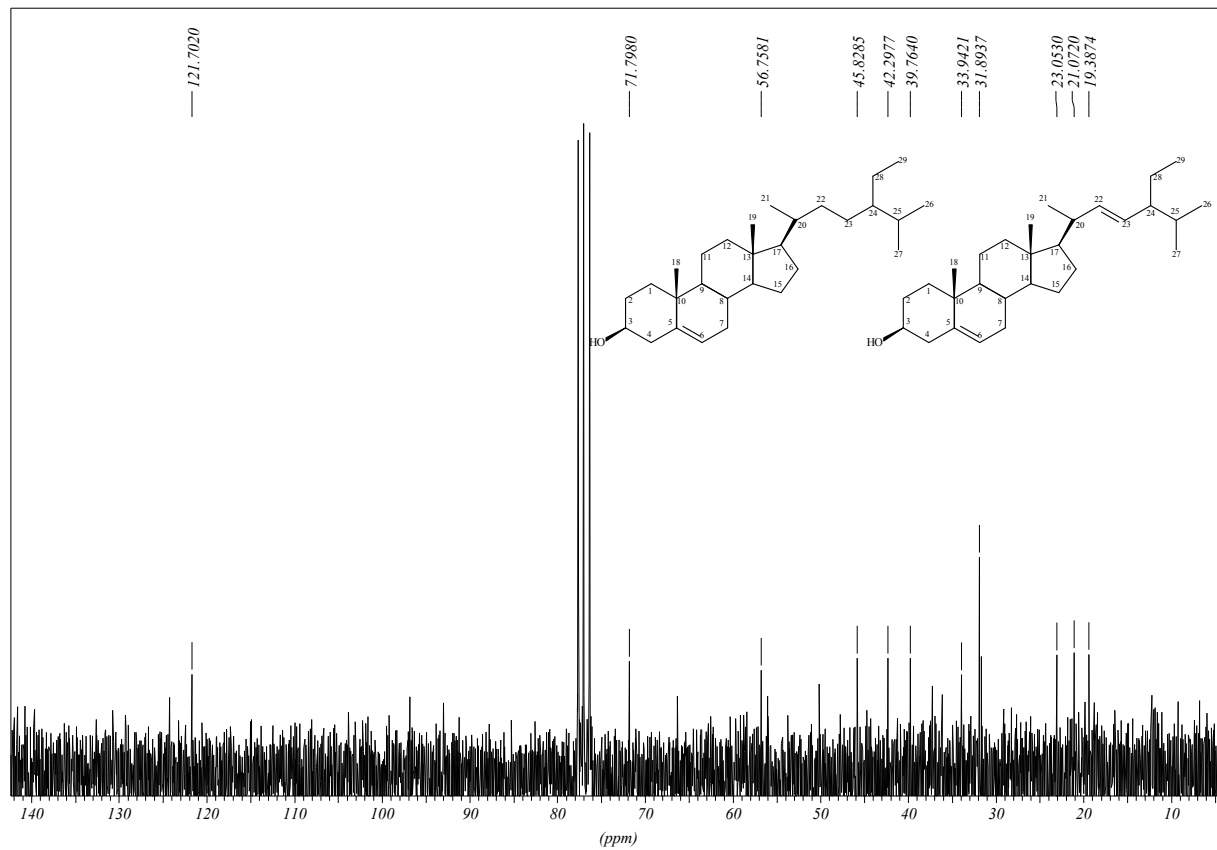
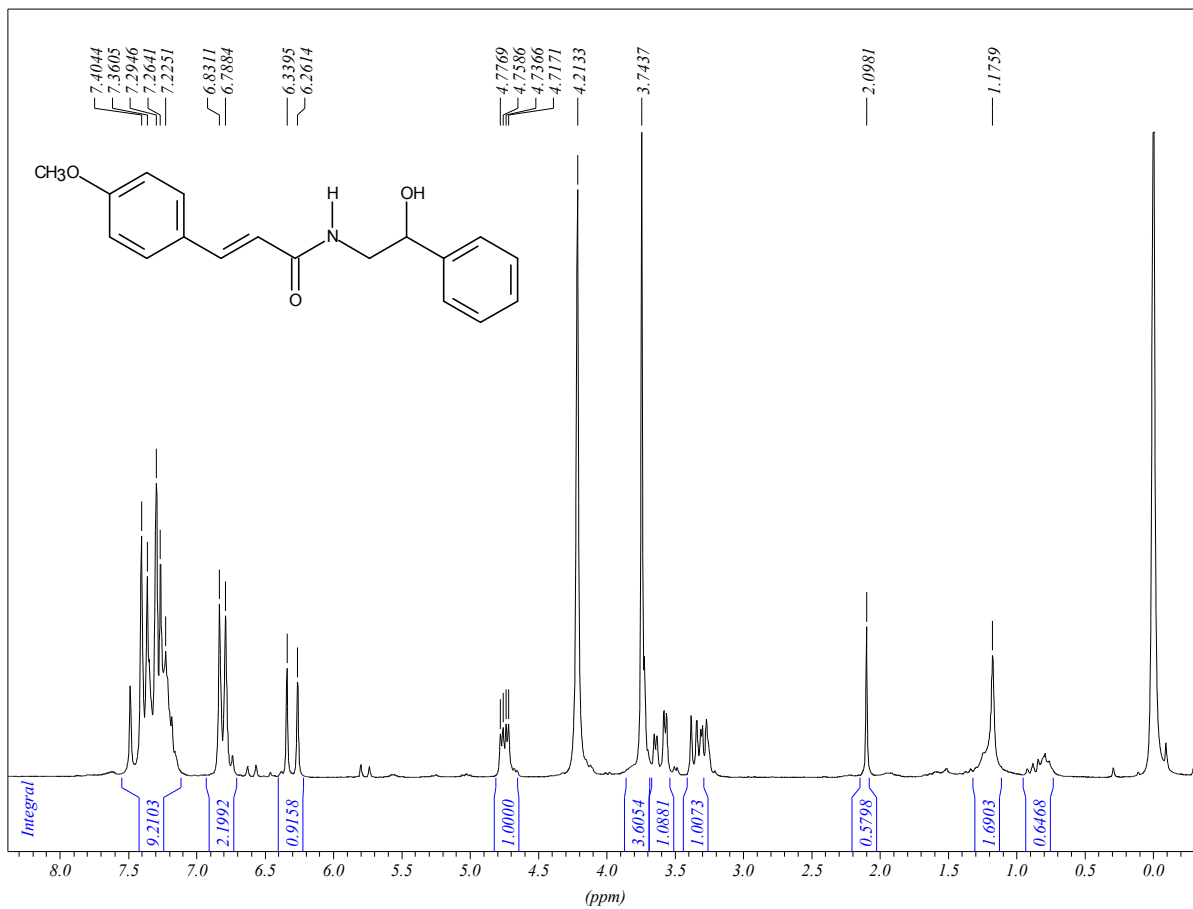


