

RUTE ALVES PINTO

**Estudo biológico e biossintético com alvo nas
amidas pirrolidínicas de *Piper arboreum* Aublet
(Piperaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção de título
de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

P659e Pinto, Rute Alves
Estudo biológico e biossintético com alvo nas amidas
pirrolidínicas de *Piper arboreum* Aublet (Piperaceae) / Rute
Alves Pinto – Araraquara - SP : [s.n], 2015
151 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan

1. Biossíntese. 2. Enzimas. 3. Fenilalanina.
4. Oxidorredutases. 5. Agente anti-inflamatórios. I. Título.

RUTE ALVES PINTO

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

Araraquara, 02 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. MAYSA FURLAN (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Dr. NIVALDO BORALLE
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. HOSANA MARIA DEBONSI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto - SP



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



Drª. ALAIDE DE SÁ BARRETO
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste / UEZO / Rio de Janeiro - RJ

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Rute Alves Pinto. **Filiação:** José Dutra Caldeira e Delarcy Alves Caldeira. **Nascimento:** 13/12/1968 – Rio de Janeiro – RJ, Brasil. **Estado Civil:** Casada. **Endereço residencial:** Rua Dinamarca, quadra 01, casa 02, Vila Real, Cáceres – Mato Grosso, 78200-000, SP – Brasil. **Telefone:** (65) 3223-2256. **E-mail:** rutquimica@gmail.com. **Endereço profissional:** Instituto de Química de Araraquara – UNESP, Departamento de Química Orgânica, rua Prof. Francisco Degni, S/N Quitandinha – Araraquara, 14800-970, SP – Brasil. **Telefone:** (16) 3301-6600 – ramal 6788

FORMAÇÃO PROFISSIONAL

Pós-Graduação

Curso: Doutorado em Química. **Área de Concentração:** Química Orgânica. **Área de concentração:** Química dos Produtos Naturais. **Instituição:** Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho – UNESP. **Orientadora:** Profa. Dra. Maysa Furlan. **Período:** março de 2011 a setembro de 2015. **Bolsista:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Curso: Mestrado em Química. **Área de Concentração:** Química Orgânica. **Modalidade:** Química dos Produtos Naturais. **Instituição:** Instituto de Química – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. **Título do projeto:** “Estudo fitoquímico e biológico em *Tabebuia insignis* (Bignoniaceae)”. **Orientador:** Joaquim Corsino. **Período:** agosto de 2006 a julho de 2008. **Bolsista:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Curso: Especialização em Análise Ambiental e Planejamento Urbano. **Orientadora:** Profa. Dra. Solange Kymie Ikeda Castrillon. **Instituição:** UNEMAT. **Período:** 2003-2005

Graduação

Curso: Licenciatura em ciência e complementação em matemática. **Instituição:** Universidade Estadual de Mato Grosso. **Período:** agosto de 1989 a de maio 1994.

Curso: Bacharelado e Licenciatura em Química. **Instituição:** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. **Período:** agosto de 1997 a julho de 2001. **Projeto:** Análise de Açúcares Solúveis e Aminoácidos Livres em Folhas de Sombreiro (*Cliforia fauchildiana*); feijão (*Phaseolus vulgaris*) carioquinha e milionário e soja (*Glycine max*) celeste. 2001. **Orientador:** Laerte da Cunha Azeredo.

Monitoria

Laboratório de Ciência Biológicas. **Instituição:** Universidade Estadual de Mato Grosso, UNEMAT. **Período:** agosto de 1990 a Junho de 1991. **Bolsista** Institucional

Estágio

Área de Concentração: Química de produtos naturais. **Projeto:** “Estudo fitoquímico em espécies de *Solanum* (Solanaceae). **Instituição:** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Orientadora:** Tânia Maria Sarmento da Silva. **Período:** Janeiro de 1997 a fevereiro de 1998.

Projetos

Título: Avaliação da ação microbiana da própolis de *Apis mellifera* de Cáceres sobre doenças que afetam crianças e idosos. **Instituição:** UNEMAT (Cáceres, MT). 2010. **Orientadora:** Profa. Dra. Carla Galbiati. **Período:** 2010 a 2011. **Bolsista:** FAPEMAT.

Trabalhos apresentados em congressos

PINTO, R. A.; FELIPPE, L. G.; BOLZANI, V. S.; ARRUDA, M. S. P.; A. FUSCO-ALMEIDA, A. M.; FURLAN, M. Biological activity of *Piper arboreum*, ESPCA, Araraquara-SP, 2013.

MARCHETTI, C. M.; FRAGA-SILVA, T. F. C.; **PINTO, R. A.**; VENTURINI, J.; FURLAN, M.; ARRUDA, M. S. P. Crude ethanolic extract of *Piper arboreum* Aub. (Piperaceae) decreases the nitric oxide production by peritoneal phagocytes. XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. Campos do Jordão-SP, 2012.

PINTO R. A.; LEITE, F. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. FURLAN, M. Antifungal activity of *Piper arboreum* extracts. XXII SPMB, Bento Gonsalves, RS, 2012.

MIMURA, L. A. N.; MARCHETTI, C. M.; **PINTO, R. A.**; FELIPPE, L. G.; FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F. C.; MAZZEU, B. F.; BALDOQUI, D. C.; VENTURINI, J.; FURLAN, M.; ARRUDA, M. S. P. Extrato etanólico bruto de espécies da família piperaceae reduz a produção de óxido nítrico pelos por macrófagos peritoneais e exibem atividade linfoproliferativa. In. 15º Encontro Nacional de Biomedicina, Botucatu-SP, 2012.

FERREIRA, A.B.; **PINTO, R. A.**; MING, L. C. Medicinal plants used by traditional community in Mato Grosso state – BRAZIL. PF93, 8th Joint Meeting of AFERP. New York City, 2012.

FERREIRA, A. B.; FERREIRA, M. I.; **PINTO, R. A.**; MING, L. C. Medicinal Plants Used by Traditional Community in Mato Grosso State Brazil. In: International Congress for Natural Products Research. Nova Iorque. PLANTA MEDICA: Journal of medicinal plant and natural products research. v. 78, 2012.

PINTO, R. A.; VENDRUSCULO, T. P. S.; SANTOS, M. C.; MIRANDA, A. A; PINTO, J. M. Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Byrsonima crassifolia*. 3rd Brazilian Conference on Natural Products, Ouro Preto-MG, 2011.

FERREIRA, A. B.; MING, L. C.; CHECHETO, F.; **PINTO, R. A.** Dioscoreáceas cultivadas por agricultores da baixada cuiabana em Mato Grosso- Brasil. Raízes e amidos tropicais, v. 6, p. 201-208, 2010.

PINTO, R. A.; PINTO, J.; CARVALHO, A. G.; LUCAS, P. R. S.; ARRUDA, P. P. Freqüência de insetos xilófagos em plantio de teca (*Tectona grandis*). In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, Gramado, RS. Programa e Livro de Resumos, v. 1. p. 455. 2004

PINTO, R. A.; PINTO, J. M.; CARVALHO, A. G. *Aguna megacles megacles* (LEP. HESPERIIDAE): Desfolhador de pata-de-vaca (*Bauhinia sp.*) (LEGUMINOSAE). In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, Gramado-RS Programa e Livro de Resumos, v. 1, p. 245, 2004.

PINTO, R. A.; PINTO, J. M.; TEIXEIRA, V. A. Comportamento da beterraba (*Beta vulgaris*) cultivada em diferentes regimes de adubação. In: 44 Congresso Brasileiro de Olericultura, Campo Grande, MS. Horticultura Brasileira, v. 22. p. 410. 2004.

PINTO, R. A.; PINTO, J. M.; TEIXEIRA, V. A. Adubação orgânica e mineral para coentro (*Coriandrum sativum*). In: 44 Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004, Campo Grande, MS. Horticultura Brasileira (Impresso), 2004. v. 22. p. 370-371.

PINTO, R. A.; PINTO, J. M. Cochonilhas associadas às plantas cítricas em Cáceres, MT. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004, Florianópolis, SC. Resumos do 18 CBF, CD-ROM, 2004.

Cursos

- Introdução à análise proteômica. Departamento de Farmácia, Laboratório de Micologia. UNESP, 2011.
- Informação Tecnológica e formação de patentes. UFMT, 2010.
- Seminário de Agroecologia: Manejo produtivo de agroecossistemas. UNEMAT, 2009.
- Tópicos Especiais em Domesticação de Plantas. Departamento de agronomia. UFMT, 2009.
- Domesticação de plantas. Departamento de agronomia. UFMT, 2009.
- Nomes populares e científicos de plantas medicinais aromáticas: Mitos e conexões históricas. UFMT, 2008.
- Encontro de divulgação de pesquisas da química. Tema: Estudo fitoquímico da casca do caule de *Tabebuia insignis*. UFMS, 2006.

- II Mostra do despertar para ciência. Tema: destilação seca da madeira. Escola Agrotécnica Federal de Cáceres-MT, 2005.

Experiência profissional

-Professora de química geral ministrada ao ensino médio, nas redes Estadual e Federal em Cáceres-MT, de 2002 a 2005.

-Professora de química geral ministrada ao ensino superior nas universidades: UFGD-MS em 2006 e UNEMAT-Cáceres em 2009.

A Deus

Aos meus pais José e Delarcy

Aos meus irmãos e irmãs

Ao meu esposo Jonas

Aos meus filhos Abner e Calebe

Dedico

“(...) dando seu fruto de mês em mês, e as folhas da árvore são para a cura das nações”.

(Apocalipse 22: 2)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e perseverança.

À UNESP e ao Instituto de Química em Araraquara pela oportunidade de aprender um pouco mais.

À professora Maysa Furlan, por me aceitar no seu grupo de pesquisa, pela orientação, pelos ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, José e Delarcy por estarem ao meu lado mesmo que em dias tão difíceis.

A todas as minha irmãs e irmãos pelo incentivo.

À minha querida sogra Emília e familiares que me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu esposo Jonas e meus queridos filhos Abner e Calebe, pelo carinho, compreensão e por estarem tão perto de mim, mesmo que tão distantes.

Aos meus queridos amigos Isabel, Luiz e filhas Clarice e Carina, pela acolhida nesta cidade e por fazer parte da família de vocês.

A todos os professores e colegas do NUBBE, pelo incentivo, apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa: Vânia, Andrea, Lidiane, Karina, Bruna, Amanda, Amauri, Renan, Fernando, Flávio, pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos amigos Teresinha, Daniela, Raissa, Alexander, Christiann, Doni, pelo companheirismo, ensinamentos, pelos finais de semana que passamos juntos no laboratório.

Ao Nivaldo Borelle, Lucinéia Vizzoto, Juliana Rodrigues, João Bronzel, Bianca Ferreira pela amizade e pelo auxílio em experimentos.

Aos funcionários da biblioteca pela gentileza e por estarem sempre dispostos a nos auxiliar.

À coordenação da pós-graduação pela atenção e amizade.

A todos que me auxiliaram, visitaram meus pais e me deram uma palavra de ânimo.

A todos os amigos das repúblicas em que morei.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o execução deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Piper arboreum é conhecida por acumular amidas pirrolidínicas com potente atividade antifúngica, antileishmanicida, inseticida entre outros, sendo, portanto, importantes substâncias alvos para estudos biossintéticos. À partir dos extratos das folhas e frutos desta espécie, foram isoladas três amidas pirrolidínicas e dois precursores fenilpropanoídicos, sendo que piperilina foi utilizada como padrão para os estudos biossintéticos. A proposta biossintética para a formação dessas amidas segue uma biossíntese mista, que deriva da via do chiquimato e via do acetato. Unidades C₆-C₃, condensam-se com malonil-CoA e a ornitina para a produção destes metabólitos. Os estudos biossintéticos foram iniciados com a incorporação de CH₃¹³CO₂Na em folhas de *P. arboreum*. Este experimento teve como objetivo estabelecer a biossíntese da extensão final da cadeia lateral das amidas pirrolidínicas em relação ao derivado fenilpropanoídico. A análise por espectrometria de massas confirmou a incorporação do isótopo ¹³C na piperilina, indicando que a extensão da cadeia ocorre via acetato. Para verificar se a formação do grupo metilenodioxílico ocorre antes ou depois da formação da porção amídica, foram sintetizados os precursores fenilpropanoídicos: o ácido ferúlico e o 3',4'-metilenodioxicinâmico, bem como seus análogos marcados com isótopos estáveis: o ácido[1-OD, 2-D]-ferúlico e o ácido[1-OD, 2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico. Os precursores sintetizados marcados com deutério foram incorporados, separadamente, na fração enzimática solúvel, juntamente com os precursores *L*-ornitina, e ácido malônico. Os produtos formados foram monitorados por CLAE-DAD utilizando-se a piperilina como padrão. A formação do produto foi identificado por CLAE-DAD. A análise do extrato protéico das folhas e frutos em gel poli-acrilamida permitiu atribuir as bandas mais expressivas as enzimas ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo; 55 - 14 kDa), fenilalanina amônia-liase (PAL; 77- 83 kDa) e policetídeo sintase (PKS; 45 - 30 kDa). A piperilina isolada de *P. arboreum* foi submetida à avaliação do potencial de inativação da enzima tirosinase, mostrando potente atividade no ensaio *in vivo*. O extrato etanólico das folhas de *P. arboreum* apresentou importante atividade antifúngica, anti-inflamatória e inseticida.

Palavras-chave: biossíntese, piperilina, reação enzimática, atividade biológica.

ABSTRACT

Piper arboreum is known to accumulate amides with potential antitumoral, antimicrobial, antifungal, antileishmanial and insecticidal activities, being targeted compounds for biosynthetic studies. From leaves and fruits extracts, three pyrrolidinic amides and two phenylpropanoids precursors were isolated and the piperilina amide was used as standard for biosynthetic studies. The biosynthetic proposal for piperiline precursors formation follows a mixed biosynthesis, which is derived from the shikimate and acetate which C₆-C₃ units which condense with malonyl-CoA and ornithine for the production of the amides. The biosynthetic studies were initiated with the incorporation of CH₃¹³CO₂Na in leaves of *P. arboreum*. Analysis by mass spectrometry confirmed incorporation of ¹³C isotope indicating that extension chain of piperilina is product via acetate. To determine formation of the methylenedioxy group occurs before or after the amide portion, were if the synthesized phenylpropanoids precursors ferulic acid and 3',4'-methylenedioxcynamic acid as well the same compounds labeled with stable isotopes: [1-OD, 2-D]-ferulic acid and [1-OD, 2-D]- 3',4'-methylenedioxcynamic acid. The synthesized labeled precursors were incorporated into the soluble fraction of the enzymatic extraction, together with precursors L-ornithine and malonic acid. The products were analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry using piperiline amide as standard. Analysis of the protein extract from de leaves and fruits using 1D polyacrylamide gel allowed to assing the most significant bands: the RuBisCo (55 - 14 kDa), PAL (77- 83 kDa) and PKS (45 - 30 kDa) enzymes. The piperiline amide isolated from *P. arboreum* were submitted to inactivation assay of the enzyme tyrosinase and showed powerful *in vitro* activity. The etanolic extracts from leaves from *P. arboreum* showed important antifungal, anti-inflammatory and inseticidal activities.

Keywords: biosynthesis, piperiline, enzymatic reaction, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias com propriedades farmacológicas isoladas de plantas.	26
Figura 2: Gêneros da família Piperaceae.....	27
Figura 3: Distribuição geográfica da família Piperaceae.	28
Figura 4: Exemplos de espécies do gênero <i>Piper</i> encontradas no Brasil.....	30
Figura 5: Morcego (<i>Carollia perspicillata</i>).....	38
Figura 6: <i>Piper arboreum</i>	39
Figura 7: Etapas fundamentais para análise do proteoma.	42
Figura 8: Biogênese das amidas pirrolidínicas.....	43
Figura 9: Proposta biossintética para os precursores fenilpropanoídico em <i>P. arboreum</i> (Dewick, 2009).....	44
Figura 10: Ativação dos derivados do ácido cinâmico em derivados tioéster (DEWICK, 2009).	45
Figura 11: Formação do grupamento metilenodioxílico (DEWICK, 2009).....	46
Figura 12: Formação do anel pirrolidínico em <i>Piper arboreum</i>	47
Figura 13: Estruturas químicas das amidas pirrolidínica e fenilpropanóides isolados de <i>Piper arboreum</i> Aublet (Piperaceae).....	48
Figura 14: Proposta biossintética de formação da piperilina em <i>Piper arboreum</i>	50
Figura 15: Incorporação de acetato de sódio marcado em folhas adultas de <i>Piper arboreum</i>	59
Figura 16: Exemplar de <i>Piper arboreum</i> : teste de germinação (A), semeadura em células (B) e mudas em saquinhos (C).....	60
Figura 17: Curva de calibração utilizando albumina como padrão protéico.....	62
Figura 18: Proposta de mecanismo para reação de Knoevenagel (CUNHA e SANTANA, 2012).	72
Figura 19: Reação de condensação de Knoevenagel do aldeído piperonal com o ácido malônico, e a formação do ácido 3',4'-metilenodioxícicâmico.	72
Figura 20: Reação de condensação de Knoevenagel do aldeído piperonal com o ácido malônico, e a formação do ácido 3',4'-metilenodioxícicâmico marcado.	73

Figura 21: Reação de condensação de Knoevenagel da vanilina com ácido malônico.	73
Figura 22: Reação de condensação de Knoevengel da vanilina com ácido malônico deuterado.	74
Figura 23: Cromatograma obtido via CLAE: (A) extrato das folha da planta jovem; (B) extrato dos frutos da planta adulta (C); extrato das folhas da planta adulta (D) padrão isolado dos frutos da planta adulta. Condição de análise: Coluna C18: phenomenex – Kinetex, Eluente: água/metanol – 60% de MeOH. Tempo: 60 min; Fluxo: 1,0 mL/min.	84
Figura 24: Amida pirrolidínica (1 - 3) presentes nas folhas e frutos de <i>P. arboreum</i>	85
Figura 25: Espectro de massas (EM-IES (+) da piperilina (1).	86
Figura 26: Espectro de EM/EM da piperilina (1).	87
Figura 27: Proposta de fragmentação dos principais íons fragmento da piperilina (1).	89
Figura 28: Estrutura química da piperilina (1).	90
Figura 29: Espectro e expansões de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da piperilina (1).	92
Figura 30: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD ₃ OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 3,63).	93
Figura 31: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD ₃ OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 6,45).	94
Figura 32: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD ₃ OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 6,82).	95
Figura 33 Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) da piperilina (1).	96
Figura 34: Curva calibração para quantificação da piperilina (1).	98
Figura 35: Cromatogramas (UV 344 nm) para quantificação circadiana da piperilina (1) nos extratos das folhas de <i>P. arboreum</i>	99
Figura 36: Cromatogramas (UV 344 nm) para quantificação sazonal da piperilina (1) nos extratos das folhas de <i>P. arboreum</i>	100
Figura 37: Gráfico da variação sazonal (A) e gráfico da variação circadiana (B) da piperilina (1) presente nas folhas adultas de <i>P. arboreum</i>	103
Figura 38: (A) Temperatura média e precipitação média (B) anual em Araraquara-SP, no ano de 2013.	103
Figura 39: Estrutura química de (1).	104
Figura 40: Precursores envolvidos na rota biossintética da piperilina (1) (DEWICK, 2009).	105
Figura 41: Espectro de massas do extrato das folhas enriquecido com CH ₃ ¹³ CO ₂ Na.	107

Figura 42: Espectro de massas das fragmentações do extrato das folhas enriquecido com $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$.	108
Figura 43: Proposta de fragmentação da piperilina marcada com $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$.	109
Figura 44: Gel SDS-PAGE dos extratos enzimáticos da folha jovem (2), folha adulta coletada as 11h (3), folha adulta coletada as 23h (4), fruto (5) de <i>P. arboreum</i> . Gel revelado com nitrato de prata.	111
Figura 45: 2D SDS-PAGE das folhas (A) e frutos (B) de <i>P. arboreum</i> . Separação entre pl 3-10 (IPG 3-10 Linear) e padrão de MW entre 14 e 97 kDa. Massa aplicada: 250 μg de proteína total.	112
Figura 46: Estrutura química do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico	113
Figura 47: Espectro e expansão de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico.	114
Figura 48: Espectro e expansão de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico.	115
Figura 49: Estrutura química do ácido ferúlico	116
Figura 50: Espectro e expansão de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido ferúlico.	118
Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) do ácido ferúlico.	119
Figura 52: Estrutura química do ácido [1-OD, 2-D]-3', 4' metilenodioxicinâmico.	120
Figura 53: Espectro e expansão de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido [1-OD,2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico.	121
Figura 54: Estrutura química do ácido [1-OD,2-D]- ferúlico	122
Figura 55: Espectro e expansão de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do ácido [1-OD,2-D]-ferúlico.	123
Figura 56: Reação enzimática utilizando as folhas da planta jovem e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilenodioxicinâmico.	126
Figura 57: Reação enzimática utilizando as folhas planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilenodioxicinâmico.	127
Figura 58: Reação enzimática utilizando os frutos planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilenodioxicinâmico.	128
Figura 59: Reação enzimática utilizando as folhas planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilenodioxicinâmico.	129

Figura 60: Atividade inseticida: testemunha (A) e tratamento (B).....	132
Figura 61: Curva de sobrevivência de operárias <i>Atta sexdens</i> mantidas com dietas artificiais sólidas.	133
Figura 62: Nova proposta biossintética para formação da piperilina (1).	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos isolados do gênero <i>Piper</i>	31
Tabela 2: Classificação botânica geral de acordo com o arranjo de Cronquist (1981).	39
Tabela 3: Massa dos extratos etanólicos de <i>Piper arboreum</i> Aublet.	55
Tabela 4: Gradiente de eluição utilizados para as análises por CLAE	58
Tabela 5: Concentração proteica dos extratos enzimáticos das folhas e frutos de <i>Piper arboreum</i>	62
Tabela 6: Padrão protéico de soro de albumina bovina, utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (KDa).	64
Tabela 7: Protocolo de focalização isoeletrica.	70
Tabela 8: Reagentes necessários para preparar 100 mL de gel poliacrilamida 12,5%.	70
Tabela 9: Quantidade de reagentes utilizados para reação enzimática.	76
Tabela 10: Dados de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) e ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da piperilina (1).	91
Tabela 11: Dados da quantificação da análise sazonal da piperilina (1).	102
Tabela 12: Dados da quantificação da análise circadiana da piperilina (1).	103
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) e ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) do ácido 3',4'- metilenodioxicinâmico comparados com dados da literatura (FERREIRA, 2006).	113
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) e ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) do ácido ferúlico comparados com os dados da literatura (REGASINI et al, 2008).	117
Tabela 15: Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) e ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) do ácido [1-OD,2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico.	120
Tabela 16: Dados de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do ácido [1-OD,2-D]- ferúlico.	122
Tabela 17: Atividade antifúngica dos extratos de <i>Piper arboreum</i>	131

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Extração em etanol e partição líquido-líquido das folhas de <i>Piper arboreum</i>	56
Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos frutos de <i>Piper arboreum</i>	57
Esquema 3: Extração enzimática das folhas de <i>Piper arboreum</i>	75

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	- acetato de etila
BSA	- <i>bovine serum albumin</i>
CC	- cromatografia em coluna
CCDC	- cromatografia em camada delgada comparativa
CDCl ₃	- clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	- metanol deuterado
C3H	- <i>p</i> -cumarato 3-hidroxilase
C4H	- cinamato 4-hidroxilase
CHAPS	- 3-[(colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	- cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CoA	- coenzima A
ConA	- concanavalina
d	- duplete
DAD	- detector de arranjo de diodo
dd	- duplo duplete
DMSO	- dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	- dimetilsulfóxido deuterado
DTT	- 1,4-ditiotreitol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EI	- abreviatura do inglês “electron ionization” (impacto eletrônico)
EM	- espectrometria de massas
ESI	- <i>electrospray ionization</i>
EtOH	- etanol
Hex	- hexano
Hz	- hertz
IAA	- iodoacetamida
IEF	- focalização isoelétrica
IPG	- gradiente de pH imobilizado