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) expandido das substâncias **B1** e **B2**.

ANEXO IV

Figura 35. Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , MeOD) da substância **A - I**.

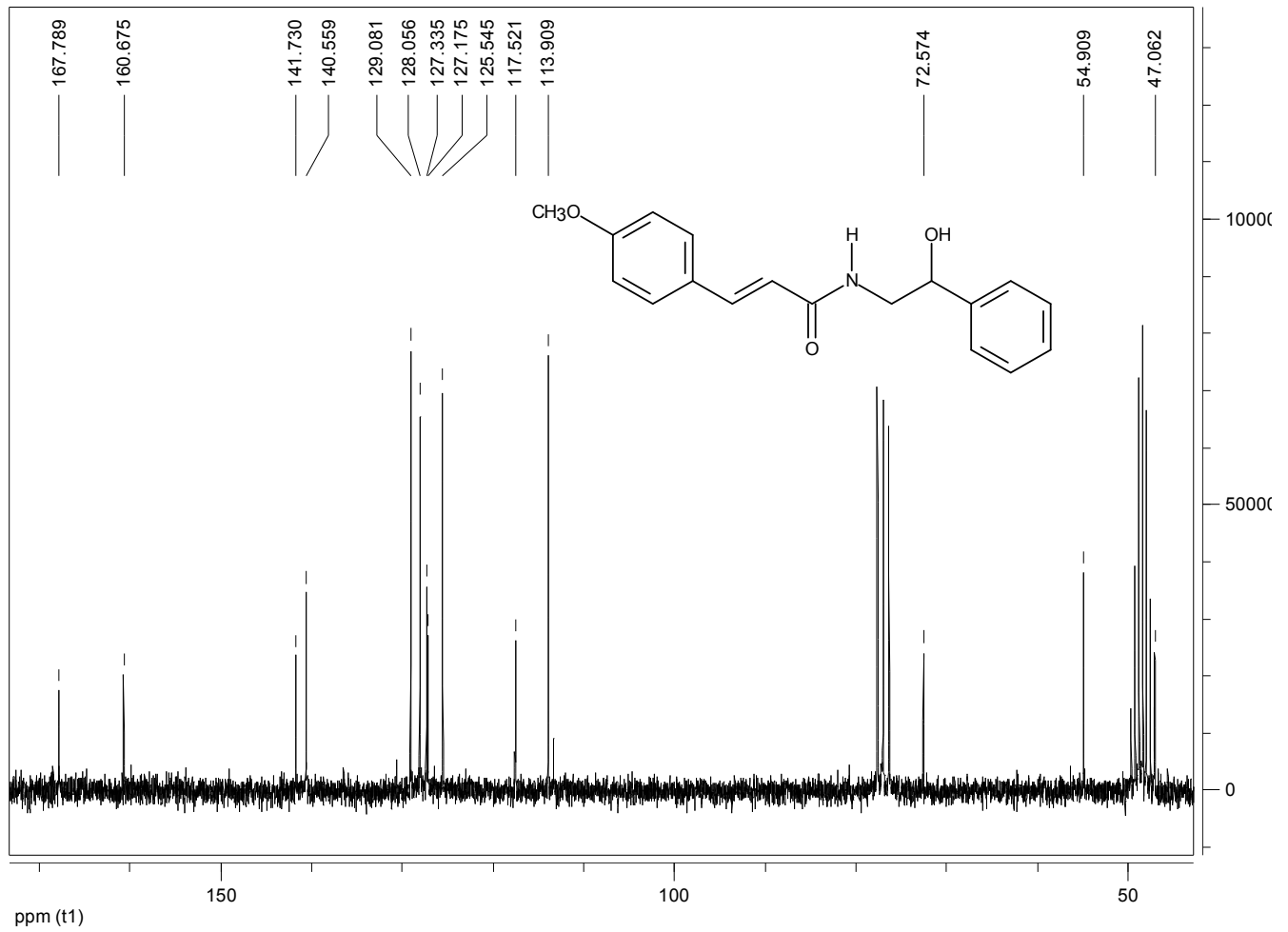


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3 , MeOD) da substância **A - I**.