J	- constante de acoplamento
KDa	- kilodalton
L-DOPA	- L-3,4-dihidroxi-fenilalanina
LPS	- lipopolissacarídeo
[M] ⁺	- íon molecular
m	- múltiplo
M	- molar (mol.l ⁻¹)
mA	- miliampére
MeOH	- metanol
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
min	- minutos
MHz	- mega-hertz
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm	- milímetros
m/v	- relação massa-volume
<i>m/z</i>	- relação massa-carga
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	- fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMT	- <i>o</i> -metiltransferase
PA	- padrão analítico
PAL	- fenilalanina amônia-liase
pH	- potencial hidrogeniônico
PHA	- fitoemaglutina
pI	- ponto isoelétrico
PKS	- policetídeo sintase
PLP	- fosfato de piridoxal
PMA	- acetato de forbol-miristato
PSA	- persulfato de amônio
m/v	- relação massa volume
PVPP	- polivinilpirrolidona
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN de ^{13}C	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
RPM	- rotação por minuto
RUBISCO	- ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
s	- simpleto
SAM	- s-adenosil metionina
SDS-PAGE	- eletroforese em gel poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
TEMED	- tetrametiletilenodiamina
TMS	- tetrametilsilano
TRIS	- tris(hidroximetil)aminometano
t_R	- tempo de retenção
u.m.a	- unidade de massa atômica
UV	- ultravioleta
δ	- deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Química de produtos naturais.....	25
1.2 Família Piperaceae.....	27
1.3 Gênero <i>Piper</i>	29
1.4 Espécie <i>Piper arboreum</i>	38
1.5 Classificação botânica geral	39
1.6 Elucidação de vias biossintéticas.....	40
1.7 Proposta biossintética para formação das piperamidas em espécies <i>Piper</i>	43
1.7.1 Formação dos fenilpropanoides (C ₆ -C ₃)	43
1.7.2 Formação do grupo metilenodioxílico	45
1.7.3 Formação do anel pirrolidínico.....	46
2 OBJETIVOS.....	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Solventes e equipamentos básicos	51
3.2 Cromatografia em camada delgada.....	51
3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)	52
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE-EM)	52
3.6 Eletroforese mono e bidimensional.....	53
3.7 Material vegetal.....	53
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.1 Preparo, extração e análise das folhas e frutos de <i>Piper arboreum</i>	54
4.2 Análise sazonal e circadiana da piperilina (1).....	58
4.3 Estudos biossintéticos.....	59
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	61
4.4.1 Obtenção do extrato enzimático	61
4.4.2 Dosagem protéica – Ensaio de Bradford modificado	61
4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	62
4.4.3.1. Soluções e reagentes necessários.....	62

4.4.4	Preparo das amostras e dos padrões	63
4.4.5	Preparo, desenvolvimento e revelação do gel.....	64
4.4.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (2D SDS-PAGE).....	66
4.4.6.1	Soluções.....	66
4.4.6.2	Limpeza das amostras.....	68
4.4.6.3	Reidratação das tiras de IPG (<i>Immobilized pH Gradient</i>)	69
4.4.6.4	Primeira dimensão: focalização isoeétrica.....	69
4.4.7	Segunda dimensão: SDS-PAGE.....	70
4.4.7.1	Preparo do gel de poliacrilamida 12,5%	70
4.4.7.2	Equilíbrio das tiras	71
4.4.7.3	Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE	71
4.5	Síntese de precursores biossintéticos.....	71
4.5.1	Síntese do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico	72
4.5.2	Síntese do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico marcado com deutério.....	73
4.5.3	Síntese do ácido ferúlico	73
4.5.4	Síntese do ácido ferúlico marcado com deutério	74
4.6	Reações enzimáticas	74
4.6.1	Ensaio enzimático	77
5	ATIVIDADE BIOLÓGICA	77
5.1.	Atividade antifúngica.....	77
5.2	Atividade antiinflamatória.....	78
5.2.1	Bioensaios <i>in vivo</i>	78
5.2.2	Sacrifício e coleta do material.	79
5.2.3	Obtenção de macrófagos peritoneais e de células esplênicas.....	79
5.2.4	Cultura de células.....	79
5.2.5	Determinação da produção de H ₂ O ₂	80
5.2.6	Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	80
5.2.7	MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido).....	80
5.3	Atividade antioxidante	81
5.3.1	Ensaio frente a enzima tirosinase.....	81
5.4	Atividade inseticida frente a <i>Atta sexdens</i>	82
5.4.1	Atividade dos extratos via ingestão	82

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
6.1 Perfil cromatográfico dos extratos das folhas e frutos de <i>Piper arboreum</i>	83
6.2 Identificação estrutural da piperilina (1)	85
6.3 Dinâmica sazonal e circadiana da <i>Piper arboreum</i>	97
6.4 Experimentos biossintéticos em <i>Piper arboreum</i>	103
6.5 Análise por eletroforese monodimensional do extrato enzimático do fruto e folhas de <i>Piper arboreum</i> (SDS-PAGE)	110
6.6 Análise por eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) do extrato enzimático das folhas e frutos de <i>Piper arboreum</i>	111
6.7 Síntese de precursores biossintéticos.....	112
6.7.1 Determinação estrutural dos precursores sintetizados.	112
6.7.1.1 Ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico	112
6.7.1.2 Ácido ferúlico	116
6.7.2 Determinação estrutural dos precursores marcados.....	120
6.7.2.1 Ácido [1-OD,2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico.....	120
6.7.2.2 Ácido [1-OD,2-D]- ferúlico	122
6.8 Reação enzimática	124
6.9 Atividade biológica.....	130
7 CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS	136

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química de produtos naturais

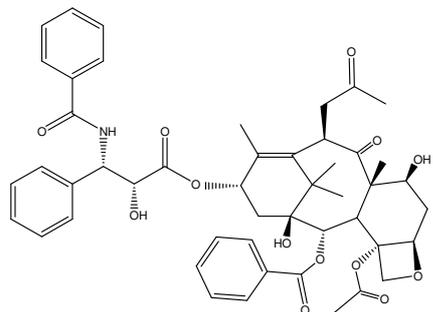
O conhecimento sobre as plantas medicinais e seu uso é tão antigo quanto a espécie humana, sendo muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al, 2002).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem estão registradas nas escrituras sagradas e no papiro de Ebers. Durante o período anterior à era cristã muitos filósofos se destacaram por suas obras sobre a história natural. Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, utilizou os recursos naturais como guia na escolha de remédios. Teofrasto (372 a.C) escreveu vários livros sobre a história das plantas sendo responsável pelo registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, cujo princípio ativo é a morfina. O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal, principalmente ácidos orgânicos e alcalóides ocorreram nos séculos XVIII e XIX, com o isolamento da morfina, quinina e estricnina. No entanto foi no século XX que ocorreu a primeira síntese dos alcaloides, quinina, estricnina e reserpina (PINTO et al, 2002).

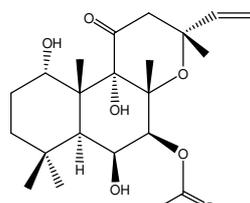
Os recursos naturais têm sido utilizado, até os dias atuais, como fonte de novas drogas. Devido suas propriedades estruturais, tem papel importante para a descoberta e desenvolvimento de processos para obtenção de fármacos. A modificação estrutural nos esqueletos dos produtos naturais ativos, tem levado à formação de novos agentes que desempenham importantes atividades biológicas. (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Segundo Cragg e Newman (2013) 65% da população mundial utilizam plantas para curar suas enfermidades. O estudo químico e farmacológico das plantas medicinais possibilitou a obtenção de novos compostos com propriedades relevantes, como o taxol (anticancerígeno), a forskolina (anti-hipertensivo), a artemisinina (antimalárico), a morfina (analgésico), a emetina (anti-protozoário), a galangina (antibacteriano), a colchicina (antiinflamatório) (figura 1, p.26). Apesar do grande avanço científico, das 300 mil espécies existentes no planeta, apenas 6% foram investigadas e descritas quanto ao seu potencial farmacológico, e 15% delas tem sido estudadas do ponto de vista fitoquímico. Uma menor porcentagem, é avaliada sob os aspectos biológicos (CRAGG e NEWMAN, 2013; CSEKE et al., 2006; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

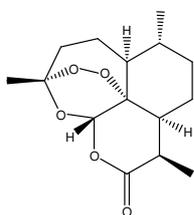
Figura 1: Substâncias com propriedades farmacológicas isoladas de plantas.



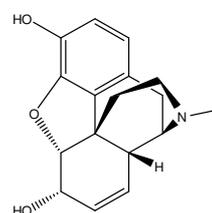
taxol



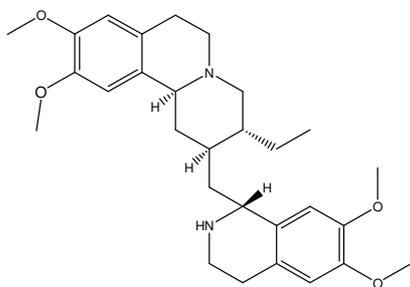
foscolina



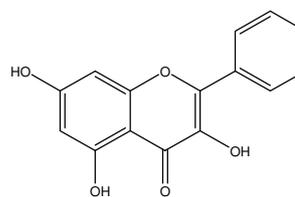
artemisina



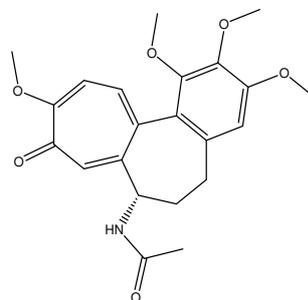
morfina



emetina



galangina



colchichina

O estudo sistemático de plantas medicinais envolvendo diversas áreas do conhecimento possibilita a elucidação dos metabólitos presentes na espécie vegetal, sua constituição genética e os fatores que interferem na variação do teor de princípios ativos (CASTRO et al, 2004; Di STASI, 1996). Com o uso de ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal novas moléculas com atividades biológicas podem ser planejadas e desenvolvidas (GUIDO et al, 2010).

1.2 Família Piperaceae

Considerada uma família predominantemente tropical, a Piperaceae é considerada uma das mais primitivas entre as Angiospermas, pertencente à ordem Piperales e ao clado Magnoliídeas. Esta família foi descrita no século XVIII por Linnaeus, que lhe atribuiu quatro gêneros, sendo o gênero *Piper* descrito em 1737 (KATO e FURLAN, 2007).

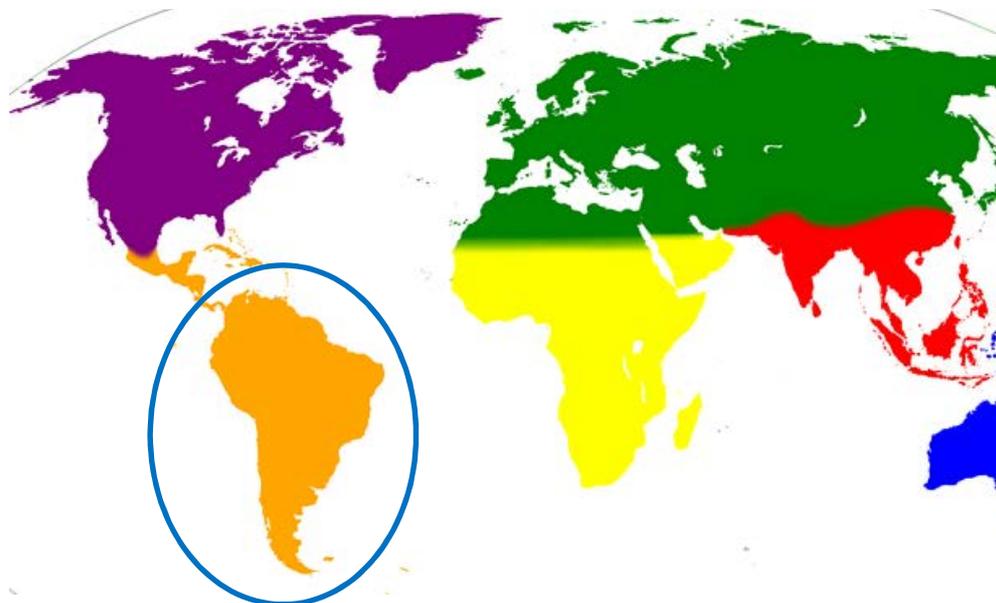
Atualmente, são reconhecidos cinco gêneros (Figura 2), subdivididos em três subfamílias: *Peperomia* Ruiz & Pavon e *Piper* L. (Piperoideae). *Verhuellia* Miq. (Verhuellioideae), *Manekia* Trel.e *Zippelia* Blume. (Zippelioideae), com mais de 3.600 espécies e distribuição pantropical (QUIJANO-ABRIL et al., 2006; WANKE et al., 2007; SAMAIN et al. 2008; SMITH et al 2008).

Figura 2: Gêneros da família Piperaceae.



Com exceção do gênero monotípico *Zippelia*, que ocorre predominantemente na Ásia tropical, todos os demais gêneros estão bem representados na região neotropical (MELO et al., 2014; SUWANPHAKDEE e CHANTARANOTHAI, 2009; TEBBS 1993). *Peperomia* Ruiz & Pavon e *Piper* L., são os gêneros mais representativos da família, com aproximadamente 1500 espécies cada, encontradas principalmente na América do Sul (Figura 3, p. 28), em florestas úmidas e região amazônica (SAMAIN et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2015).

Figura 3: Distribuição geográfica da família Piperaceae.



Estudos taxonômicos de espécies de Piperaceae têm sido desenvolvidos no Brasil e, com isso, estabelecida as diretrizes para o entendimento das diferenças morfológicas desta família (ALBIERO et al., 2006; GUIMARÃES & GIORDANO, 2004). Esta família representada por aproximadamente 450 táxons, distribuídos em quatro gêneros, apresenta maior diversidade na Mata Atlântica e Amazônia com cerca de 280 e 230 táxons, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2015).

As espécies desta família, são geralmente arbustivas e herbáceas, podendo ocorrer em diversas formas, sendo observadas também como pequenas árvores. As folhas podem ser simples, alternadas, opostas ou verticiladas, de margem inteira e geralmente com odor característico. As inflorescências são em espigas, solitárias ou não, axilares, terminais ou opositifoliais (GUIMARÃES et al., 2015; DYER e PALMER, 2004; JARAMILLO et al., 2004; PARMAR et al., 1997; CRONQUIST, 1981).

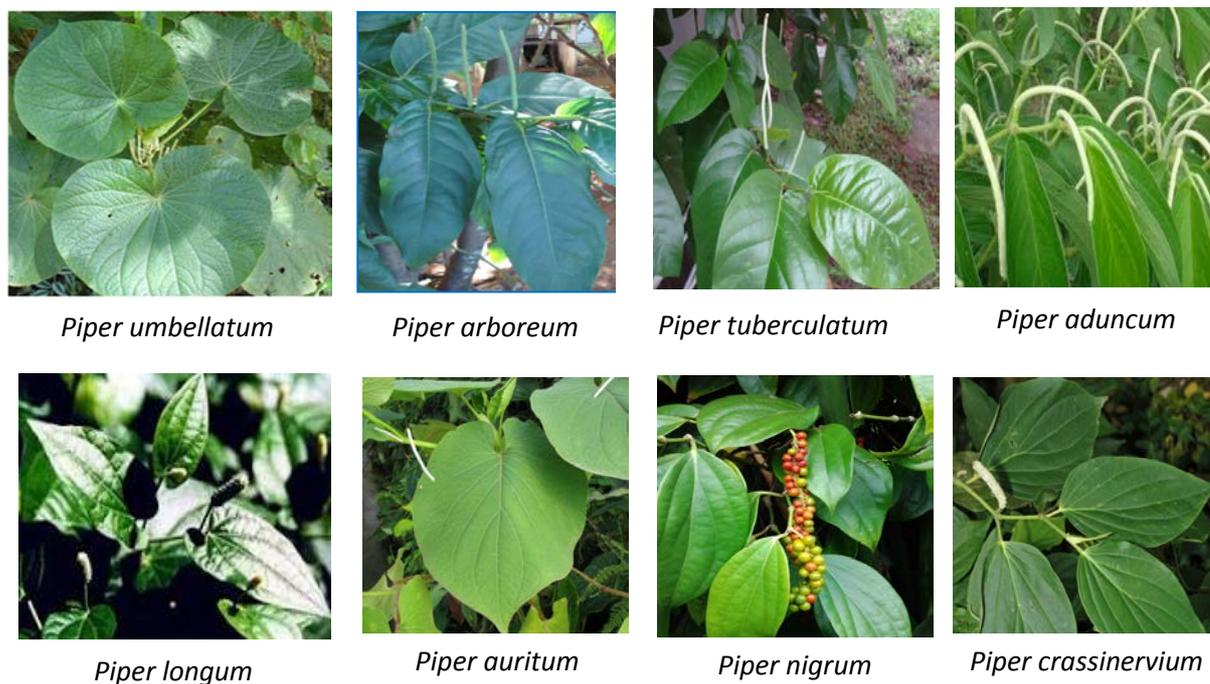
Muitas espécies da família Piperaceae são economicamente importantes, sendo cultivadas para fins ornamentais (*Peperomia pellucida*), para culinária, como especiarias (*Piper nigrum*), como fitoterápico (*Piper methysticum*), sendo ainda de grande importância para a indústria farmacêutica de cosméticos e de defensivos agrícolas (PESSINI et al., 2003; SILVA e MACHADO, 1999).

A investigação fitoquímica de espécies de Piperaceae tem revelado uma grande variedade de compostos bioativos. As principais classes de compostos descritos são as lignanas/neolignanas (PARMAR et al., 1997; BENEVIDES et al. 1999; FELIPPE et al, 2008; FELIPPE et al, 2011), derivados do ácido benzóico (LAGO et al., 2004; BALDOQUI et al., 1999; BERGAMO et al., 2005; MORANDIM et al., 2005; LOPES et al., 2008), cromanos e cromenos prenilados (BALDOQUI et al. 1999; BATISTA JUNIOR et al., 2008; MOTA et al., 2009), amidas alifáticas e aromáticas (SILVA, et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2000; COTINGUIBA et al. 2009), policetídeos (CHENG et al., 2003) e piperolídeos (LAGO et al., 2004; MARQUES et al., 2008), além de produzir óleos essenciais compostos por monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides (SANTOS et al., 2001; NAKAMURA et al., 2006; POTZERNHEIM et al., 2006).

Os metabólitos secundários isolados da família Piperaceae mostraram potente atividade frente ao *Trypanossoma cruzi* (REGASINI et al, 2009b; BATISTA JUNIOR et al., 2008; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007), antifúngica (MORANDIM et al., 2010; REGASINI et al., 2009a; NAVICKIENE et al., 2006; SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2000), antibacteriana (CUNICO et al., 2006), antileishmania (ESTEVEZ et al., 2007; NAKAMURA et al., 2006), ansiolítica (AMORIM et al., 2007) anticonvulsante e anti-inflamatória (BARBOSA-FILHO et al., 2006; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008), contra hepatite C (JARDIM et al., 2015).

1.3 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* teve o seu primeiro estudo químico em 1819 (ZACHARIAH et al., 2008), quando foi isolada a piperamida piperina, um princípio ativo pungente de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino). Este gênero apresenta aproximadamente 2.000 espécies (QUIJANO-ABRIL et al., 2006; WANKE et al., 2007), distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, comum em matas de galerias. Encontradas como arbustos ou árvores, sublenhosos com espigas opostas às folhas e que podem ser reconhecidas em seu estado vegetativo pela presença de nós foliares geniculados. As folhas apresentam base bastante assimétrica e os frutos uma drupa, séssil ou pedicelado (GUIMARÃES e GIORDANO, 2004). Exemplos de *Piper* são mostrados na Figura 4, página 30.

Figura 4: Exemplos de espécies do gênero *Piper* encontradas no Brasil.

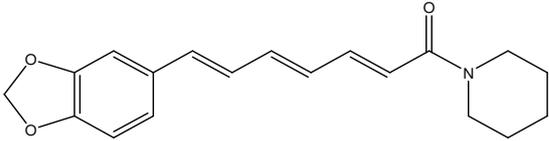
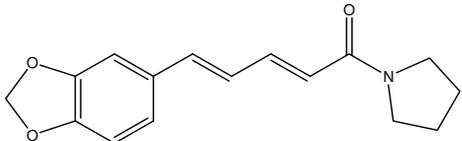
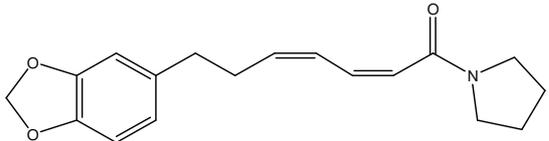
As semelhanças morfológicas encontradas entre espécies de *Piper* dificultaram a identificação, permitindo a troca e até mesmo falsificação quando as espécies são coletadas e comercializadas como medicinais (PESSINI et al., 2003; ALBIERO, 2005; ALBIERO, 2006). Desta forma, as características quimiotaxonômicas podem corroborar para o estudo de taxonomia, ecologia e controle de qualidade desta espécie (SOUZA et al., 2009).

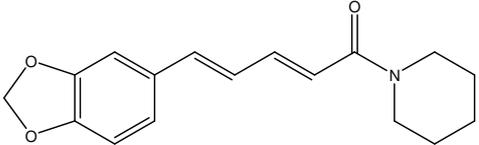
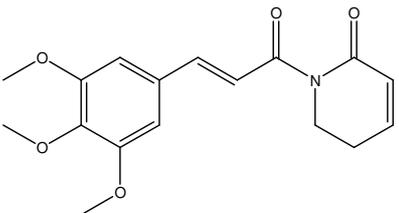
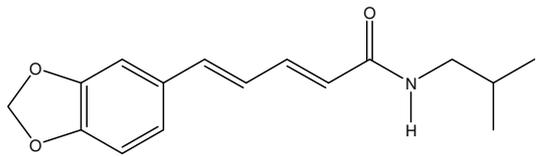
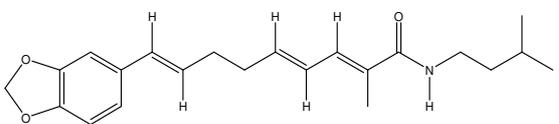
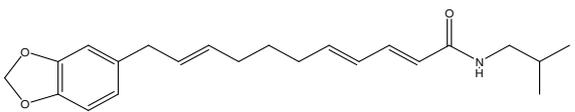
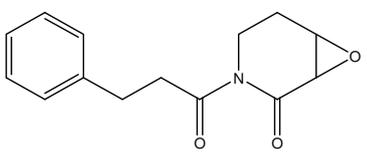
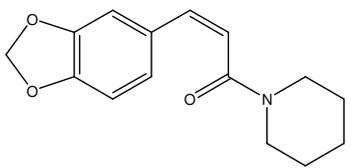
Um número significativo de espécies do gênero *Piper* tem aplicações medicinais, importância comercial e econômica devido à produção de óleos essenciais (MONZOTE et al., 2010; POTZERNHEIM et al., 2006), que são utilizados na indústria de condimentos, farmacêutica e inseticidas. A análise de algumas espécies mostrou a presença de compostos com importantes atividades biológicas, como atividade antileishmania (BOSQUIROLI et al., 2015; CONDE-HERNÁNDEZ e GUERRERO BELTRÁN, 2014; RUIZ et al., 2011; MONZOTE et al., 2010; MISRA et al., 2009), tripanocida (HAMEDT et al., 2014; REGASINI et al., 2009b), antifúngica (SPEROTTO et al., 2013; REGASINI et al., 2009a; GUERRINI et al., 2009; PESSINI et al., 2005; SILVA et al., 2002), antibacteriano (NASCIMENTO et al., 2015; NOVAES et al., 2014; MALAMI et al., 2014; SILVA JUNIOR et al., 2014; SOUZA, 2010; BENÍTEZ et al., 2009), antiparasitária e antioxidante (PARMAR et al., 1997; NAVICKIENE et al., 2000;

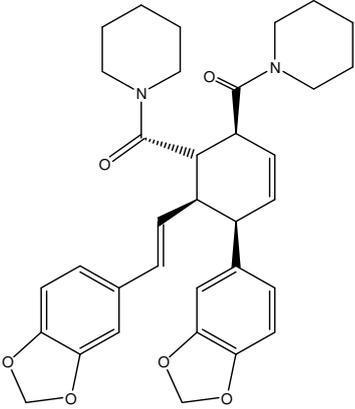
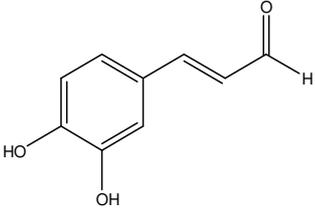
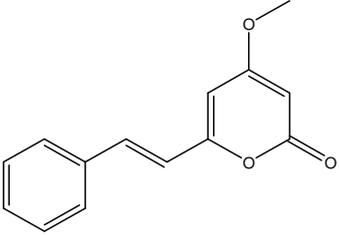
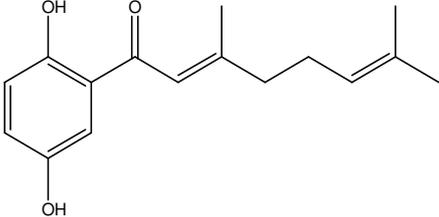
KATO e FURLAN, 2007; COTINGUIBA et al., 2009), anti-inflamatória (PERAZZO, et al., 2013; LIMA et al., 2012), antiviral (JARDIM, et al., 2015), antidepressivo e antinocepcivo (XIE et al., 2011; YAO et al., 2009), antiveneno (SHENOY et al., 2014), antitumoral (BEZERRA et al., 2013), larvicida (KANIS et al., 2013), schistosomicida (MORAES et al., 2012), antituberculose e antiplaquetária (CHEN et al., 2013).

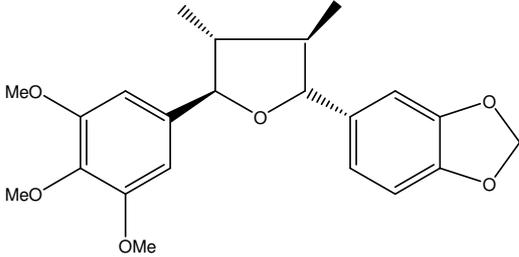
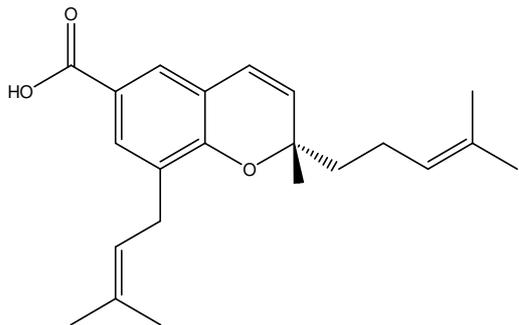
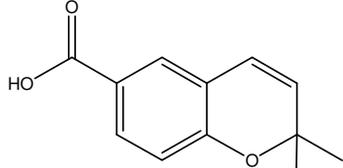
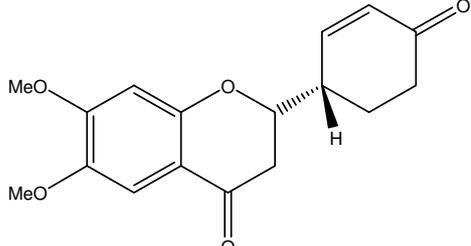
A investigação fitoquímica do gênero *Piper* levou ao isolamento de metabólitos secundários pertencentes às classes das amidas (NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2006), derivados de ácido benzóico e hidroquinonas, cromenos, lignanas, neolignanas, flavonóides e alcalóides (LAGO et al., 2004; FELIPPE et al., 2008; RAMOS E KATO, 2009; BALDOQUI et al., 2009) e óleos essenciais como monoterpenos e sesquiterpenos (MONZOTE et al., 2010; POTZERNHEIM et al., 2006; MUNDINA et al., 1998; GOTTLIEB et al., 1981). Alguns exemplos de metabólitos isolados de *Piper*, estão descritas na Tabela 1.

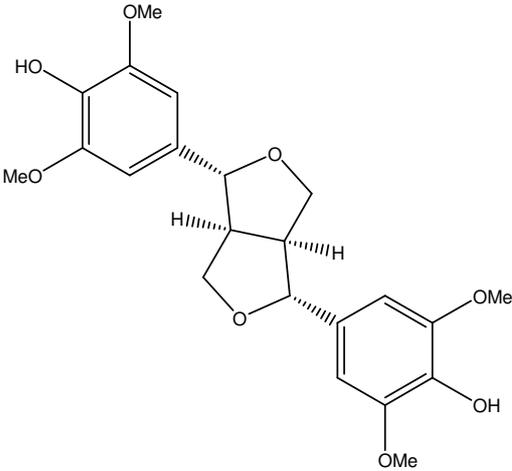
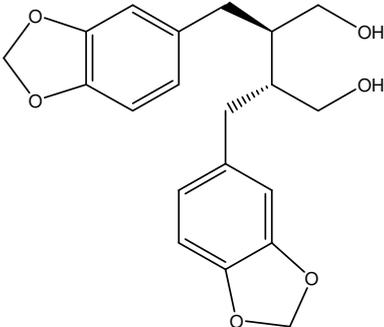
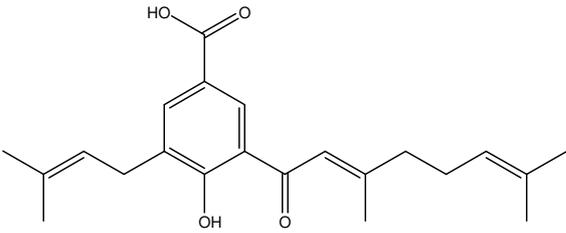
Tabela 1: Metabólitos isolados do gênero *Piper*.

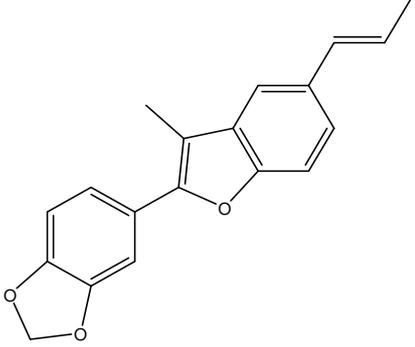
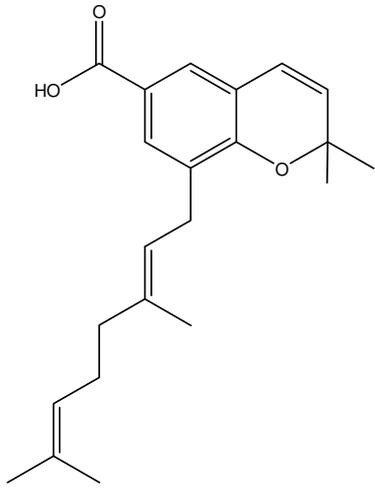
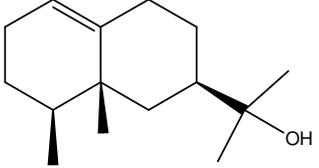
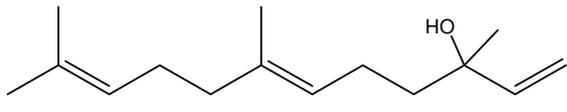
Nome	Espécie	Atividade biológica	Referências
 <p>piperetina</p>	<i>Piper arboreum</i>	antifúngico antimicrobiano	NASCIMENTO et al., 2015.
 <p>piperilina</p>	<i>P. arboreum</i>	antifúngica	REGASINI et al., 2009a; SILVA et al., 2002.
 <p>N-[7-(3',4'-metilendiox)-2(Z),4(Z)-heptadienoil] pirrolidina</p>	<i>P. hispidum</i>	antifúngica	ALÉCIO et al., 1998.

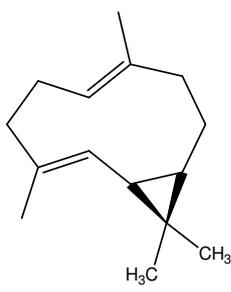
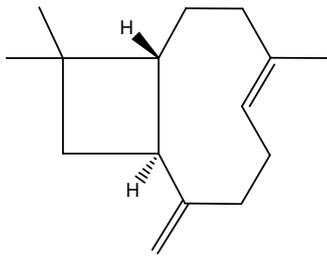
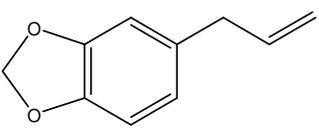
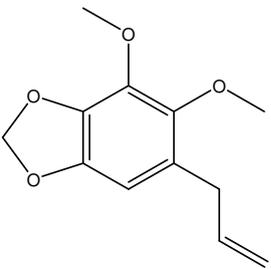
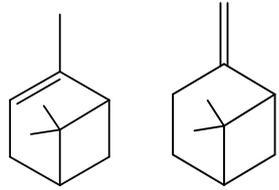
 <p>piperina</p>	<p><i>P. tuberculatum</i></p>	<p>antifúngica triptanocida antiúlceras</p>	<p>SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2000; BURCI et al., 2013.</p>
 <p>diidropiartina</p>			
 <p>piperlonguminine</p>	<p><i>P. ovatum</i></p>	<p>triptanocida inseticida</p>	<p>KANIS et al., 2013; SANTOS et al., 2013.</p>
 <p>pipiaiina</p>	<p><i>P. longum</i></p>	<p>larvicida</p>	<p>MADHU et al., 2011.</p>
 <p>laetispicina</p>	<p><i>P. laetispicum</i></p>	<p>antinociceptivo antidepressivo</p>	<p>YAO et al., 2009.</p>
 <p>kaousina</p>  <p>Z-antiepilepsirina</p>	<p><i>P. capense</i></p>	<p>antimalárico</p>	<p>KAOU et al., 2010.</p>

 <p>chabamida</p>	<i>P. chaba</i>	citotóxica antimalárico antituberculose	RAO et al., 2011; RUKACHAISIR IKUL et al., 2002.
 <p>Aldeído <i>trans</i>-caféico</p>	<i>P. taiwanense</i>	antituberculose	CHEN et al., 2013.
 <p>desmetoxiangonina (5,6-deiidrokavaína)</p>	<i>P. fuliginum</i>	antiviral	JARDIM et al., 2015.
 <p>1,4-diidroxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2',6'-octadienil)benzeno</p>	<i>P. crassinervium</i>	antifúngica, antioxidante tripanocida	DANELUTTE et al., 2003; LÓPEZ et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2006.

 <p>rel-(7R,8R,7'R,8'R)-3',4'-metilenodioxo-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana</p>	<i>P. solmsianum</i>	tripanocida	MARTINS et al., 2003.
 <p>2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>P. gaudichaudianum</i>	tripanocida	BATISTA JUNIOR et al., 2008.
 <p>ácido 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico</p>	<i>P. aduncum</i>	tripanocida	BATISTA JUNIOR et al., 2008.
 <p>5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-4'-oxo-ciclohex-2'-en-1'-il)-6,7 dimetoxi-2,3-diidro-4H-cromeno-4-ona</p>	<i>P. carniconectivum</i>	antileucêmica	FREITAS et al., 2014.

 <p>(-)-siringaresinol</p>	<i>P. wallichii</i>	antitrombótica	SHI et al., 2015.
 <p>sesamina</p>	<i>P. umbellata</i>	-	BALDOQUI et al., 2009.
 <p>ácido 4-hidroxi-3 (E)--(3,7-dimetil-1-oxo-2,6 octadienil)-5-(3-metil-2-butenil)benzóico</p>	<i>P. cf. cumanense</i>	antifúngica	PARRA et al., 2013

 <p>eupomatenóide-3</p>	<i>P. reganelli</i>	antituberculose	SCODRO et al., 2013
 <p>ácido-2,2-dimetil-8-(3',7'-dimetil-octa-2',6'-dienil)-2H-1-benzopirano-6-carboxílico</p>	<i>P. cf. cumanense</i>	antifúngica	PARRA et al., 2011.
 <p>Eremoligenol</p>	<i>P. arboreum</i>	-	CYSNE et al., 2005.
 <p>(E)-Nerolidol</p>	<i>P. arboreum</i> <i>P. claussonianum</i>	leishimanicida	MARQUES et al., 2011.

 <p>Bicyclgermacreno</p>	<p><i>P. arboreum</i></p>	<p>-</p>	<p>GOTTLIEB et al., 1981.</p>
 <p>(E)-cariofileno</p>	<p><i>P. arboreum</i> <i>P. ottonoides</i></p>	<p>-</p>	<p>GOTTLIEB et al., 1981.</p>
 <p>safrol</p>	<p><i>P. marginatum</i> <i>P. collossum</i> <i>P. hipidinervum</i> <i>P. auritum</i></p>	<p>-</p>	<p>MONZOTE et al., 2010; GOTTLIEB et al., 1981.</p>
 <p>dilapiol</p>	<p><i>P. aduncum</i></p>	<p>inseticida</p>	<p>SILVA et al., 2007</p>
 <p>α-pineno β-pineno</p>	<p><i>P. ottonoides</i> <i>P. crassinervium</i></p>	<p>-</p>	<p>GOTTLIEB et al., 1981.</p>

Plantas do gênero *Piper* têm como principal polinizador e dispersor de sementes o morcego *Carollia perspicillata* (Figura 5). Os morcegos usam uma combinação de ecolocalização (forma, estrutura da superfície) e olfação (aroma) para localizar os frutos maduros. Os frutos de *Piper* permanecem esverdeados quando maduros, são moles, exalam odor característico e são rapidamente consumidos pelos morcegos. Através sucessivas coletas do fruto maduro durante à noite, a maior parte das sementes ingeridas são defecadas e dispersadas propagando, desta forma, a espécie (CAMPOS et al., 2012; DYER e PALMER, 2004; THIES et al., 1998), sendo então, um importante recurso alimentar para esse quiróptero, rico em proteínas e com baixo teor de fibras, correspondendo a aproximadamente 70% de sua dieta (MIKICH, 2002).

Figura 5: Morcego (*Carollia perspicillata*).



Fonte: Dyer e Palmer, (2004)



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/carollia>

1.4 Espécie *Piper arboreum*

Piper arboreum (Figura 6, p. 39) é um arbusto com aproximadamente 2 a 4 metros de altura, com hastes cilíndricas e nodosas de coloração marrom claro e folhas com base bastante assimétrica (SOUZA et al., 2009; GUIMARÃES e GIORDANO, 2004), é conhecida popularmente como pimenta longa, condorcillo (DUKE e VASQUES, 1994), alecrim-de-angola ou pau-de-angola (GUIMARÃES e GIORDANO, 2004). Na Amazônia, *P. arboreum* é popularmente utilizada sob a forma de chá para bronquites, resfriados e gripes fortes. Nessa região sua raiz é conhecida como raiz-de-pahim (VAN DEN BERG, 1993).

Figura 6: *Piper arboreum*

Fonte: arquivo pessoal.

1.5 Classificação botânica geral

A classificação botânica geral de *Piper arboreum* segue o sistema de arranjos de Cronquist (1981) (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação botânica geral de acordo com o arranjo de Cronquist (1981).

Reino	Plantae
Divisão	Angiosperma A. Braun & Doill (Magnoliophyta)
Classe	Dicotyledonae
Subclasse	Magnolidae
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae Agardth
Gênero	<i>Piper</i>
Espécie	<i>Piper arboreum</i>

Estudos anteriores realizados por SILVA (2004), mostraram que *P. arboreum* acumula amidas pirrolidínicas, sendo, portanto, consideradas marcadores na espécie. Foram também identificados monoterpenos e sesquiterpenos nos óleos essenciais da espécie (NAVICKIENE et al., 2006). Recentemente, Nascimento e colaboradores (2015) isolaram a amida piperetina das raízes desta espécie e avaliaram a atividade dos extratos das frações e óleos essenciais frente à bactéria *Staphylococcus aureus* e aos fungos *Microsporium gypseum* e *Epidermophyton floccosum*, mostrando potente atividade antibacteriana e antifúngica.

As amidas pirrolidínicas apresentam diversas atividades biológicas, destacando-se a atividade antifúngica frente aos fungos oportunistas *Cladosporium sphaerospermum* (SILVA et al, 2002), *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (REGASINI, et al., 2009a). Apresentam também atividades carminativa e emoliente (DUKE E VASQUEZ, 1994).

1.6 Elucidação de vias biossintéticas

A biotecnologia nas suas mais diferentes abordagens tem criado novas perspectivas para o melhoramento vegetal visando a produção em grande escala de metabólicos com potencial farmacológico, utilizando técnicas de transferência de genes em plantas, contribuindo significativamente para o aumento da qualidade, produtividade, resistência a doenças e pragas, e tolerância as condições ambientais (SANTARÉM, 2000). O desenvolvimento de novas biotecnologias para produção ou modificação de produtos, o aperfeiçoamento de plantas ou animais e a descoberta de microorganismos para usos específicos abriu inúmeras oportunidades para o investimento sustentável dos recursos genético nas áreas de interesse químico, farmacêutico, agrícola e industrial (ALBAGLI, 1998).

A elucidação das vias metabólicas de espécies vegetais tem despertado grande interesse da comunidade científica, pois permite o entendimento dos mecanismos de formação de inúmeras substâncias biologicamente ativas (ENGLARD e SEIFTER, 1990). Quando a estrutura de um metabólito secundário é elucidada, usualmente é possível propor a biogênese para a formação do mesmo a partir de substâncias derivadas do metabolismo primário, tais como acetato, mevalonato, chiquimato e/ou ácidos aminados (DEWICK, 2009).

A confirmação da rota biossintética proposta, pode ser feita por dois caminhos. Um deles é através da incubação de precursores (marcados ou não) em extratos enzimáticos (*in vitro*). Nesta técnica, as enzimas que atuam na formação do metabólito de interesse são extraídas do organismo em estudo e incubadas com os possíveis precursores (BACHER et al., 1999). Outro caminho é a incorporação de precursores (isotopicamente marcados ou não) em organismos intactos, tais como plântulas, órgãos vegetais e cultura de células (*in vivo*). Neste procedimento, a enzima responsável pela síntese do metabólito de interesse utiliza todo o maquinário celular para produzi-lo. Sendo assim, não é necessário fornecer condições especiais para

que a enzima expresse sua atividade, sendo necessário apenas manter o organismo vivo durante o estudo (BACHER et al., 1999). Uma das formas de confirmação da incorporação dos precursores marcados, pode ser realizada pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C , que apresenta o sinal aumentado do carbono que foi marcado. Outra forma de confirmação pode ser realizada pela análise dos espectros de massas (MACEDO JÚNIOR, 2007; LOBO e LOURENÇO, 2007).

Após o estabelecimento do caminho biossintético, a próxima etapa é identificar as enzimas envolvidas na biossíntese proposta. Muitas vezes, esta etapa é limitante, pois muitas enzimas apresentam baixa atividade, ou são difíceis de serem extraídas da planta matriz. Para aquelas etapas da via biossintética nas quais não se conhecem os intermediários, a determinação da atividade enzimática pode ser dificultada. Nestes casos, o estudo das proteínas (proteoma) pode ser o caminho que fornecerá novas perspectivas na identificação das enzimas envolvidas em determinadas etapas do metabolismo secundário (CORSINO et al., 2000, MORANDIM et al., 2005).

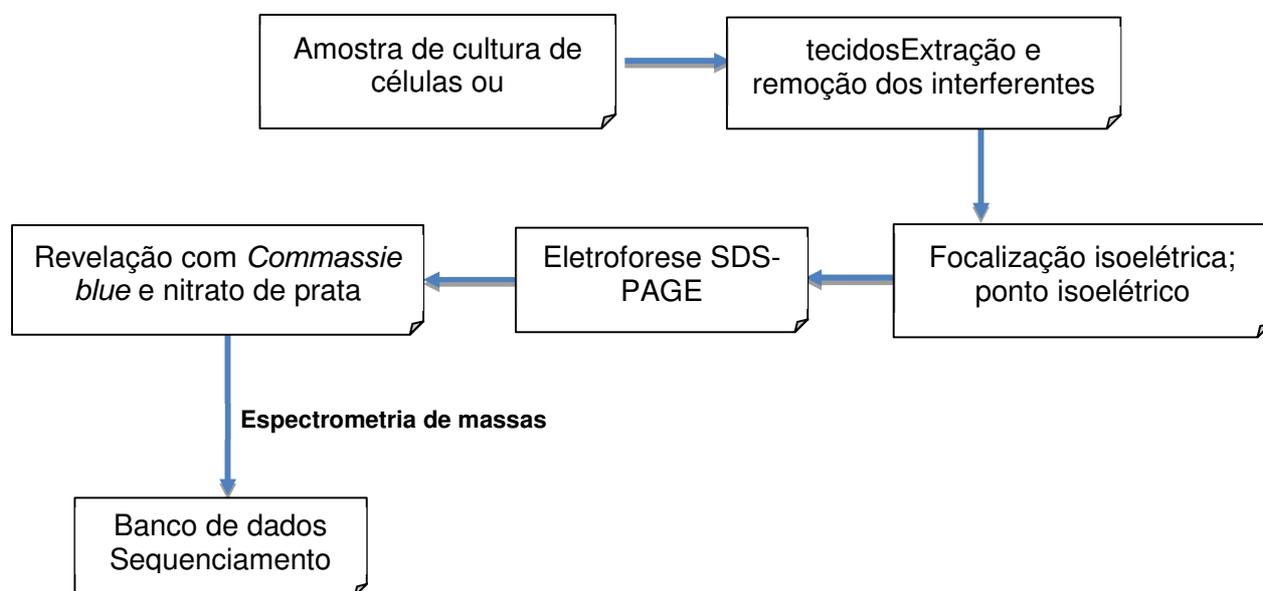
O crescente interesse pelo proteoma está associado às informações geradas pelos diferentes programas de sequência genômica, informações estas que promovem subsídios para antecipar os elementos estruturais relacionados a um dado metabólico cognato e decodificar seu maquinário biossintético. O uso da sequência genômica tornou-se uma ferramenta de rotina em todos os laboratórios do mundo permitindo a identificação de um grande número de *clusters* de genes biossintéticos com potencial para direcionar a produção de novos produtos naturais, além de possibilitar a elucidação de inúmeras vias biossintéticas. Com base nessas ferramentas, Oliveira e colaboradores (2013) relataram a importância do estudo interdisciplinar, envolvendo a química e biologia, principalmente a biologia molecular, para um melhor entendimento da química de produtos naturais, em especial de micro-organismos.

As principais técnicas utilizadas para separar uma mistura complexa de proteínas são a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), e a espectrometria de massas. A eletroforese bidimensional foi desenvolvida inicialmente por O'FARREL (1975). Nesta técnica as proteínas são separadas em duas dimensões de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, focalização isoelétrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). Na segunda dimensão, eletroforese em gel poliacrilamida com dodecil sulfato de

sódio (SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares. Uma vez determinado o complexo protéico, este pode ser comparado com programas já disponíveis para análise de gel, onde as manchas visualizadas são analisadas por espectrometria de massas, utilizando a técnica MALDI-TOF (PASTERNAK, 2012; ROCHA et al, 2005).

A identificação das proteínas é baseada na análise da sequência de aminoácidos, ou no mapeamento da cadeia peptídica através da digestão de polipeptídeos (impressão digital). Para tanto, os pesos moleculares e a sequência dos peptídeos obtidos são utilizados como base de dados para busca em um banco, permitindo a identificação de proteínas já conhecidas (CANTÚ et al, 2008; WILKINS et al., 1998; WILM et al., 1996). Muitas vezes é possível identificar e determinar a função de uma determinada proteína, sendo que a informação da sequência de aminoácidos pode ser utilizada para clonagem de genes. As principais etapas envolvidas na análise do proteoma estão descritas na Figura 7.

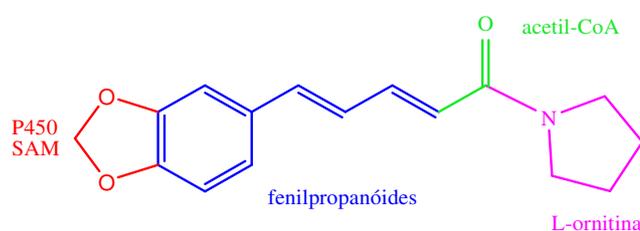
Figura 7: Etapas fundamentais para análise do proteoma.



1.7 Proposta biossintética para formação das piperamidas em espécies *Piper*.

As amidas pirrolidínicas apresentam biogênese baseada em uma via mista envolvendo o chiquimato na formação das unidades C₆-C₃, o acetato, responsável pelo grupo acetil no final da extensão da cadeia carbônica, e a ornitina que fornece o anel pirrolidínico. As enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450 e S-adenosil metionina estão envolvidas na formação do grupo metilenodioxílico (Figura 8).