ANEXO V

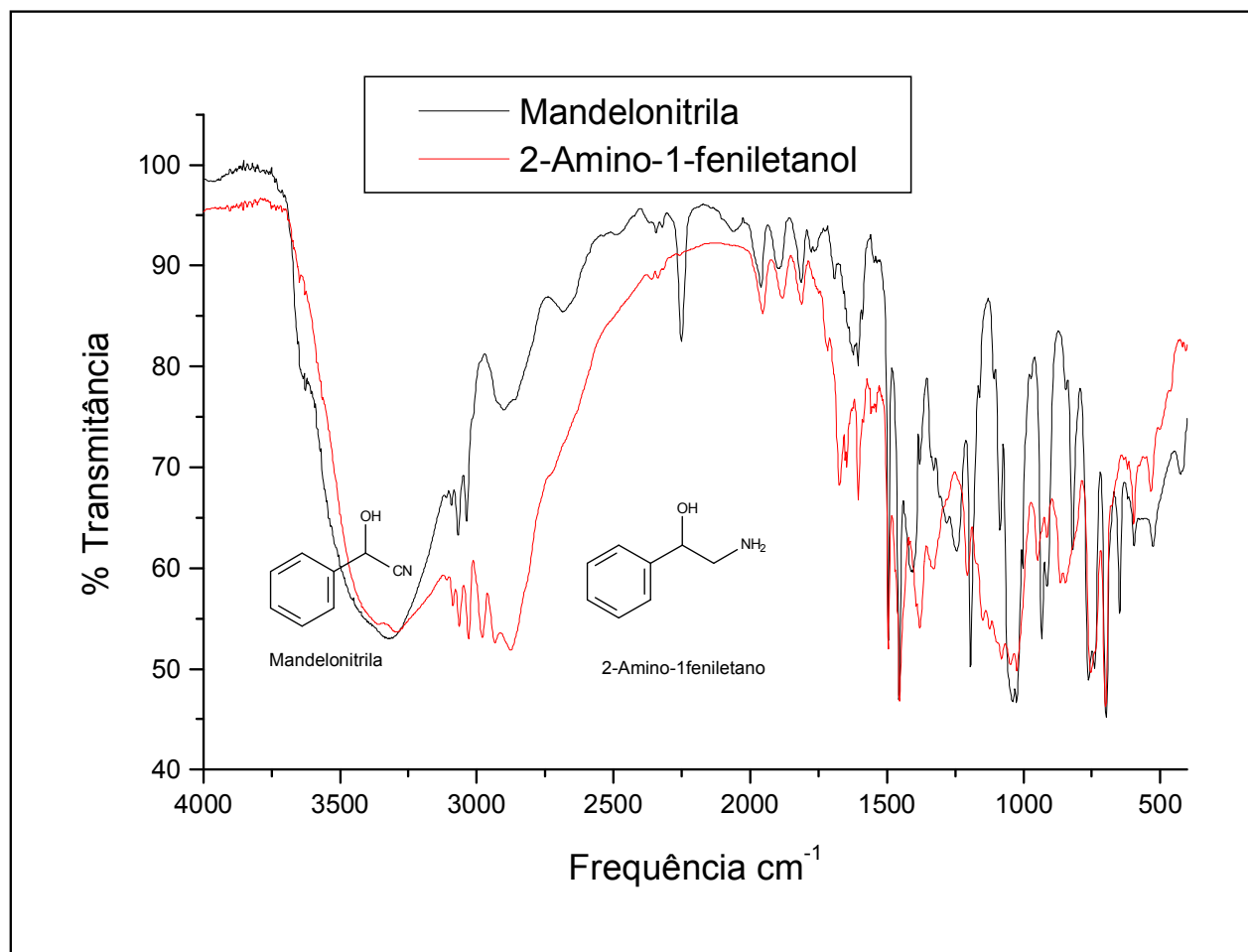


Figura 37 Espectro no Infravermelho dos compostos **25** e **26**, indicados no esquema 3.

ANEXO VI