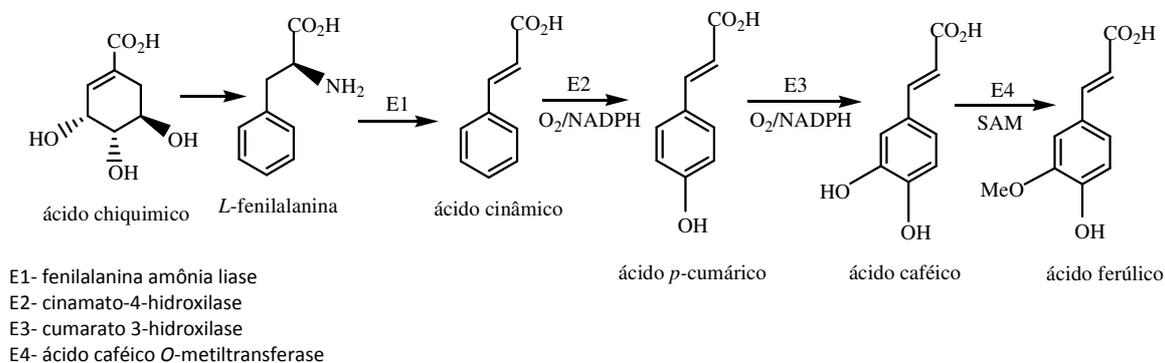
Figura 8: Biogênese das amidas pirrolidínicas



1.7.1 Formação dos fenilpropanóides (C₆-C₃)

O ácido chiquímico é um intermediário chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos, sendo a fenilalanina importante na formação dos fenilpropanóides e precursor de diversas classes de metabólitos secundários como flavonóides, ácido hidroxicinâmicos, antocianinas, dentre outros metabólitos, que desempenham diversas funções na biologia e ecofisiologia das plantas. O ácido cinâmico foi o primeiro precursor fenilpropanoídico, obtido pela *trans*-desaminação da *L*-fenilalanina pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). Esse ácido é convertido para ácido *p*-cumárico pela ação da enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H), em reação dependente da enzima citocromo do tipo P450. Em uma série sequencial de reações, outros fenilpropanóides, são obtidos por meio de reações de hidroxilações e metilações controladas pela hidroxilases, SAM O-metiltransferases, e desidratases (LANDOLINO e COOK, 2010; DEWICK, 2009), (Figura 9, p. 44).

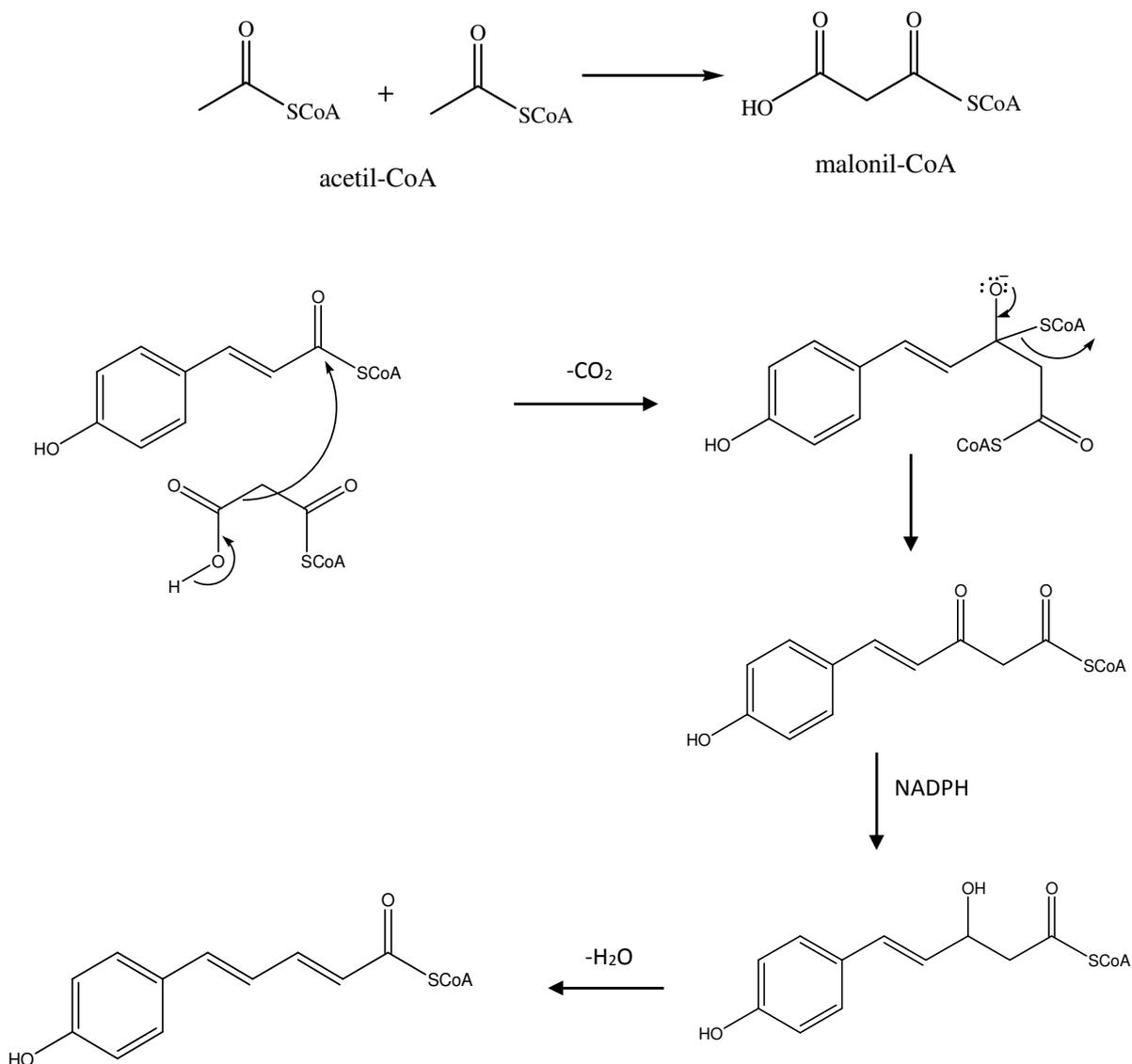
Figura 9: Proposta biossintética para os precursores fenilpropanoídico em *P. arboreum* (Dewick, 2009).



1.7.2 Extensão da cadeia lateral

A ativação dos derivados hidroxicinâmicos e acetato livre, pela ação das enzimas ligases e transferases, em seus derivados tioéster, se configura no substrato para biossíntese de uma diversidade de metabólitos secundários. À partir de uma unidade iniciadora, malonil-CoA, via enzima poliacetil sintase (PKSs), a cadeia é estendida. A enzima poliacetil sintase é responsável por catalisar as reações de hidrólise e descarboxilação (DEWICK, 2009) (Figura 10, p. 45).

Figura 10: Ativação dos derivados do ácido cinâmico em derivados tioéster (DEWICK, 2009).

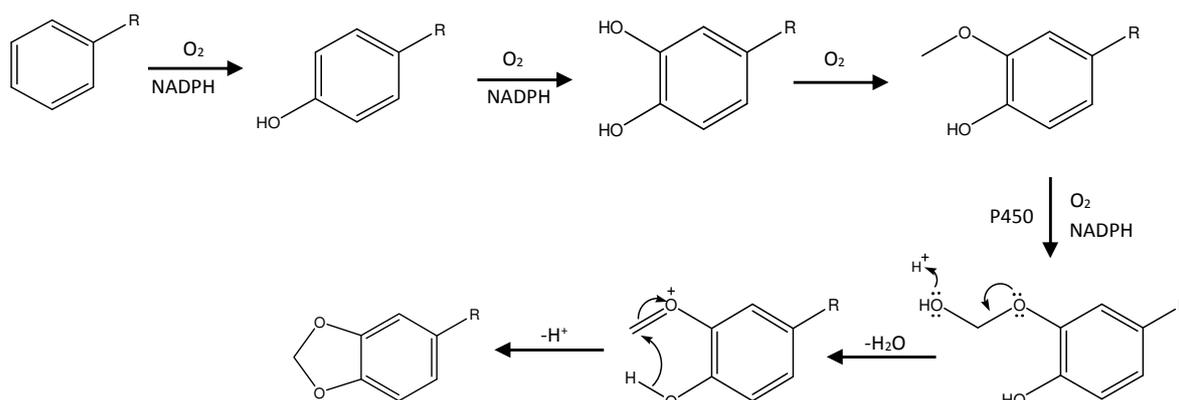


1.7.2 Formação do grupo metilendioxílico

O grupo metilendioxílico, muito comum na classe dos fenilpropanoides (C₆-C₃), resulta da interação entre um grupo metoxila e um grupo hidroxila vicinal. As enzimas que participam da formação do anel metilendioxílico são: a monoxigenase do tipo citocromo P450 e S-adenosilmetionina que utilizam NADPH e O₂ como cofatores (LOBO e LOURENÇO, 2007). Primeiramente, a enzima citocromo P450

hidroxila o metoxi formando um intermediário hemiacetal, posteriormente cicliza formando a ponte metilenodioxí (DEWICK, 2009) (Figura 11).

Figura 11: Formação do grupamento metilenodioxílico (DEWICK, 2009).

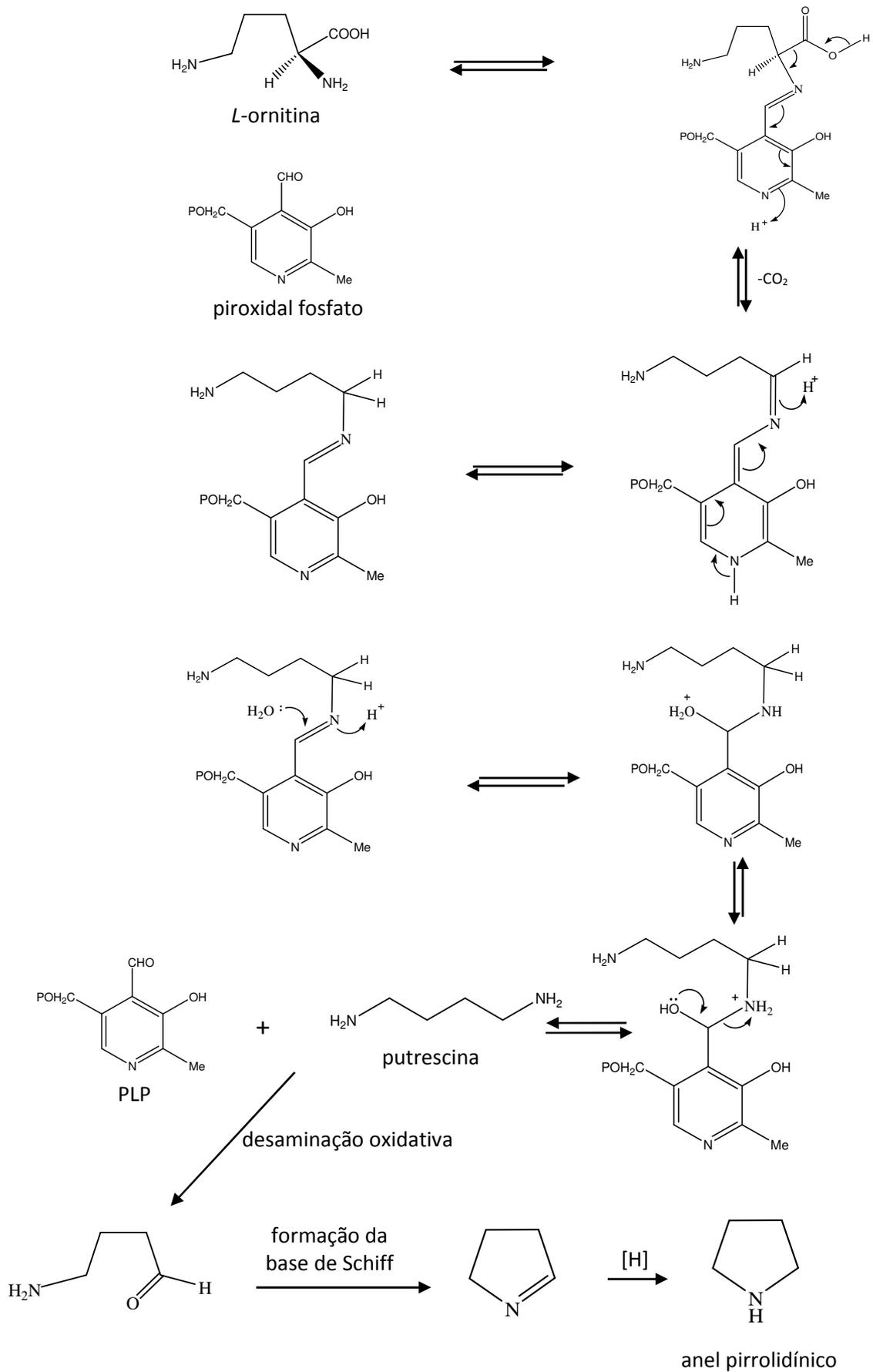


1.7.3 Formação do anel pirrolidínico.

A proposta de formação da porção amídica das amidas pirrolidínicas é baseada na formação do anel pirrolidínico a partir da ornitina e posterior condensação ao tioéster obtido após a extensão da cadeia lateral.

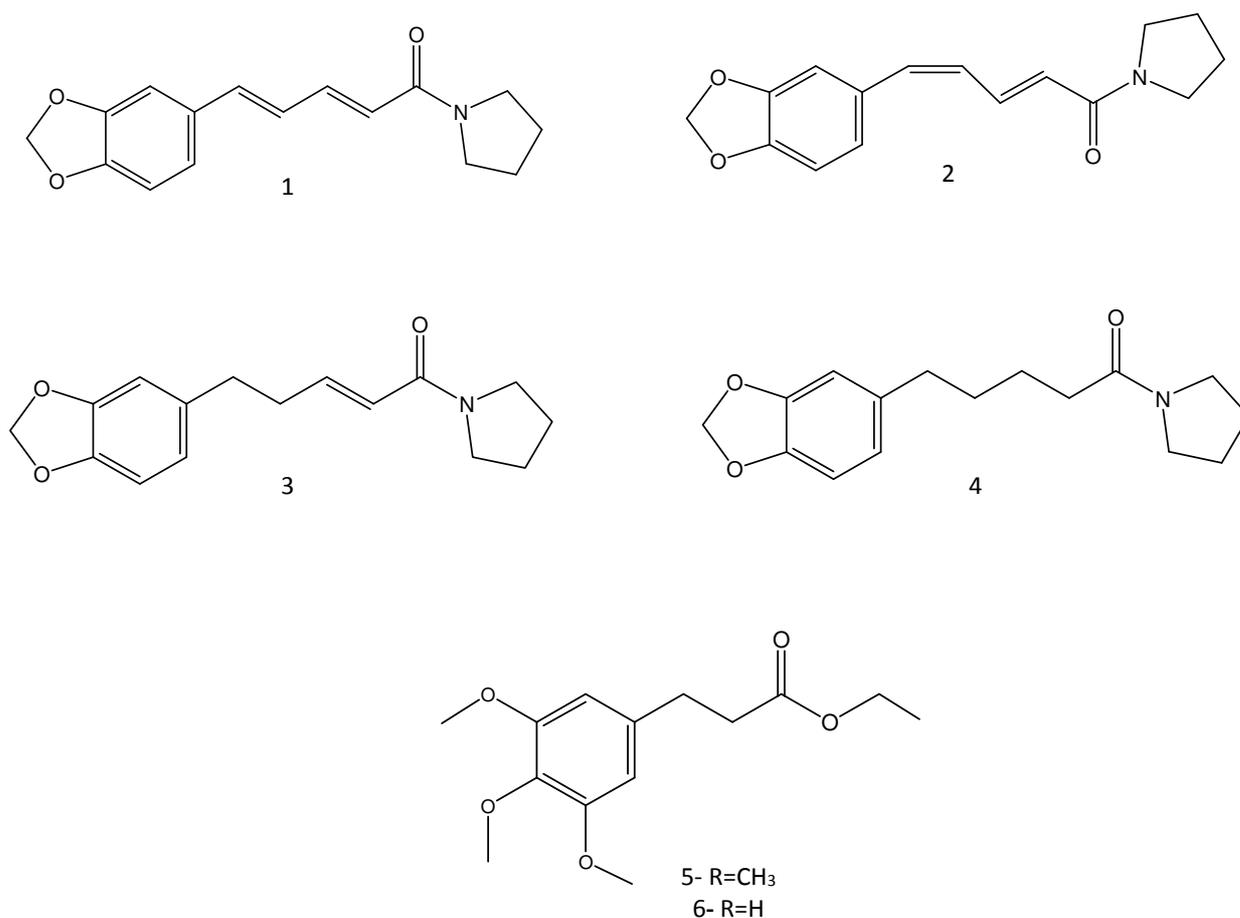
A formação do anel pirrolidínico a partir de ornitina é dependente de piridoxal fosfato (PLP), cofator de todas as aminotransferases. Para isso, a ornitina acopla com PLP, seguida da eliminação concertada de CO_2 com a captação de um próton. Posteriormente, ocorre a hidrólise da base de Schiff para formar putrescina e restabelecer o piridoxal fosfato (2). Em seguida, a putrescina sofre desaminação oxidativa para formar o aldeído. A partir do aldeído, ocorre a formação da base de Schiff, seguida de uma redução, que vai gerar o anel pirrolidínico (3) (Figura 12, p. 47).

Figura 12: Formação do anel pirrolidínico em *Piper arboreum*



Experimentos *in vivo* utilizando ácido malônico marcado com radioisótopo, e ornitina marcada com carbono quatorze (SILVA, 2004) confirmaram que o anel pirrolidínico presente nas amidas pirrolidínica tem origem na via ornitina **1 – 4** (Figura 13).

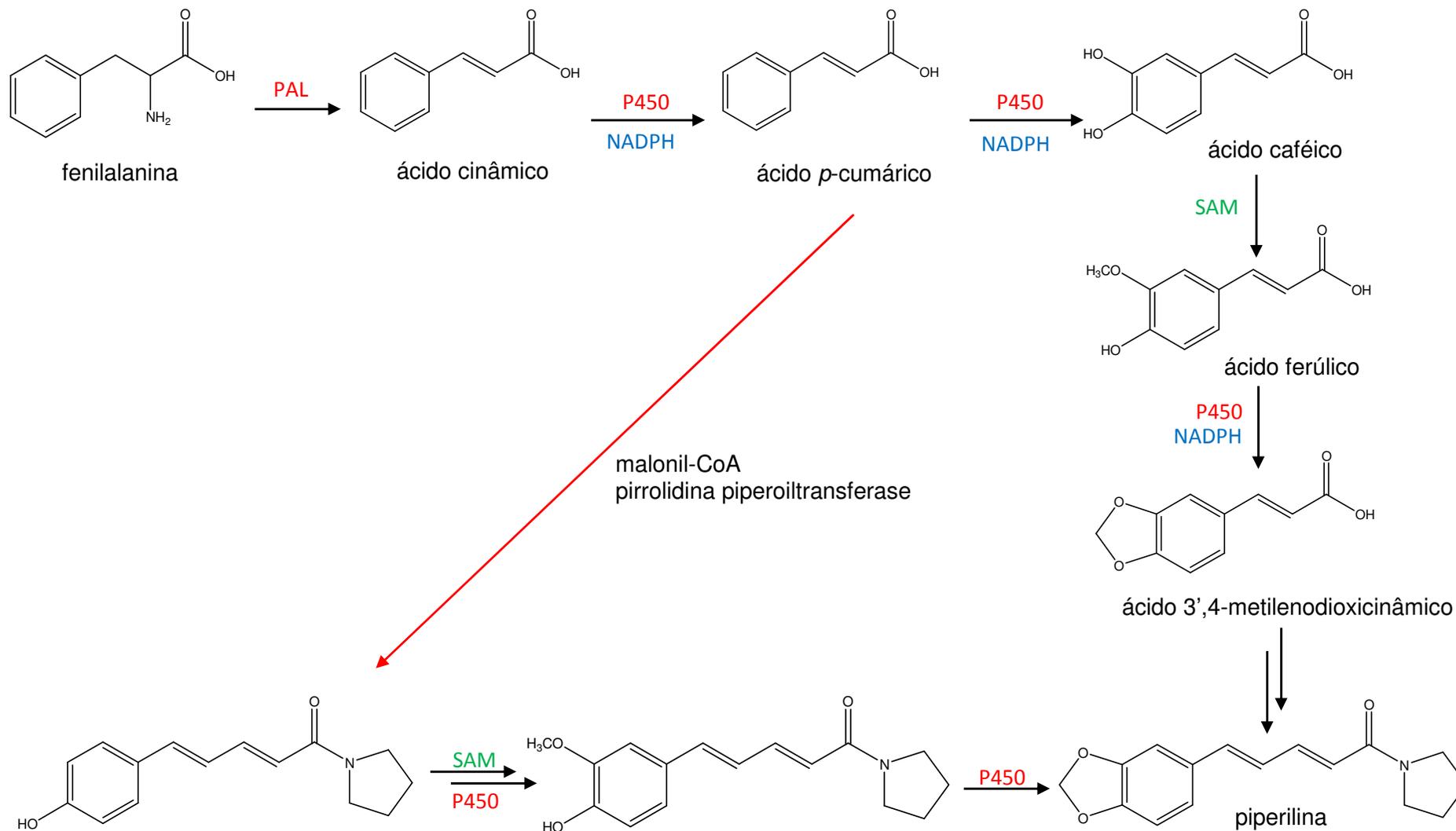
Figura 13: Estruturas químicas das amidas pirrolidínica e fenilpropanóides isolados de *Piper arboreum* Aublet (Piperaceae)



Fonte: SILVA et al., 2004.

Esses experimentos permitiram postular novas questões em relação à biossíntese das amidas, cruciais para o entendimento da sequência das reações envolvidas e consequente modulação enzimática das mesmas. A primeira questão está relacionada às etapas de oxidação do anel aromático, se acontecem na etapa anterior à condensação da unidade fenilpropanoídica e malonil-CoA, ou após. A mesma questão também permanece sem resposta em relação à condensação da ornitina. Todos esses aspectos serão fundamentais para determinar não somente a sequência de reações, mas também os sistemas enzimáticos envolvidos. A proposta biossintética de formação da piperilina está inserida na Figura 14, p. 50.

Figura 14: Proposta biossintética de formação da piperilina em *Piper arboreum*.



2 OBJETIVOS

- Determinar a sequência biossintética envolvida na formação da amida pirrolidínica pela administração de precursores marcados e avaliação dos produtos formados, por técnicas cromatográficas e espectrométricas;
- Caracterizar as enzimas envolvidas nas etapas biossintéticas da amida pirrolidínica por eletroforese (SDS-PAGE 1D e 2D);
- Avaliar a ação dos extratos e amidas pirrolidínicas em diferentes matrizes biológicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Solventes e equipamentos básicos

Para extração e análises das substâncias foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) das marcas Synth, Dinâmica, Vetec, água ultra-pura obtida no sistema Milli-Q Plus e solventes J. T. Baker para análises via CLAE. Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório (Buchi R-114), sob pressão reduzida. A dissolução dos extratos e frações foi realizada em banho de ultrassom (Unique), e as massas medidas em balança analítica (Kern 410 e Digimed KN5000L) ambas da Marconi. Para extração das enzimas foi utilizada centrífuga refrigerada e para armazenamento freezer – 80.

3.2 Cromatografia em camada delgada

As placas utilizadas para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram Alugram (Macherey-Nagel), 0.2 mm, sílica gel 60 com indicador fluorescente UV₂₅₄, tamanho 20x20 cm, que foram posteriormente recortadas no tamanho 5x5 cm.

Para revelação das substâncias as cromatoplasmas foram expostas a vapores de iodo, irradiação de luz ultravioleta em 254 e 366 nm em gabinete CAMAG, nebulização com anisaldeído sulfúrico e dragendorff. O aquecimento das cromatoplasmas borrifadas com reveladores foi realizado em estufa Gehaka G4023D à temperatura de 100°C por 5 min. Para cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 Mesh.

3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análise via CLAE foram utilizados os sistemas *Varian ProStar* (sistema ternário modelo 410 e detector *UV-Diodes Array* modelo 330) e *Shimadzu LC-10AD*, nos modos analíticos e preparativos (sistema binário com auto injetor *Shimadzu SIL-10A* e detector *UV-Diodes Array*). Foram utilizadas colunas *Phenomenex Gemini C18* analítica (250 mm x 4,60 mm, 5 µm); *Phenomenex Luna C18* analítica (250 mm x 4,60 mm, 5 µm); *Phenomenex Kinetex C18* analítica (250 mm x 4,60 mm, 5 µm) e *Phenomenex Luna* preparativa (250 mm x 21,20 mm, 10 µm). O *clean-up* das amostras para injeção em CLAE foi realizado utilizando cartuchos preenchidos com sílica de fase reversa (C18), seguido de filtração em membrana de *teflon* (0,20 µm) e as soluções das amostras foram acondicionadas em frascos de 2,0 mL.