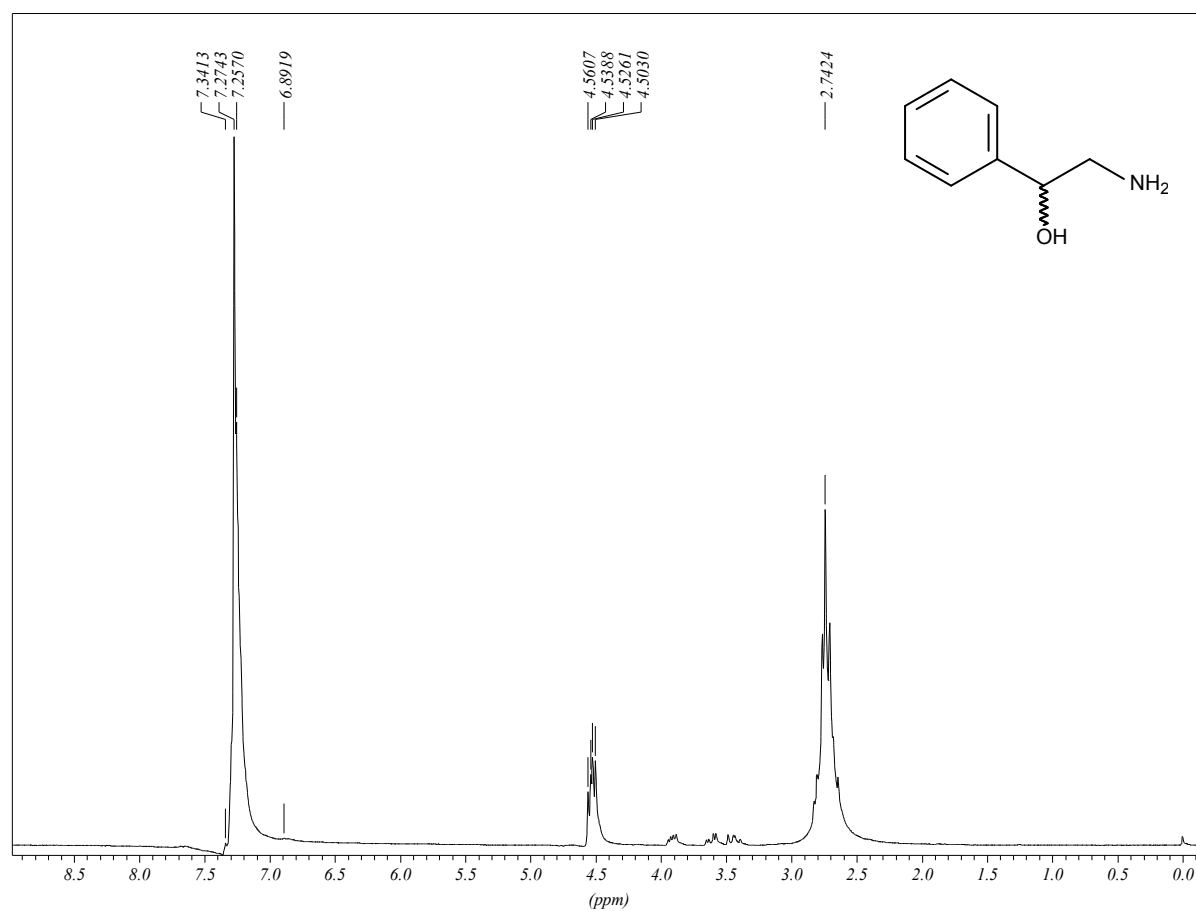


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) do composto (26).



Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) do composto (26).