3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros *Varian Inova*, operando nas frequências de 500 e 300 MHz para o núcleo de ^1H e de 125 e 75 MHz para o núcleo de ^{13}C , respectivamente. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras foram $\text{DMSO-}d_6$, CDCl_3 e CD_3OD , sendo utilizado TMS como referência interna.

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE-EM)

As análises por CLAE-EM foram realizadas em um cromatógrafo *Shimadzu CBM-20* com as seguintes especificações: detector de UV (*Shimadzu SPD-M20A*), bombas de alta pressão (*Shimadzu LC-20AD*), desgaseificador (*Shimadzu DGU-20A-5*) e bomba de infusão *Cole Parmer* acoplado ao Espectrômetro de Massas LCQ FLEET (Thermo Scientific®), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA).

A condição cromatográfica utilizada foi em gradiente de 60-100% MeOH em 60 minutos, coluna *Phenomenex C18-Luna* (250 x 4,6mm, 4µm) a temperatura ambiente, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL. As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 , MS^n) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap*. A faixa de aquisição foi de m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura

realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados de íons na faixa *m/z* estabelecida. O software *Xcalibur* (*Thermo Scientific*[®]) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

As análises por CLAE EM/EM foram realizadas em um cromatógrafo *Agilent* 1200 Series, *autosampler* 1200 Series, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200, e forno para coluna 1200 Series. A coluna utilizada foi Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm, e os solventes utilizados como fase móvel foram H₂O + 0.1% de ácido fórmico e metanol. O tempo de análise foi de 55 min, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna 40 °C.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas 3200 QTRAP (Quadrupolo-íon trap linear), AB SCIEX. Ionização por eletrospray (Turbo Íon Spray) modo positivo. Parâmetros da fonte de ionização no modo positivo: Íon Spray: 5500 V, Curtain gás:15 psi, temperatura: 550°C, gás 1: 45 psi, gás 2:40 psi, Interface heater: ON, DP (Declustering Potencial), 56.0 V, EP (Entrance Potencial) 4.5 V. Modo de varredura de íons: 150-550 Da. Energia de colisão: 25.0 V.

3.6 Eletroforese mono e bidimensional

A análise de eletroforese SDS-PAGE 1D foi realizada utilizando-se a cuba Hoefer Mighty Small Mini-vertical Units SE 260. Para eletroforese 2D foi utilizando o sistema o Multiphor II para a focalização das proteínas. As tiras de gradiente de pH imobilizados (IPG) foram comercialmente obtidas na forma desidratada (GE Healthcare) e reidratadas em bandeja específica (*DryStrip Reswelling*) Tray, antes de serem utilizadas. Na segunda dimensão foi utilizada uma cuba de eletroforese SE 600 *Ruby system*.

3.7 Material vegetal

Os frutos e as folhas da espécie *Piper arboreum* Aublet são materiais utilizados como fonte de enzimas e foram coletadas nas dependências do Instituto de Química, UNESP- Araraquara. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Guillermo E.D. Paredes da Universidade Pedro Ruiz Gallo (Peru). Uma exsicata (Cordeiro-1936) está depositada no Herbário do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Preparo, extração e análise das folhas e frutos de *Piper arboreum*.

O estudo fitoquímico das folhas e frutos da planta adulta de *Piper arboreum* foi realizado com o objetivo de isolar a piperilina, que foi utilizada como padrão cromatográfico nos experimentos de biossíntese.

Para verificação do acúmulo da piperilina, foram utilizadas folhas e frutos *in natura*, coletados nas dependências do Instituto de Química em Araraquara. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e extraído com acetato de etila, utilizando banho ultrassom. Em seguida o solvente da fração acetato de etila foi evaporado à pressão reduzida. Os extratos das folhas e frutos foram analisados em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando diferentes sistemas de eluição, com a finalidade de se observar a presença da amida de interesse. Para revelação das placas, foram utilizados reveladores como vapores de iodo, ninhidrina e Dragendorff.

Após verificação do acúmulo da amida por cromatografia planar, realizou-se análise por CLAE-UV-DAD, utilizando um gradiente exploratório com a finalidade de avaliar o perfil cromatográfico dos extratos das folhas e frutos. Para isto, fez-se uma extração em fase sólida (SPE), em cartuchos (Supelco®) de fase reversa (C18), ativados com 3,0 mL de MeOH e ambientados com 3,0 mL de MeOH 95%. Em seguida, as frações foram filtradas em discos de 0,2 µm de poro (Millipore®) e analisadas em CLAE-DAD, utilizando um gradiente 5-100% MeOH em 60 min., fluxo: 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção, 20,0 µL; λ = 254 nm; Coluna C18, Phenomenex-Kinetex (4,6 x 250 mm, 5 µm).

O pico de interesse (piperilina) nos extratos das folhas e frutos, foi analisado utilizando uma nova metodologia, que consistiu das seguintes condições: injeção da amostra: 20,0 µL, modo isocrático MeOH/H₂O, fluxo: 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm; Coluna C18, Phenomenex-Kinetex (4,6 x 250 mm, 5 µm).

A partir da otimização do método cromatográfico foram coletadas folhas e frutos com o intuito de obter maior massa do padrão. Esses materiais foram secos em estufa a 30 °C, triturados em moinho e extraídos por maceração em etanol. Foram feitas três extrações em aproximadamente sete dias. O extrato etanólico, depois de filtrado e solvente evaporado à pressão reduzida, foi colocado em capela de exaustão até que estivesse completamente seco. Posteriormente, o extrato etanólico das folhas foi

submetido a partição líquido-líquido e o extrato dos frutos, submetido a coluna cromatográfica utilizando-se como suporte gel 60 eluída com solvente Hex:AcOEt em gradiente de polaridade. A quantidade de material fresco, seco e extrato etanólico está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Massa dos extratos etanólicos de *Piper arboreum* Aublet.

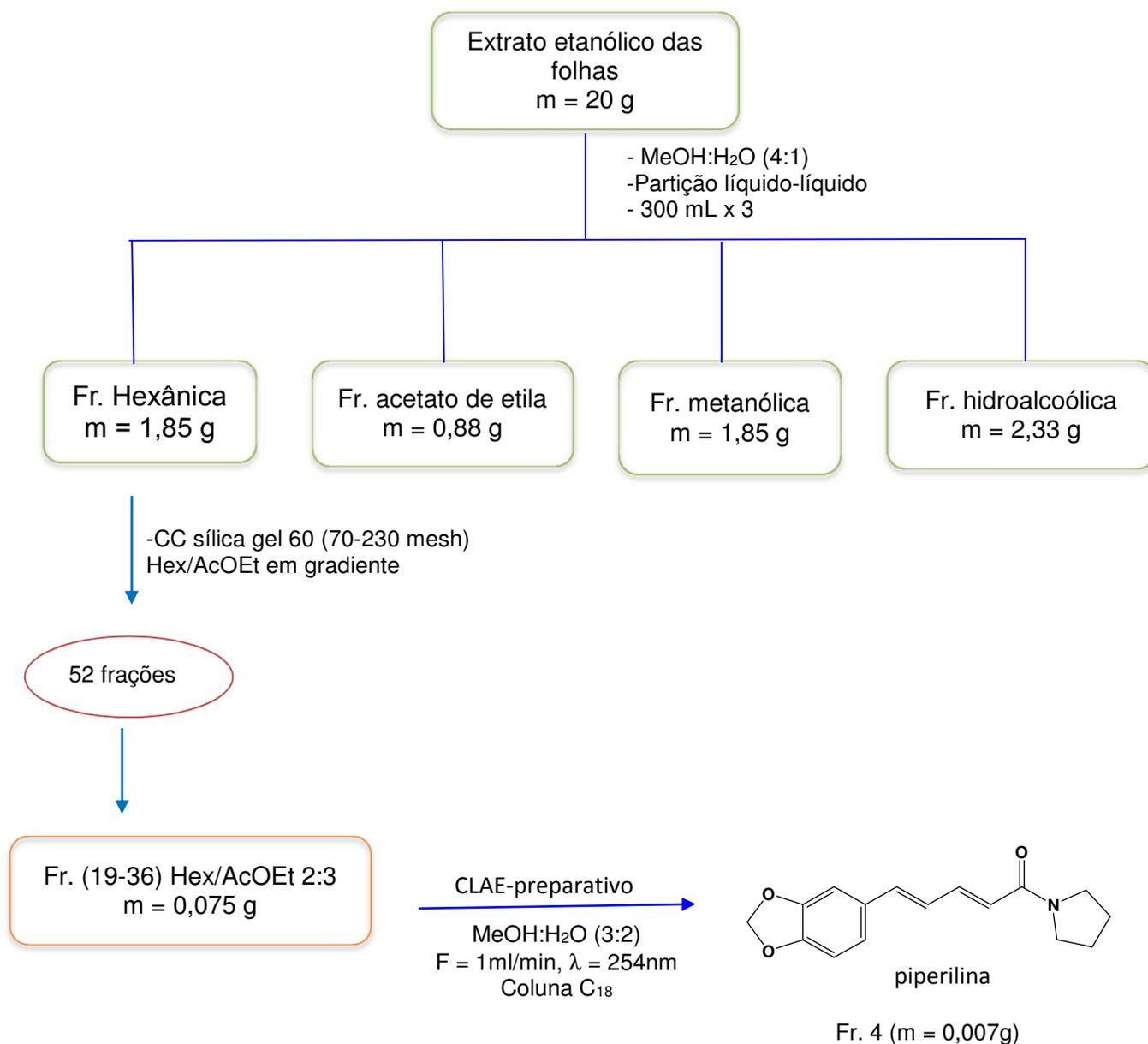
Parte da planta	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folha	3000,00	690,00	39,55	5,73
Fruto	250,00	35,00	4,11	11,74

Dos 39,55 g provenientes do extrato etanólico das folhas, 20,00 g foi então solubilizada em MeOH:H₂O (4:1) e submetida a uma partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila, metanol, hidroalcoólico. Foram obtidos 1,85 g de fração hexânica; 0,88 g de fração acetato de etila, 1,85 g de fração metanólica e 2,33 g de fração hidrometanólica. A fração hexânica (1,85 g) foi submetida a coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 mesh e sistema de solvente Hex:AcOEt em gradiente. Foram recolhidas 52 frações, sendo as frações 19-36, (m = 79,6 mg), provenientes do sistema Hex:AcOEt (2:3), reunidas por apresentarem o mesmo perfil quando analisadas em CCD. Esta fração foi submetida a CLAE-preparativo no modo isocrático (condições: coluna Phenomenex C₁₈, 10 µm (250 x 21,2 mm); eluente: MeOH:H₂O (3:2); fluxo: 10 mL.min⁻¹; tempo de análise: 60 min e λ = 254 nm). Foram coletadas 7 frações, as quais foram analisadas em CLAE-DAD modo analítico, sendo que a fração 4 (7,0 mg), apresentou-se pura quando analisada por CCD (Esquema 1, p. 56).

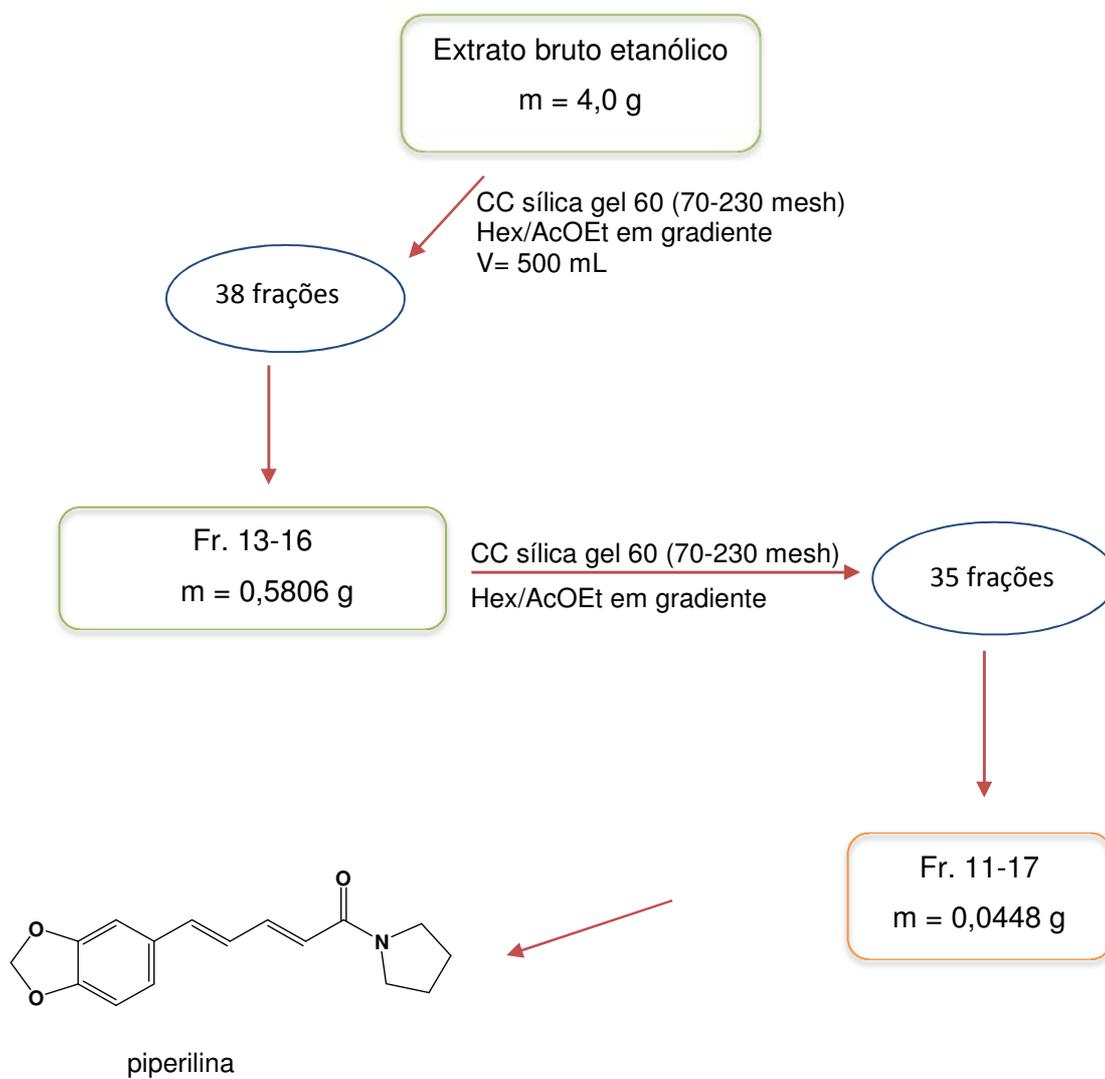
O extrato etanólico dos frutos (4,0 g), foi submetido à coluna cromatográfica, utilizando-se como suporte, sílica gel 60 mesh e eluente Hex:AcOEt em gradiente de polaridade. Foram preparadas duas colunas, na primeira, foram recolhidas 38 frações, que após análise por CCD, foi observada a presença da piperilina, porém, em mistura. Foi preparada então uma nova coluna com as frações 13-16 (0,5806 g), onde foram recolhidas 35 frações. Após análise em CCD, verificou-se uma única mancha que foi atribuída a amida, nas frações 11-17. Estas frações foram reunidas e após secagem apresentou massa de 0,0448 g (Esquema 2, p. 57).

A piperilina isolada das folhas e frutos de *P. arboreum* foi confirmada pelas análises de RMN e EM e comparação com dados da literatura (SILVA et al, 2002).

Esquema 1: Extração em etanol e partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *Piper .arboreum*.



Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos frutos de *Piper arboreum*.



4.2 Análise sazonal e circadiana da piperilina (1)

Os estudos de análise sazonal e circadiana foram realizados visando determinar a época do ano e o horário de maior produção da amida, piperilina (1). Esses dados são importantes para a extração enzimática e análise da biossíntese. Folhas de *P. arboreum* foram coletadas mensalmente nas dependências do Instituto de Química, em Araraquara, de janeiro a dezembro de 2013, sempre no período da manhã. A variação circadiana foi monitorada no mês de junho nos horários de 8, 11, 14, 17, 20, 23, 2 e 5 h. Os dados de temperatura e precipitação foram obtidos do Instituto de Pesquisa Meteorológica de Bauru – SP.

Amostras contendo aproximadamente 2,0 g de material vegetal foram trituradas em nitrogênio líquido, e extraídas em banho de ultrassom por 20 min., utilizando-se como solvente acetato de etila (200 mL). Depois de filtrado o solvente foi evaporado à pressão reduzida. Os extratos (10 mg) foram solubilizados em 3 mL de MeOH/H₂O 4:1, e submetidos a um *clean up* em cartucho de extração em fase sólida (SPE).

Para análise em CLAE foram utilizadas amostras com concentração de 1 mg.mL⁻¹, filtradas em membrana de *teflon* (0,2 µm) e acondicionadas em frascos do auto-injetor do sistema CLAE-DAD, utilizando-se as seguintes condições: injeção da amostra: 20,0 µL, modo gradiente MeOH/H₂O (3:2), fluxo: 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm; Coluna C18, Phenomenex-Kinetex (4,6 x 250 mm e partículas de 5 µm). O tempo e porcentagem de MeOH estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Gradiente de eluição utilizados para as análises por CLAE

Tempo (min)	Porcentagem de B
0,01	60
15	70
25	85
37	100
42	100
45	60
55	60

Para quantificar a piperilina nos extratos, foi preparada uma curva de calibração utilizando uma solução de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do padrão (piperilina). A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas em solução MeOH/H₂O 4:1, obtendo-se soluções nas concentrações de 300, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As análises cromatográficas foram feitas em triplicata utilizando as condições descritas anteriormente para as demais amostras. A linearidade foi avaliada nos meses de janeiro à dezembro e durante 24 h, estimada pela análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se a concentração da amida em cada mês (análise sazonal) e durante um dia (análise circadiana). Para tanto, utilizou-se as áreas dos picos cromatográficos referentes a amida presente na amostra. A equação obtida na curva de calibração foi $y = 202411x - 791903$.

4.3 Estudos biossintéticos

Para a realização do experimento de incorporação (Figura 15) foram utilizadas folhas da plantas adultas de *P. arboreum*, coletadas no período da manhã nas dependências do Instituto de Química. Em cada folha foi realizado um corte transversal no pecíolo e colocadas em um eppendorf contendo 200 μL de uma solução de $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}/\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). O experimento foi realizado em triplicata e mantido por 8, 24, 48 e 72 h., adicionando-se água sempre que necessário para manter o sistema hidratado.

Figura 15: Incorporação de acetato de sódio marcado em folhas adultas de *Piper arboreum*.

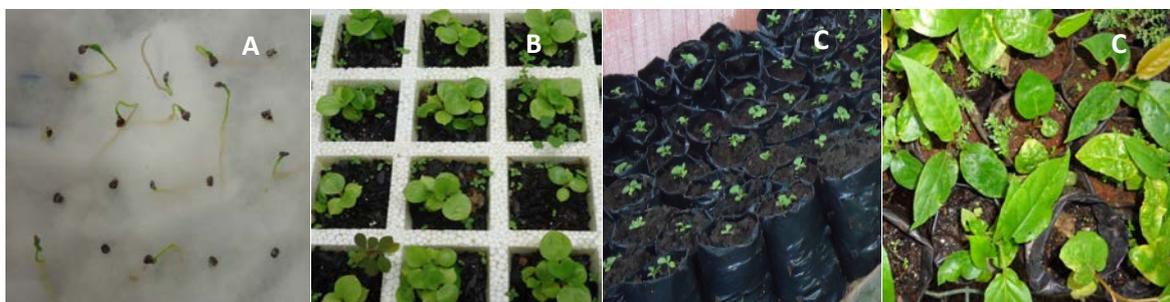


Fonte: Arquivo pessoal.

Após o tempo previamente estabelecido, as folhas foram maceradas em N₂ líquido, extraídas com acetato de etila utilizando banho de ultrassom (20 min.), em seguida o solvente foi filtrado e concentrado. Depois de seco em capela, os extratos foram submetidos a clean-up utilizando cartucho de C18 e analisado por CLAE-analítico. A piperilina foi isolada por CLAE-preparativo, e analisada por massas, não apresentando a incorporação de acetato marcado para esta análise. Desta forma, um novo experimento foi montado, seguindo o protocolo anterior. O extrato obtido desta análise, (66,7 mg) foi submetido à coluna cromatográfica de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando como eluentes hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade. Foram recolhidas 64 frações, sendo reunidas as frações 35-45, por apresentarem o mesmo perfil quando analisadas em CCD. Depois de seca em capela de exaustão, a amostra (5,3 mg) foi analisada por RMN e EM, confirmando a estrutura da piperilina, bem como a sua incorporação com acetato marcado.

Em outro momento, foi realizado um experimento com a planta na fase jovem. Para isso sementes de *P. arboreum* foram coletadas nas dependências do Instituto de Química e colocadas em placa de Petri para verificar a viabilidade das sementes. Observou-se que as sementes estavam viáveis com 60% de germinação. Após a germinação, foi feita a semeadura em bandeja de isopor apropriada para produção de mudas e, posteriormente, transferidas para saquinhos apropriados (Figura 16). Mensalmente foram coletadas folhas e raízes das mudas e submetidas a análise em CLAE-DAD para verificação do acúmulo da amida por um período de 8 meses.

Figura 16: Exemplar de *Piper arboreum*: teste de germinação (A), semeadura em células (B) e mudas em saquinhos (C).



Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.4.1 Obtenção do extrato enzimático

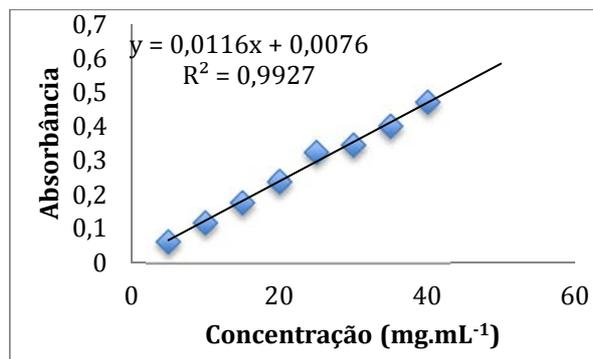
As folhas e frutos de *P. arboreum*, utilizadas para análise de eletroforese em gel de poliacrilamida, foram coletadas nas dependências do Instituto de Química-UNESP - Araraquara. Para a extração enzimática foram utilizadas três soluções tampão: acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8; fosfato de sódio 0,1 M, pH = 7,0 e borato de sódio, 0,1 M, pH = 8,8. A solução extratora foi preparada a partir de 30 mL de tampão contendo polivinilpirrolidona (PVPP 20%), ditioneitol (DTT 10 mM), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 1 mM). Esta solução foi adicionada ao material vegetal (m = 6 g) previamente triturado em presença de nitrogênio líquido. A solução foi agitada em banho de gelo por aproximadamente 15 min e, após completa homogeneização, filtrada em gaze. O material foi transferido para um frasco apropriado, centrifugado por 10 min a 10.000 rpm, e temperatura de 4 °C. O sobrenadante contendo o extrato enzimático foi utilizado como fonte de enzimas.

4.4.2 Dosagem protéica – Ensaio de Bradford modificado

A determinação da concentração de proteína total das folhas jovens, adultas e frutos (Tabela 5, p. 62) foi realizada utilizando o método de Bradford modificado. O reagente foi preparado utilizando 500 mL de HCl 0,6 M pela adição de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 suficiente para alcançar um valor de 1,3-1,5 unidades de absorvância em 465 nm (branco de H₂O). Para a construção da curva de calibração foram preparadas diluições sucessivas, partindo de uma solução padrão de albumina bovina comercial contendo 1 mg.mL⁻¹. Desta forma, foram avaliadas soluções de 1,00; 0,50; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031 e 0,016 mg.mL⁻¹.

Em cubetas de poliestireno foram adicionados 50 µL destas soluções, e misturados com 1 mL de H₂O deionizada e 1 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização por inversão, e transcorridos 5 min. de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a absorvância em 595 nm. A calibração do valor 0 foi realizada com a mistura do reagente de Bradford e H₂O. A curva de calibração apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,9927$) como demonstrado na Figura 17, p.62).

Figura 17: Curva de calibração utilizando albumina como padrão protéico.

Tabela 5: Concentração proteica dos extratos enzimáticos das folhas e frutos de *Piper arboreum*.

Fração Solúvel	Concentração mg.mL ⁻¹
Folha jovem	0,4690
Folha adulta (11 h)	0,3110
Folha adulta (23 h)	0,3235
Fruto	0,3127

4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.4.3.1. Soluções e reagentes necessários

- Tampão de Separação (pH 8,8)

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

- Tampão de Concentração (pH 6,8)

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

- Solução Acrilamida-Bisacrilamida

acrilamida	30% p/v
bisacrilamida	0,8% p/v

- Bisacrilamida 2% p/v

5. Solução tampão de corrida (pH 8,3)

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

- Loading buffer

Reagente	Quantidade
TRIS	0,83 mL (1,5 M - pH 6,8)
glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
azul de Bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	Completado com 10 mL

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

4.4.4 Preparo das amostras e dos padrões

Após a determinação da concentração protéica nas folhas e frutos, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida. Inicialmente, as frações foram diluídas para uma concentração próxima a 1 mg.mL⁻¹. As amostras foram preparadas misturando-se 20 µL destas com 10 µL de solução tampão de corrida (*loading buffer*) e aquecidas a 100 °C, durante 5 min. Estas soluções foram então centrifugadas a 9.000 rpm por 30 s e aplicadas ao gel. Como padrão foi utilizado 5 µL de uma solução de soro albumina bovina (Tabela 6, p. 64). A esta solução foram adicionados 25 µL de H₂O deionizada e 10 µL de *loading buffer*. Os mesmos

procedimentos de aquecimento e centrifugação descritos para as amostras foram realizados para a solução padrão. O volume de cada aplicação no gel foi de 5 μL para as amostras e de 10 μL (eletroforese 1D) e 10 μL (eletroforese 2D) para os padrões.

Tabela 6: Padrão protéico de soro de albumina bovina, utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (KDa).

Enzima	MM (KDa)
Fosforilase	97,0
Albumina sérica	66,0
Ovalbumina	45,0
Anidrase carbônica	30,0
Inibidora de tripsina	20,1
α -lactalbumina	14,4

4.4.5 Preparo, desenvolvimento e revelação do gel

Foram utilizados dois tipos de géis, o gel de concentração e o gel de separação. As proporções dos reagentes necessários para a preparação do gel estão listadas a seguir.

1 - Gel de separação

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

* Preparou-se no momento da utilização.

2 - Gel de concentração

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

* Preparou-se no momento da utilização.

Cada gel foi transferido para a cuba de eletroforese 1D e foi adicionado o volume necessário da solução tampão de corrida, sendo aplicada uma intensidade de corrente de 40 mA (20 mA para cada gel). A voltagem utilizada foi de 300 V constante até o final da corrida, o qual foi verificado quando a linha de frente do corante (azul de bromofenol, para o caso de migração anódica, polo positivo) atingiu quase o final do gel de separação (tempo estimado de 2 hora e 30 min). Posteriormente, o gel foi retirado da cuba eletroforética e iniciou-se o processo de revelação com nitrato de prata (AgNO₃).

Para revelação o gel foi colocado em uma solução de 10% de ácido tricloroacético (etapa de fixação), na qual permaneceu por 60 min sob agitação. Esta solução foi então descartada e o gel lavado três vezes com água destilada (etapa de lavagem) permanecendo sob agitação por aproximadamente 30 min. A solução foi então descartada e adicionou-se uma solução de DTT (0,5 M), na qual o gel ficou sob agitação por mais 30 min (etapa de redução).

Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionou-se uma solução 0,1% de nitrato de prata, a qual foi descartada após 30 min. Em seguida, foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 3%, contendo 0,085% de formaldeído (etapa de revelação), sendo que após 10-30s esta solução foi descartada, adicionando-se outra vez a mesma solução.

Após o aparecimento das bandas relativas às proteínas, a reação foi finalizada adicionando-se uma solução 2,3 M de ácido cítrico (etapa de interrupção) até não se observar mais o desprendimento de CO₂. A solução foi descartada, o gel lavado com

água destilada por três vezes, e posteriormente digitalizado no equipamento *Image Scanner*.

4.4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (2D SDS-PAGE)

Para a análise por eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE), as proteínas foram submetidas a dois processos consecutivos (duas dimensões) de separação, baseados nas diferentes propriedades das proteínas. Desta forma, na primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas em um gel poliacrilamida, que forma um gradiente de pH, e migram até atingirem uma posição estacionária onde possuam carga líquida zero (ponto isoeletrico). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel poliacrilamida, que separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares.

4.4.6.1 Soluções

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

Reagentes	Concentração	Quantidade
uréia	7 M	10,5 g
tiouréia	2 M	3,8 g
CHAPS	2% (m/v)	0,5 g
azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	50 µL
H ₂ O deionizada		para 25 mL

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

Reagente	Concentração	Quantidade
TRIS-HCl, pH 8,8 (solução E)	50 mM	10 mL
uréia	6 M	72,07 g
glicerol (87 v/v)	30% (v/v)	69 mL
SDS	2% (m/v)	4,0 g
azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	400 µL
H ₂ O deionizada		para 200 mL

C. Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida

Reagente	Concentração	Quantidade
acrilamida	30% (m/v)	60 g
bisacrilamida	0,8% (m/v)	1,6 g
H ₂ O deionizada		para 200 mL

D. Tampão de resolução

Reagente	Concentração	Quantidade
TRIS	1,5 M	181,7 g
H ₂ O deionizada		750 mL
HCl		Ajustar o pH para 8,8
H ₂ O deionizada		para 1 L

E. Tampão de corrida

Reagente	Concentração	Quantidade
TRIS	25 mM	30,3 g
glicina	192 mM	144 g
SDS	0,1%	10 g
H ₂ O deionizada		para 10 L

F. Solução estoque de bromofenol

Reagente	Concentração	Quantidade
azul de bromofenol	1%	100 mg
tris-base	50 mM	60 mg
H ₂ O deionizada	0,002% (m/v)	para 10 mL

G. Solução 10% SDS

Reagente	Concentração	Quantidade
SDS	10% (m/v)	0,1 g
H ₂ O deionizada		para 1 mL

H. Solução de persulfato de amônio 10%

Reagente	Concentração	Quantidade
persulfato amônio	10% (m/v)	0,1 g
H ₂ O deionizada		para 1 mL

I. Solução de agarose

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

4.4.6.2 Limpeza das amostras

A limpeza das amostras foi realizada utilizando o kit 2-D *clean-up* da Amersham Biosciences. Este procedimento envolve a combinação de agentes precipitantes que eliminam os interferentes, tais como sais e ácidos nucleicos, que prejudicam a resolução dos géis.

Em tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, transferiu 1-100 µl de uma solução contendo 300 µg de proteína e 300 µL da solução precipitante. A amostra foi mantida sob a agitação em vortex e banho de gelo. Adicionou-se 300 µL da solução co-precipitante e aguardou-se 15 min.

A mistura foi centrifugada por 10 min. a 5.000 x g. Após, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi centrifugado. Em seguida, adicionou-se 40 µL da solução e centrifugou-se a 5.000 xg por 5 min. Descartou-se o sobrenadante.

Adicionou-se 25 µL de água deionizada ao precipitado e agitou-se em vortex até dispersar o precipitado (5-10s). Adicionou-se 1 mL de Tampão de Lavagem

(resfriado a -20°C por pelo menos 1h, prévio ao uso) e 5 μL de Aditivo de Lavagem. Agitou-se o tubo em vortex durante 20-30s. Em seguida centrifugou-se a $10.000 \times g$ por 10 min. Descartou-se o sobrenadante.

Depois de seco, o precipitado foi ressuspenso em 248,75 μL em tampão de reidratação, (acrescida de 2,8 mg de DTT para cada 1 mL de tampão de reidratação) e 1,25 μL de Pharmalyte (3-10), perfazendo um volume total de 250 μL . Este foi submetido a agitação em vórtex e as partículas insolúveis foram removidas por centrifugação a 13.000 RPM por 10 min.

4.4.6.3 Reidratação das tiras de IPG (*Immobilized pH Gradient*)

Após os procedimentos de *clean-up* das amostras, efetuou-se a separação eletroforética. Primeiramente, as proteínas foram separadas pelo ponto isoelétrico em fitas de IPG de 13 cm, com pH variando entre 3 e 10, as quais foram reidratadas na bandeja de *DryStrip Reswelling Tray* com 248,75 μL de tampão de reidratação e 1,25 μL de Pharmalyte (3-10), perfazendo um volume de 250 μL . Em seguida, as fitas foram colocadas em contato com as amostras e cobertas com óleo mineral.

O período de reidratação foi de 14-20 h à temperatura ambiente. Após a reidratação, as tiras foram transferidas ao equipamento de focalização isoelétrica Ettan™ IPGphor II.

4.4.6.4 Primeira dimensão: focalização isoelétrica

As tiras foram colocadas no *Strip Holder* conforme especificado pelo fabricante. A focalização foi realizada a 20°C sendo aplicados 50 μA por tira. O gradiente utilizado está descrito na Tabela 7, p. 70. Depois de focalizadas, as tiras foram armazenadas a -80°C até serem submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE.

Tabela 7: Protocolo de focalização isoelétrica.

Etapa	Voltagem (V)	Volts-hora	Tempo (h)
1	100	100	4
2	500	500	
3	1000	1000	
4	5000	5000	
5	*8000 KV		Variável (4-6)
6	100		16

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

4.4.7 Segunda dimensão: SDS-PAGE

4.4.7.1 Preparo do gel de poliacrilamida 12,5%

Para aplicar tiras de IPG de 13 cm de comprimento, foram preparados géis em placas de 18x16 cm com espaçadores de 1,5 mm de espessura e 1 cm de largura. Estes géis foram preparados pela adição dos reagentes (Tabela 8).

Tabela 8: Reagentes necessários para preparar 100 mL de gel poliacrilamida 12,5%

Reagente	Volume (mL)
Solução de acrilamida/bisacrilamida	41,7
Tampão de resolução	25,0
Solução SDS 10%	1,0
H ₂ O deionizada	31,8
persulfato de amônio 10%	0,5
TEMED	0,033

Para favorecer a polimerização rápida, os primeiros quatro reagentes foram misturados e desaerados em ultrassom. Após essa etapa, foram adicionados persulfato de amônio e TEMED. A solução foi mantida em agitação por alguns minutos antes da aplicação.

4.4.7.2 Equilíbrio das tiras

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

As tiras foram colocadas em um tubo contendo 5 mL de tampão de equilíbrio e 50 mg de DTT, mantidas sob agitação por 15 min. Essa solução foi descartada e substituída por 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 125 mg de iodoacetamida, mantida por 15 min, sob agitação.

4.4.7.3 Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE

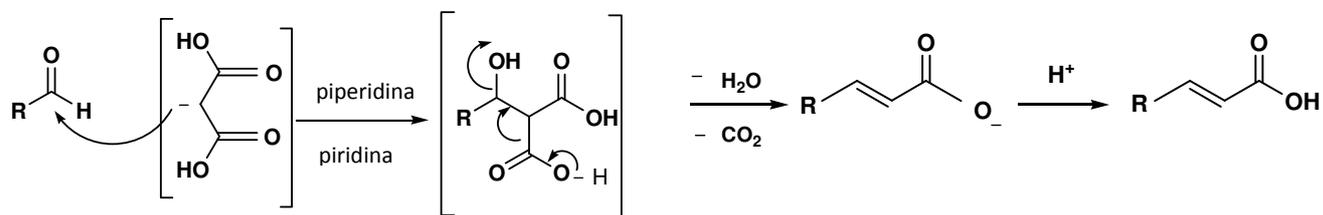
Após equilíbrio das tiras e antes de serem aplicadas no gel, as fitas foram lavadas em tampão de corrida (uma vez) para retirar o excesso da solução de equilíbrio. Posteriormente foram aplicados 10 µL da solução estoque dos padrões de peso molecular em papel absorvente, o qual foi colocado à esquerda do gel, próximo ao extremo ácido da tira. Em seguida, o gel foi selado com solução de agarose contendo 100 mL de tampão de corrida.

O gel foi colocado na cuba de eletroforese (SE 600 Ruby system) refrigerada a 10-12°C, previamente preenchida com 4 litros de tampão de corrida, e submetido a uma corrente inicial de 45 mA, a 4°C, por aproximadamente 2h30min, com voltagem máxima em 600 V. A corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol migrou até 0,5 cm da parte inferior do gel.

4.5 Síntese de precursores biossintéticos

A síntese do ácido cinâmico e ferúlico foi realizada através da reação de Knoevenagel, que envolve a condensação do ácido malônico com aldeídos na presença de aminas primárias e secundárias como base. No grupo metileno ativado, o ânion formado ataca o centro eletrofílico do aldeído piperonal e da vanilina, tendo como resultado uma reação de eliminação e a formação de um alceno com configuração E (Figura 18, p.72).

Figura 18: Proposta de mecanismo para reação de Knoevenagel (CUNHA e SANTANA, 2012).



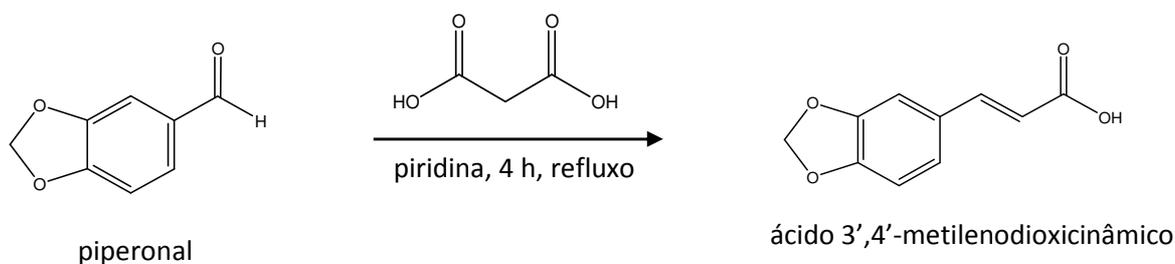
4.5.1 Síntese do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico

Para a síntese do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico (Figura 19) foi utilizado um balão de 50 mL onde foram adicionados 50 mg (0,33 mmol) de aldeído piperonal e 12,4 mL de piridina, deixados sob agitação até completa dissolução do aldeído. Posteriormente, adicionou-se 75 mg (0,72 mmol) de ácido malônico e três gotas de piperidina. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 4 h, sendo a reação monitorada em cromatoplaca.

A reação foi finalizada com a adição de 3,0 mL de gelo e 3,0 mL de HCl concentrado, formando um precipitado marrom. O sistema foi resfriado a temperatura ambiente, levado ao banho de gelo, e então submetido à filtração a vácuo.

O precipitado foi lavado três vezes com 7 mL de etanol absoluto e em seguida, seco por 4 h em dessecador. O material depois de seco apresentou massa de 0,0058 g, com rendimento de 9,15 %. A amostra foi solubilizado em solvente deuterado e enviado para obtenção dos dados de RMN ^1H e RMN de ^{13}C .

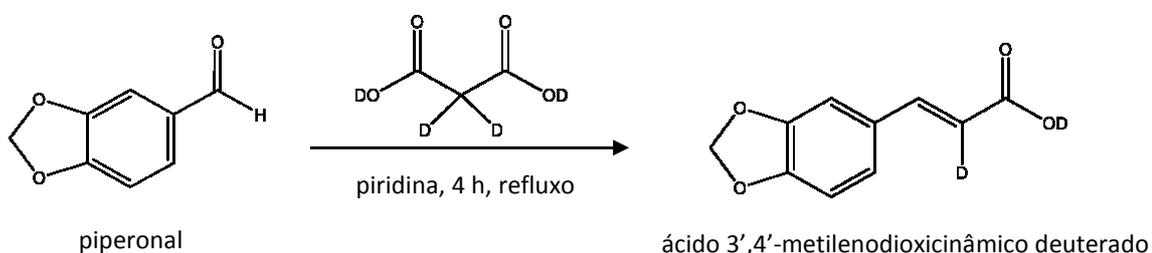
Figura 19: Reação de condensação de Knoevenagel do aldeído piperonal com o ácido malônico, e a formação do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico.



4.5.2 Síntese do ácido 3',4'-metilenodióxycinâmico marcado com deutério

Para a síntese do 3',4'-metilenodióxycinâmico marcado (Figura 20), foi utilizada a mesma quantidade dos reagentes como descrito anteriormente para o ácido cinâmico não marcado, substituindo apenas o ácido malônico, pelo equivalente deuterado. Após secagem e purificação em coluna de sílica gel 60, o material apresentou massa de 1,8 g, com rendimento de 2,81% foi encaminhado para análise por RMN de ^1H .

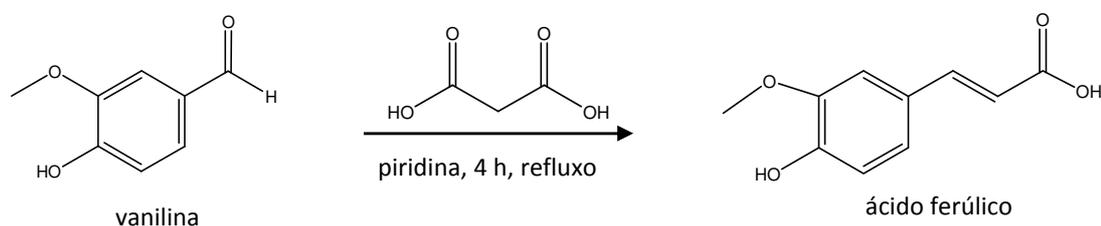
Figura 20: Reação de condensação de Knoevenagel do aldeído piperonal com o ácido malônico, e a formação do ácido 3',4'-metilenodióxycinâmico marcado.



4.5.3 Síntese do ácido ferúlico

Para síntese do ácido ferúlico (Figura 21) foram adicionados em um balão de 50 mL, 100 mg (0,65 mmol) de vanilina e 3 mL de piridina. Após a dissolução total do aldeído foram adicionados 150 mg (1,44 mmol) de ácido malônico e três gotas de piperidina. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 4 h, a reação foi acompanhada por CCD. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foi adicionado 15 mL de água destilada e HCl, até pH 3. O produto precipitou na forma de cristais amarelados. Os cristais foram três vezes lavados com 10 mL de água, submetidos a filtração a pressão reduzida e seco em dessecador. Depois de seco e pesado (17 mg), foi calculado o rendimento (27,10%). O produto foi enviado para análise por RMN ^1H e RMN de ^{13}C .

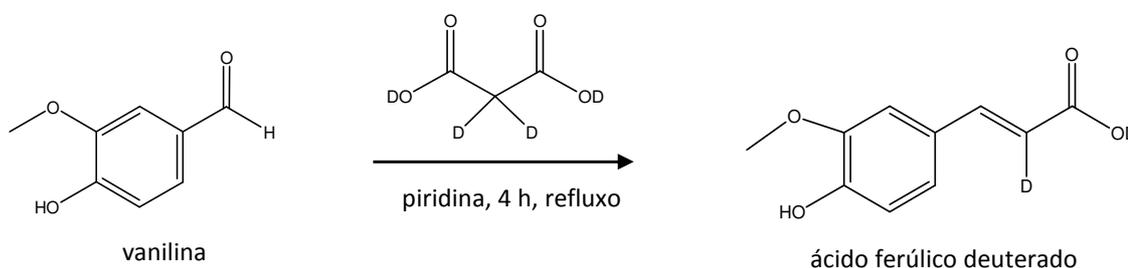
Figura 21: Reação de condensação de Knoevenagel da vanilina com ácido malônico.



4.5.4 Síntese do ácido ferúlico marcado com deutério

Para a síntese do ácido ferúlico marcado (Figura 22), foi utilizada a mesma quantidade dos reagentes como descrito para o ácido ferúlico não marcado, substituindo apenas o ácido malônico, pelo equivalente deuterado. Após secagem e purificação em coluna de sílica gel 60, o material apresentou massa de 24 mg, com rendimento de 38,26%. O produto foi submetido a análise por RMN de ^1H .

Figura 22: Reação de condensação de Knoevengal da vanilina com ácido malônico deuterado.

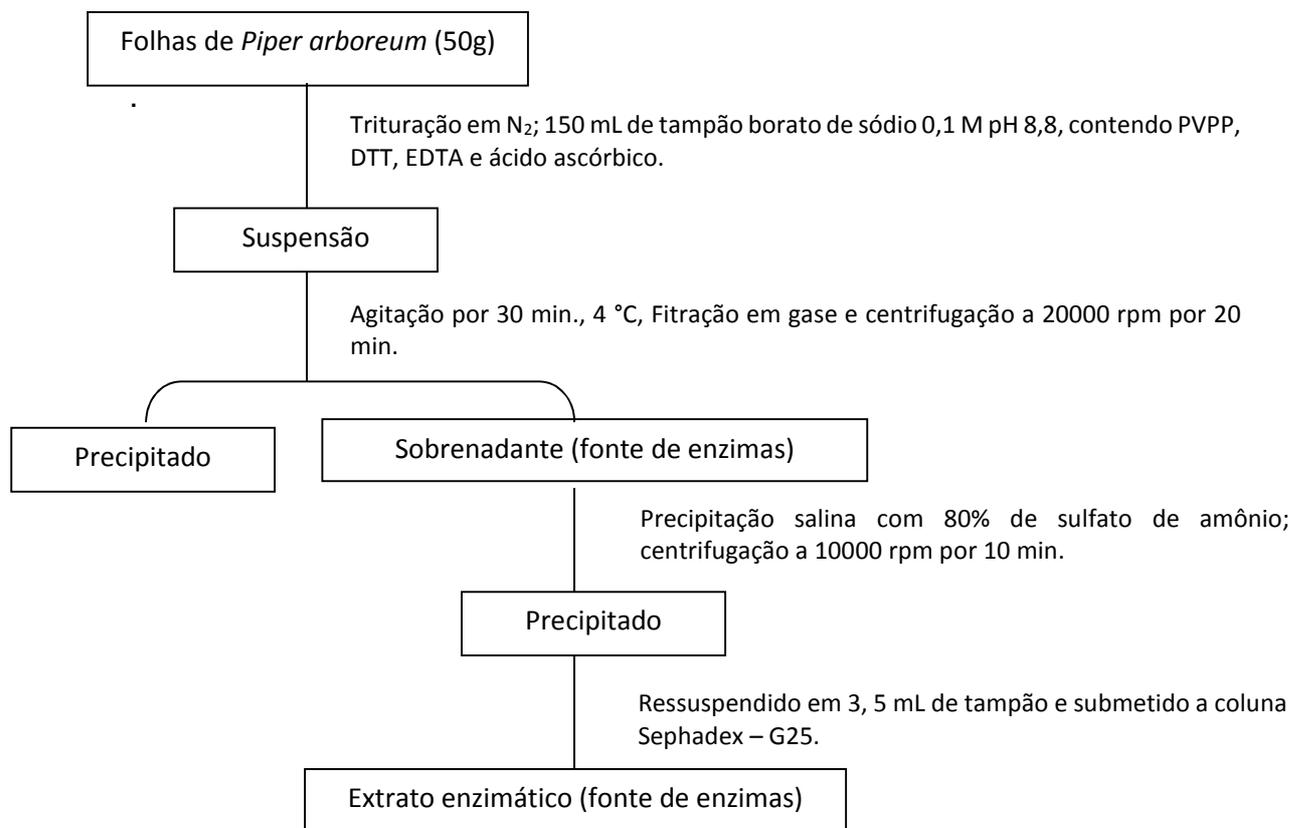


4.6 Reações enzimáticas

As folhas da planta adulta de *P. arboreum* (50g) foram coletadas nas dependências do Instituto de Química, Unesp-Araraquara, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e trituradas utilizando gral e pistilo.

Foram adicionados 150 mL de solução tampão borato de sódio 0,1M pH 8,8 contendo 20% do PVPP, 1 mM EDTA e 10 mM DTT e 2mM de ácido ascórbico. A suspensão obtida foi agitada suavemente por 30 min. em banho de gelo com auxílio de um agitador magnético, filtrada em gaze, e centrifugada a 20000 rpm g por 20 min à 4 °C.

O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante submetido a precipitação salina com sulfato de amônio até 80% de saturação para concentração das proteínas solúveis do extrato. O material foi novamente centrifugado a 13000 rpm, por 10 min à 4 °C. O precipitado resultante da centrifugação foi ressuscitado em 3,5 mL de tampão borato de sódio (0,1 M; pH 8,8) e submetido a uma coluna de Sephadex G-25 para dessalinização e retirada de substâncias endógenas (Esquema 3, p. 75).

Esquema 3: Extração enzimática das folhas de *Piper arboreum*.

O extrato enzimático dos frutos foi obtido seguindo o mesmo protocolo utilizado para as folhas (esquema 3), porém utilizando menor quantidade de material (6 g) e conseqüentemente um menor volume de solução extratora (25 mL).

A quantificação dos extratos enzimáticos das folhas e frutos foi realizada por meio do espectrofotômetro de UV utilizando o método de Bradford ($\lambda = 595 \text{ nm}$). Após a quantificação, os extratos foram submetidos a reação enzimática adicionando-se os reagentes descritos na Tabela 9, p. 76.

Tabela 9: Quantidade de reagentes utilizados para reação enzimática.

Planta adulta	Tampão borato de sódio	ácido ferúlico	ácido cinâmico	MgCl ₂	ácido malônico	Ornitina	NADH	ATP	CoA	Extrato enzimático	Reação
Folhas (0,9407 mg.mL ⁻¹)	410 µL	50 µL	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	320 µL	1
Folhas (0,9407 mg.mL ⁻¹)	410 µL		50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	320 µL	2
Folhas (0,9407 mg.mL ⁻¹)	360 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	320 µL	3
Frutos (0,7193 mg.mL ⁻¹)	422 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	278 µL	4
Planta jovem											
Folhas (0,4270 mg.mL ⁻¹)	530 µL	50 µL	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	200 µL	1
Folhas (0,4270 mg.mL ⁻¹)	530 µL	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	10 µL	10 µL	200 µL	2

- Branco enzimático: adição de todos os reagentes, menos o extrato enzimático;
- Branco precursor: Adição de todos os reagentes, menos os precursores.
- A quantidade de proteínas utilizada nos ensaios enzimáticos foi de 0,2 mg.mL⁻¹.

4.6.1 Ensaio enzimático

Os reagentes foram colocados em eppendorfs. A contagem do tempo de incubação teve início a partir da adição do extrato enzimático, sendo o meio reacional mantido a 31°C por 90 min. Após esse intervalo de tempo, adicionou-se 2 mL de acetato de etila para cessar a reação.

O material extraído (produto da reação) foi seco em capela de exaustão, solubilizado em metanol e analisado em CLAE-DAD, utilizando-se coluna Kinetex C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta por metanol (contendo 0,1% de ácido fórmico) e água de Milli-Q, em gradiente de 60-100% de metanol. A análise cromatográfica foi realizada no tempo de 55 min, com injeção de 20 µL e fluxo de 0,75 mL.min⁻¹, monitorado em comprimento de onda 344 nm.

5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com outros laboratórios. Os testes para a avaliação da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp-Araquara, sob orientação da Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida; os de atividade antiinflamatória foram realizados no Laboratório de Ciências, Unesp-Bauru, sob orientação da Prof. Dra. Maria Sueli Pereira de Arruda; os testes de atividade antioxidante foram realizados pela Dra. Lidiane Gaspareto Felipe, e a atividade inseticida realizada no Laboratório de Fitossanidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - campus Cáceres, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre dos Santos.

Foram utilizados extratos das folhas de *Piper arboreum* para os ensaios antifúngicos, antiinflamatório e inseticida. Para o ensaio antioxidante, foi utilizada a piperilina isolada.

5.1. Atividade antifúngica

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com

MOPS 0,165 M, pH 7,0. A concentração da suspensão fúngica na placa foi de $5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Como controles foram utilizadas as drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol. As leituras visuais foram realizadas após 48 h de incubação, assim como a leitura espectrofotométrica a 490 nm. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor em que se observou inibição do crescimento fúngico. Para os extratos que apresentaram uma CIM menor que 75 µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL a atividade antifúngica é considerada moderada, entre 150 a 250 µg/mL atividade fraca e maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

Para avaliação da atividade antifúngica utilizou-se 5 mg de extrato das folhas de *P. arboreum*. As cepas de fungos patógenos humanos utilizadas nas análises foram: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. Esses microorganismos foram obtidos pelo Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp/Araraquara. Os fungos foram cultivados em Agar dextrogene sabouro durante a noite em temperatura ambiente. A concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato etanólico de *Piper arboreum* foi determinada pelo método de microdiluição segundo o comitê *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing document EDef 7.1* (2008) com modificações (EUCAST. Clin Microbiol Infect, 15, 2009).

5.2 Atividade antiinflamatória

5.2.1 Bioensaios *in vivo*

Para o ensaio antiinflamatório foram utilizados camundongos Suíços, machos, com 45 dias, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Experimental do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP-Bauru, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências, UNESP-Bauru.

5.2.2 Sacrifício e coleta do material.

Foram utilizados seis camundongos eutanasiados por inalação de dióxido de carbono (CO₂). Após a morte, o abdome foi umedecido e a pele removida de modo que a musculatura abdominal ficasse à mostra. A fim de proceder à lavagem e recuperação das células presentes na cavidade peritoneal, (lavado intraperitoneal – LIP), essa musculatura foi pinçada, erguida, e 10,0 mL de solução PBS estéril e gelado foram nela injetados. O baço foi retirado e macerado com tampão fosfato salino (PBS) estéril, constituindo uma suspensão celular. Parte das suspensões do baço e do LIP foram ainda submetidas aos procedimentos para cultura celular.

5.2.3 Obtenção de macrófagos peritoneais e de células esplênicas.

As células do peritônio foram obtidas através do LIP. Para tanto, o LIP foi centrifugado e o pellet celular formado, ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura completo (meio RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico). As células do baço foram obtidas por maceração do órgão e os eritrócitos lisados com tampão de lise ACK (Invitrogen); em seguida, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação com solução Hanks e o pellet celular ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura completo. As suspensões de células assim obtidas foram ajustadas para conter $2,0 \times 10^6$ células/mL, utilizando o corante vermelho neutro 0,2%. A viabilidade das células foi determinada pelo corante azul tripan 0,1%.

5.2.4 Cultura de células.

Foram distribuídos 100 µl suspensão de células em placas de cultura celular com 96 poços e incubados em estufa de CO₂ 5,0%, à 37°C. As culturas foram diluídas nas seguintes concentrações do extrato bruto: 0,391, 0,195 e 0,097 mg/mL de PBS. Após 24 h de cultivo, os macrófagos foram avaliados quanto à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO) e, a cultura de células esplênicas avaliadas quanto a linfoproliferação pela técnica do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetietiazol-2y1)-2,5-difeniltetrazólio bromido). Como controles positivos para a produção de H₂O₂, foi utilizado acetato de forbol miristato (PMA - 20 ug/ml), para a produção de NO, lipopolissacarídeo (LPS-10 µg/ml), para o ensaio de linfoproliferação, fitohemaglutinina (PHA - 35 µg/ml) e Concanavalina (ConA - 1 mg/ml).

5.2.5 Determinação da produção de H₂O₂.

A determinação do peróxido de hidrogênio foi realizada pela técnica desenvolvida por Pick & Mizel (1981) e modificada por Russo et al (1989). Este ensaio é baseado na oxidação do vermelho de fenol por meio da ação catalítica da enzima HRP. Esta oxidação converte o vermelho fenol em um composto cromogênico que apresenta absorvância em 600-610 nm. Assim, após incubação e remoção do sobrenadante, acrescentou-se 100 µL/poço da solução contendo glicose (1%), vermelho fenol (1% Sigma), HRP (Sigma P-8250 5 uni). Nos poços onde a liberação de H₂O₂ foi avaliada em células estimuladas, acrescentou-se 10 µL de PMA de uma solução de PMA (4 µg/ml) em RPMI, preparada no momento de uso a partir de uma solução estoque contendo 1 mg/mL PMA em DMSO. A placa foi incubada por 2 h a 37°C em 5% CO₂ e a produção de H₂O₂ interrompida pela adição de 10 µL de NaOH (1M). A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 620 nm (EL800, BIO-TEK Instruments, INC). A concentração de H₂O₂ nas amostras foi calculada de acordo com uma curva analítica (0,5 – 8,0 nM de H₂O₂).

5.2.6 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).

A determinação do NO foi realizada de acordo com Green (1981) que utiliza o fato do NO decompor-se em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), produtos que possibilitam sua detecção, mesmo que indireta, nas soluções. No presente estudo, o NO foi determinado através da medida de nitritos no sobrenadante de culturas de macrófagos. Para tanto, 100 µL do sobrenadante dessas culturas foram transferidos para a placa de 96 poços, onde havia 100 µL do reagente de Griess. Após 15 min, a placa foi lida em leitor de ELISA a 540 nm. Os valores de leitura foram comparados com uma curva padrão de NaNO₂, e o branco constituído por Griess mais 100 µl de RPMI. Os resultados foram expressos em µM de nitrito liberado por 10⁵ células.

5.2.7 MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido).

O sal MTT é solúvel em água, e reage com as desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas, isto é, células vivas, resultando na produção de cristais de Formazan de cor roxa, insolúveis em água. Esse sal é, portanto, utilizado para verificar a viabilidade celular. Após incubação, acrescentou-se 20 µL de MTT (5 mg/mL) ao sobrenadante de cultura de células esplênicas. A placa

foi incubada por 2h a 37°C em 5% CO₂ e, após este período, centrifugada por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. Após cinco minutos, a placa foi lida em leitor de ELISA a 540 nm. O índice de viabilidade foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{estimulado} - \text{branco}}{\text{controle} - \text{branco}} \times 100$$

O branco foi constituído por poços que passaram pelos mesmos procedimentos sem conter células, e o controle constituído de células cultivadas sem estímulos.

5.3 Atividade Antioxidante

5.3.1 Ensaio Tirosinase

A atividade antioxidante utilizando-se a enzima tirosinase foi realizada em placa de 96 poços foi dividida em quatro grupos contendo o seguinte:

- Grupo A: 120 µL 1/15 M tampão fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 6,8 e 40 µL tirosinase de cogumelos (92 Units/mL) no mesmo tampão;
- Grupo B: 160 µL 1/15M tampão fosfato;
- Grupo C: 80 µL 1/15M tampão fosfato, 40 µL de amostra (piperilina) foi dissolvida no mesmo tampão e 40 µL tirosinase de cogumelos (92 Units/mL) no mesmo tampão.
- Grupo D: 120 µL 1/15 M tampão fosfato e 40 µL de amostra dissolvida em tampão.

O conteúdo de cada poço foi incubado por dez minutos a 23 °C, adicionando-se posteriormente, 40 µL de 2.5 mM L-DOPA do mesmo tampão. Após a incubação a 23 °C por cinco minutos, fez-se a leitura da absorbância em 475 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Como mostrado anteriormente cada amostra é medida sem a adição de tirosinase para corrigir a absorção causada pelo composto ou pela L-DOPA de auto oxidação. O ácido fólico foi usado como controle. A porcentagem de inibição para atividade da tirosinase foi calculada pela seguinte equação: $\frac{\{(A-B)-(C-D)\}}{(A-B)} \times 100$.

Preparação da L-DOPA: 10 mg L-DOPA em 20 mL tampão fosfato – vortex e centrifugação em 2.900 rpm for 10 min. Coleta-se o sobrenadante.

Preparação da Tirosinase: Solução estoque – preparar uma solução de 92U/ml em tampão fosfato.

5.4 Atividade inseticida frente a *Atta sexdens*

5.4.1 Atividade dos extratos via ingestão

Para avaliação da atividade inseticida dos extratos das folhas, utilizou-se a metodologia de BUENO et al. (1997) para o preparo de dieta, sendo que para cada 100 mL de água destilada foram adicionados 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 1,5 g de ágar e 0,1 g de levedo de cerveja. Os extratos vegetais foram solubilizados na dieta a 1% (peso/volume).

O bioensaio foi constituído por extrato etanólico de folhas *P. arboreum*, e testemunha. Tanto os extratos (tratamento) quanto testemunha foram incorporados às dietas e fornecidos às formigas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada uma constituída por uma placa de Petri, forrada com papel-filtro e contendo um cubo de dieta de 1 cm³ e dez operárias de *Atta sexdens* adultas. Foi avaliada a mortalidade dos insetos a cada 24 h, durante cinco dias.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência de Weibull, que descreve a relação entre a sobrevivência estimada (*S*) em função do tempo. Posteriormente, as equações foram submetidas ao teste de contraste de modelos (χ^2 ; $p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o emprego do programa R (RDCT, 2008) e do pacote estatístico *survival* (THERNEAU, 2009).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos precedentes da espécie *Piper arboreum* (SILVA, 2004), revelaram que as amidas pirrolidínicas são os constituintes principais dos extratos de média polaridade sendo, portanto, considerados marcadores desta espécie. Esta classe de metabólito apresenta importante atividade biológica, destacando-se a atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SILVA et al., 2002), fungos de importância médica *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (REGASINI, et al., 2009a) e antitripanossomo (REGASINI et al, 2009b)

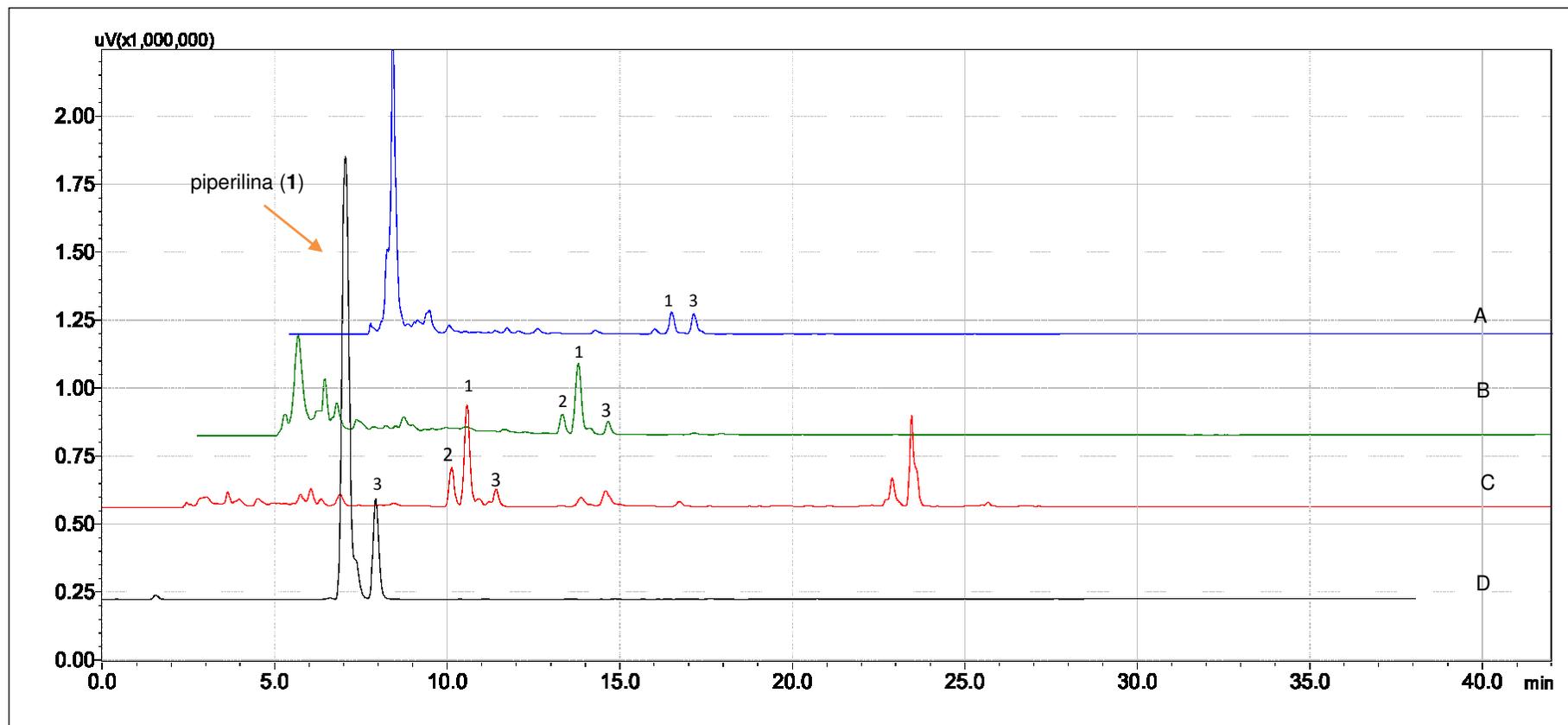
A piperilina (**1**), isolada e identificada por Silva (2004), foi reisolada no presente trabalho, com o objetivo de ser usada como padrão para avaliar a dinâmica metabólica no período de doze meses e, também, durante a variação de um dia. A coleta destes dados foram importantes para o estudo da produção das amidas pirrolidínicas na espécie. Para tanto, foi desenvolvido um método cromatográfico que possibilitou o isolamento da piperilina (**1**), bem como a verificação do seu acúmulo nos extratos das folhas e frutos da planta adulta e no extrato das folhas das plantas jovens. A análise cromatográfica também permitiu verificar o acúmulo de análogos hidrogenados da piperilina.

A análise do acúmulo da piperilina em diversas partes e fases da planta, permitiu o seu isolamento para utilização como padrão na extração enzimática bem como no estudo de análise protéica e biossintético em *Piper arboreum*.

6.1 Perfil cromatográfico dos extratos das folhas e frutos de *Piper arboreum*.

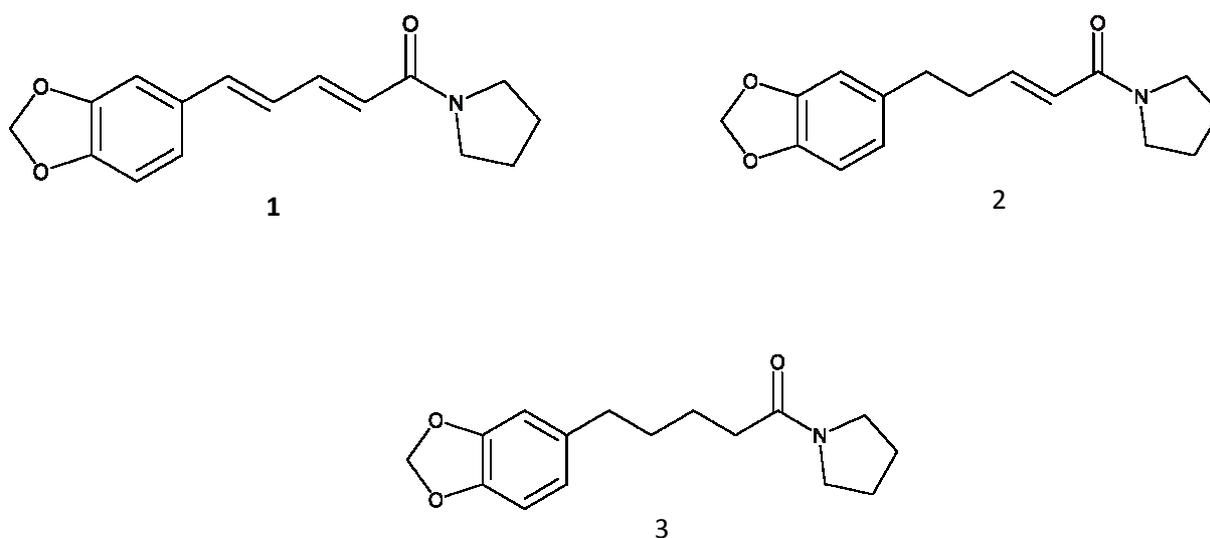
Inicialmente comparou-se o perfil cromatográfico dos extratos das folhas e frutos, obtidos via CLAE, com o perfil cromatográfico de estudos realizados por Silva (2004). A análise comparativa dos cromatogramas revelou a presença da piperilina nas partes aéreas da planta (folhas e frutos) (Figura 23, p.84). A partir dessa análise, desenvolveu-se um método cromatográfico que possibilitou o isolamento da piperilina dos extratos dos frutos. Essa amida foi utilizada como padrão em todas as análises realizadas no decorrer do estudo

Figura 23: Cromatograma obtido via CLAE: (A) extrato das folha da planta jovem; (B) extrato dos frutos da planta adulta (C); extrato das folhas da planta adulta (D) padrão isolado dos frutos da planta adulta. Condição de análise: Coluna C18: phenomenex – Kinetex, Eluente: água/metanol – 60% de MeOH. Tempo: 60 min; Fluxo: 1,0 mL/min.



Pela análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, foi possível confirmar a presença da piperilina, bem como os seus análogos reduzidos (Figura 24).

Figura 24: Amida pirrolidínica (1 - 3) presentes nas folhas e frutos de *P. arboreum*.



6.2 Identificação estrutural da piperilina (1)

A caracterização da piperilina (1) isolada de *Piper arboreum*, foi auxiliada pela análise de IES-EM no modo positivo. A massa molecular $C_{16}H_{17}NO_3$, foi confirmada pela análise dos espectros de massas, que apresentou um pico íon molecular com m/z 272 $[M+H]^+$ (Figura 25, p. 86). O espectro EM/EM mostrou pico em m/z 201 que foi atribuído ao cátion acílio. As principais fragmentações estão detalhadas na Figura 26, p. 87.

Figura 25: Espectro de massas (EM-IES (+)) da piperilina (1).

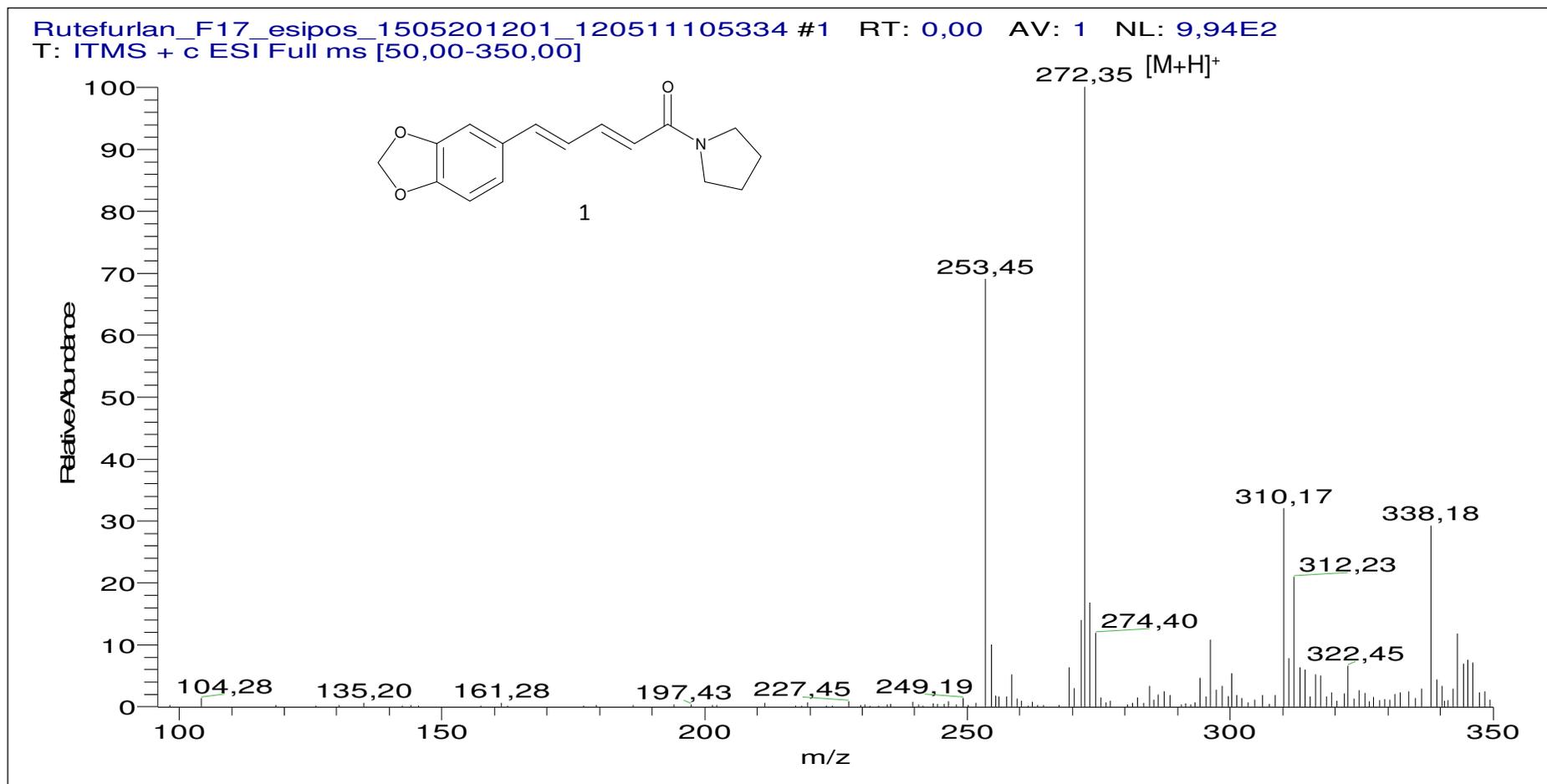
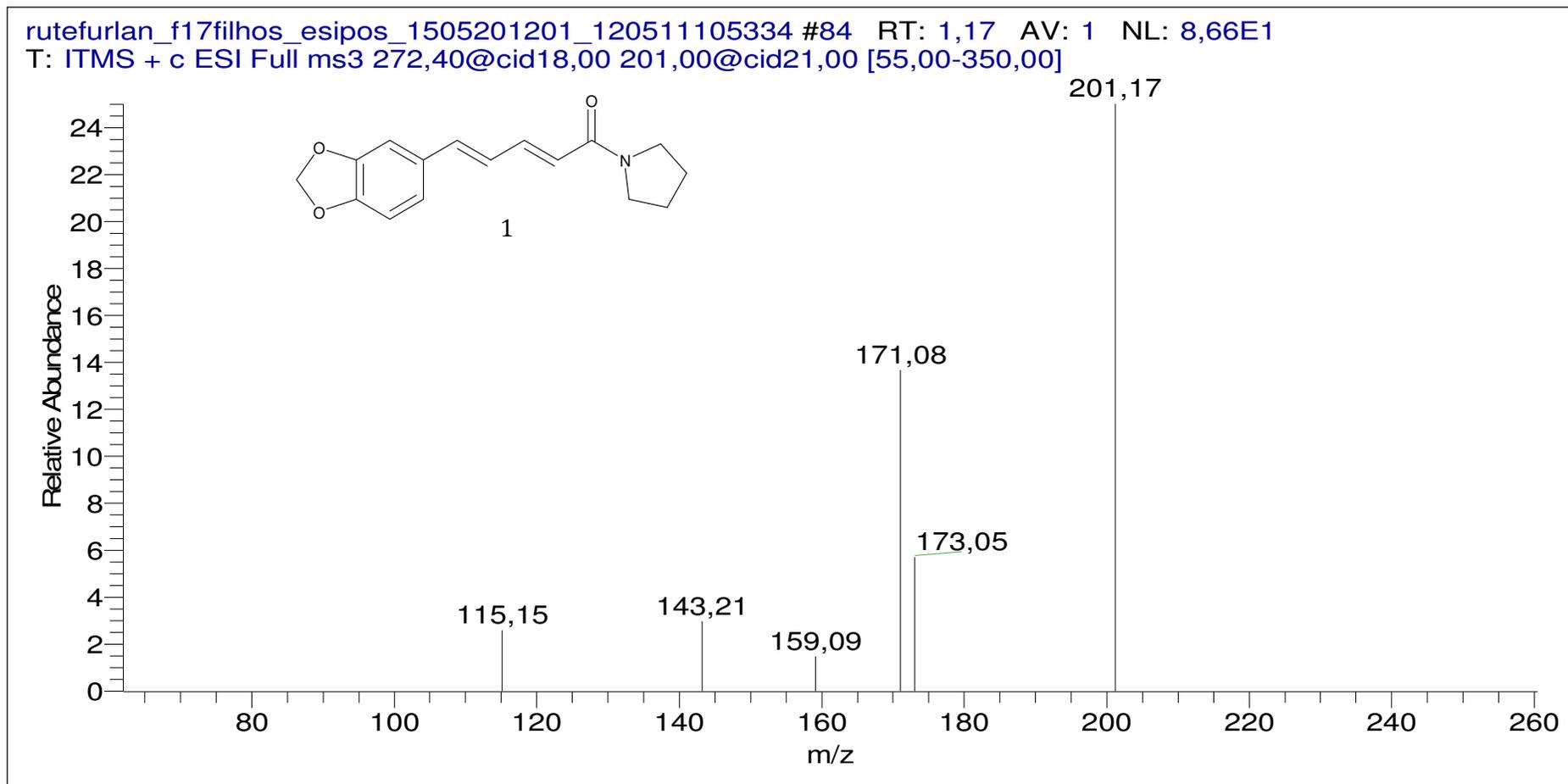
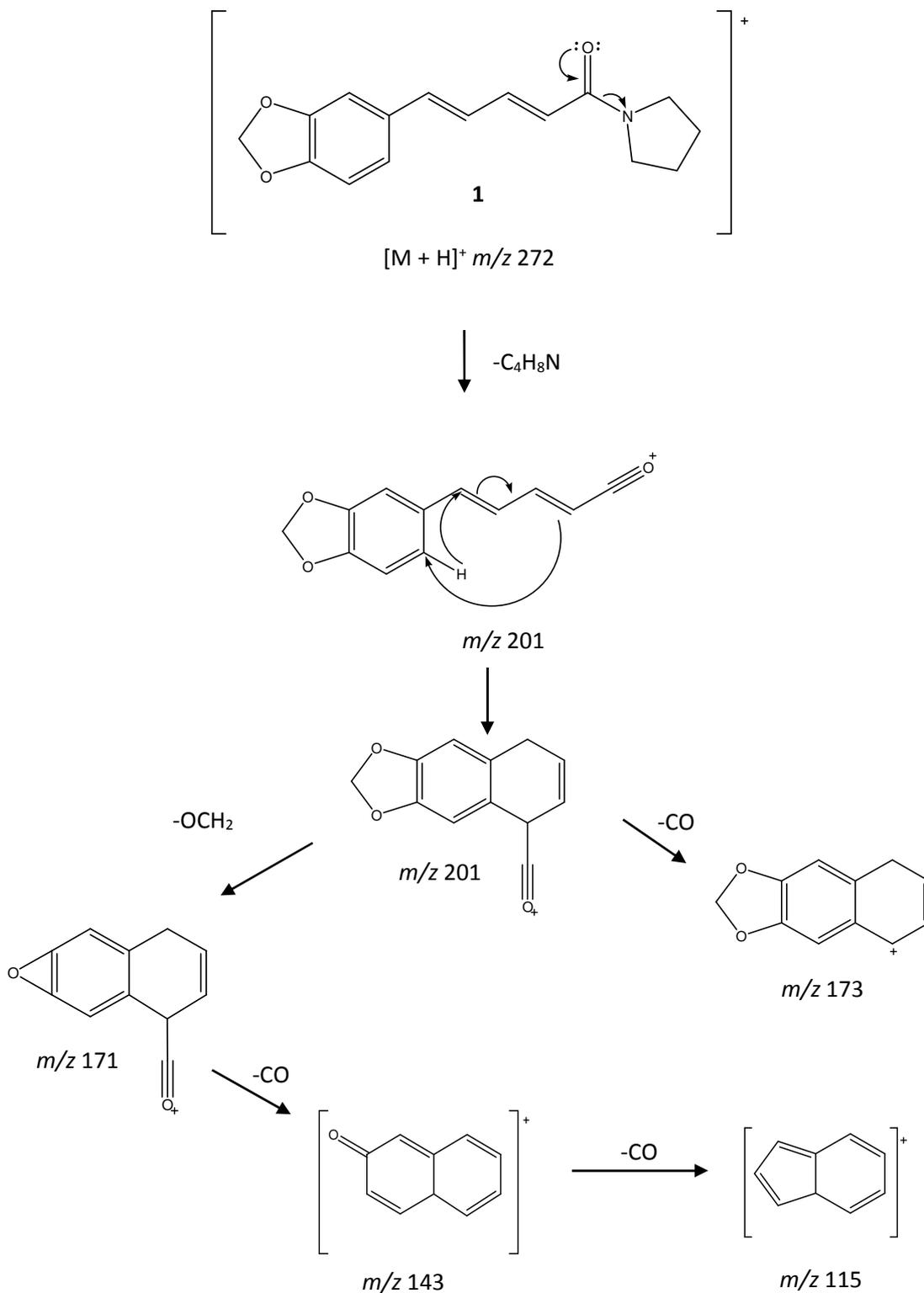


Figura 26: Espectro de EM/EM da piperilina (1).



A proposta de fragmentação para piperilina sugere que o pico com m/z 201 pode seguir duas vias de fragmentação. A primeira seria a eliminação do CO (28 u) resultando na formação do íon fragmento de m/z 173. Esta proposta leva a formação de um carbocátion alílico estável. A segunda via de fragmentação a partir do íon acílio com m/z 201, seria um rearranjo do grupo metilenodioxifenílico e a eliminação neutra de formaldeído ($\text{CH}_2=\text{O}$, 30 u), resultando na contração do anel e na formação de um epóxido de m/z 171. A partir deste fragmento poderia então ser formado m/z 143 com perda de CO (28 u). Outra eliminação de CO leva a formação do íon fragmento m/z 115 (Figura 27, p. 89).

Figura 27: Proposta de fragmentação dos principais íons fragmento da piperilina (1).



A identificação da substância **1** (Figura 28) também foi feita pela análise do espectro de RMN ^1H (Figura 39, p. 92). A análise do espectro permitiu observar sinais δ 6,45, 7,37, 6,89 e 6,90, referentes aos hidrogênios, H-2, H-3, H-4 e H-5, respectivamente, enquanto que os sinais em δ 3,63, 1,93, 2,03 e 3,51 referentes aos hidrogênios H-1', H-2', H-3', H-4', respectivamente. A presença do anel aromático tri-substituído foi confirmada pela presença dos hidrogênios metínicos H-2'', H-5'' e H-6'' com sinais em δ 7,12, 6,82 e 6,99 respectivamente, enquanto que o grupo metilenodioxílico apresentou sinal em δ 5,96.

Vale ressaltar que, que através de experimentos TOCSY 1D o sinal irradiado em δ 3,63 (2H, m), mostra a correlação dos hidrogênios metilênicos do anel pirrolidínico (Figura 30, p. 93). O irradiado em δ 6,45 (H-2, d, $J_{2,3}(\text{trans}) = 15$) evidencia a correlação com δ 7,37 (H-3, dd, $J_{3,2}(\text{trans}) = 15$ Hz e $J_{3,4} = 10$ Hz) confirmando o sistema de acoplamento em trans (Figura 31, p.94). O sinal irradiado em δ 6,82, atribuído a H-5'', mostra o acoplamento entre os H-2'' (δ 7,12, d, $J_{2'',6''}(\text{meta}) = 1,8$) e H-6'' (δ 6,99, dd, $J_{6'',2''}(\text{meta}) = 1,8$ Hz e $J_{6'',5''}(\text{orto}) = 8,4$) do sistema aromático (Figura 32, p. 95).

O espectro RMN ^{13}C (Figura 34, p.96) permitiu atribuir o sinal em δ 165,07 ao grupo carbonílico da amida, e os sinais em δ 46,5, 24,3, 26,0 e 45,9, aos carbonos metilênicos do anel pirrolidínico, C-1', C-2', C-3' e C-4', respectivamente. Os carbonos aromáticos C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' e C-6'' foram correlacionados com os sinais em δ 131,1, 105,9, 148,3; 148,3, 108,3 e 124,9, respectivamente, enquanto o carbono metilenodioxílico foi correlacionado ao sinal em δ 101,3. Os dados espectrais (Tabela 10, p. 91) comparados aos da literatura, confirmam a estrutura da piperilina (SILVA, 2004).

Figura 28: Estrutura química da piperilina (**1**).

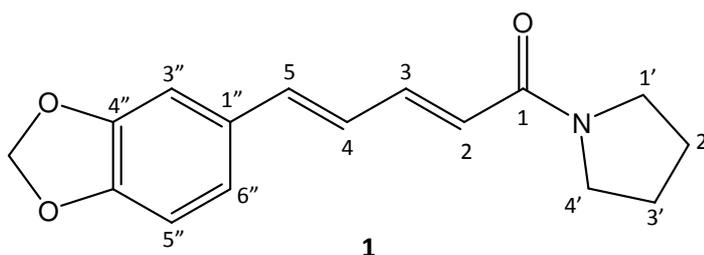


Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da piperilina (1).

Posição	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))	δ ^{13}C
1'	3,63 (2H, m)	45,9
2'	1,93 (2H, m)	24,3
3'	2,03 (2H, m)	26,0
4'	3,51 (2H, m)	46,5
1	-	164,9
2	6,45 (1H, d, 15,0)	121,0
3	7,37(1H, dd, 10,0 e 15,0)	141,6
4	6,89 (1H, dd, 10,0 e 15,0)	122,5
5	6,90 (1H, d, 15,0)	138,8
1''	-	131,1
2''	7,12 (1H, d, 1,8)	105,9
3''	-	148,3
4''	-	148,3
5''	6,82 (1H, d, 8,4 Hz)	108,3
6''	6,99 (1H, dd, 1,8 e 8,4 Hz)	124,9
OCH_2O	5,96 (2H, s)	101,3

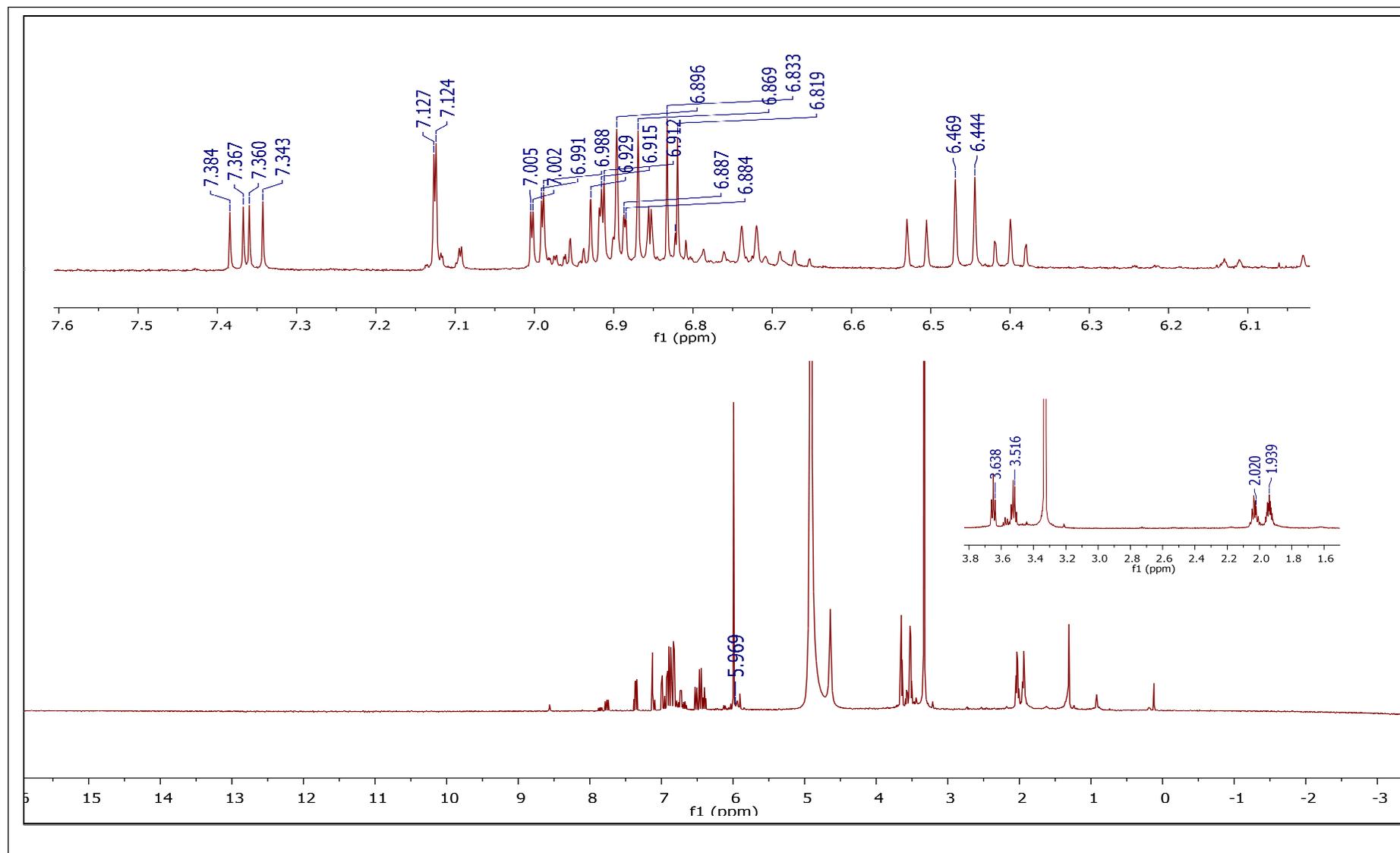
Figura 29: Espectro e expansões de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da piperilina (**1**).

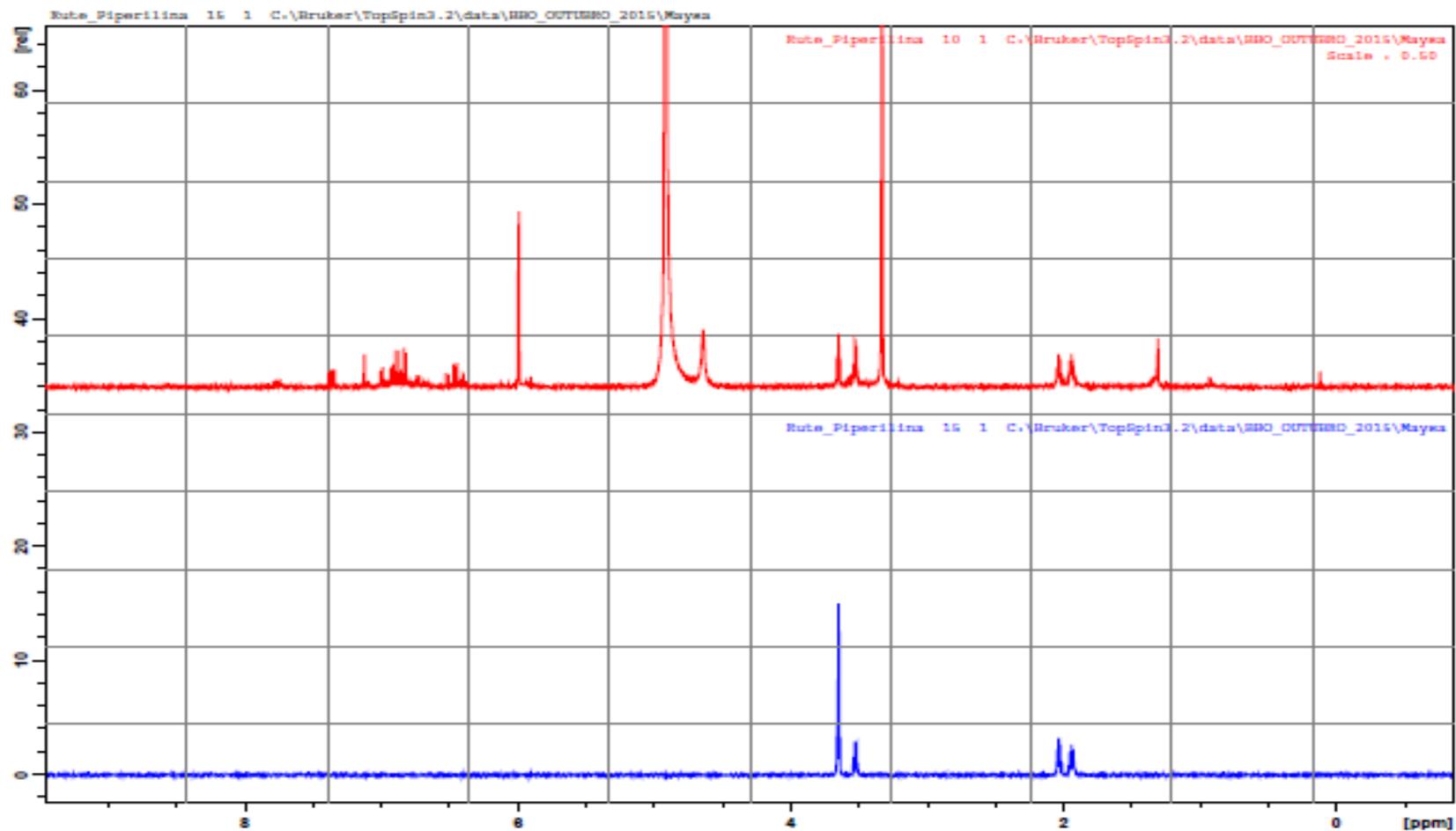
Figura 30: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD₃OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 3,63).

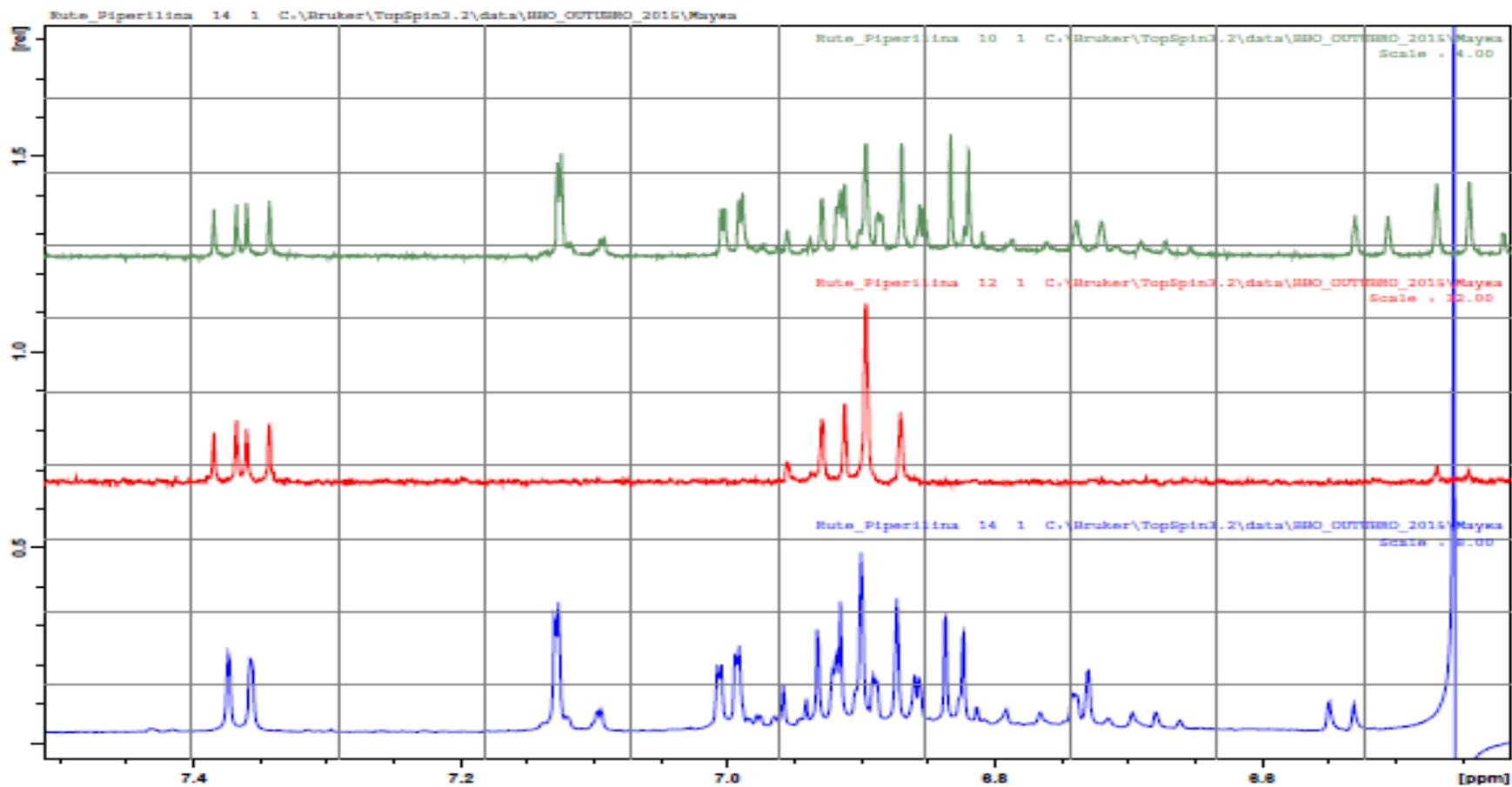
Figura 31: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD₃OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 6,45).

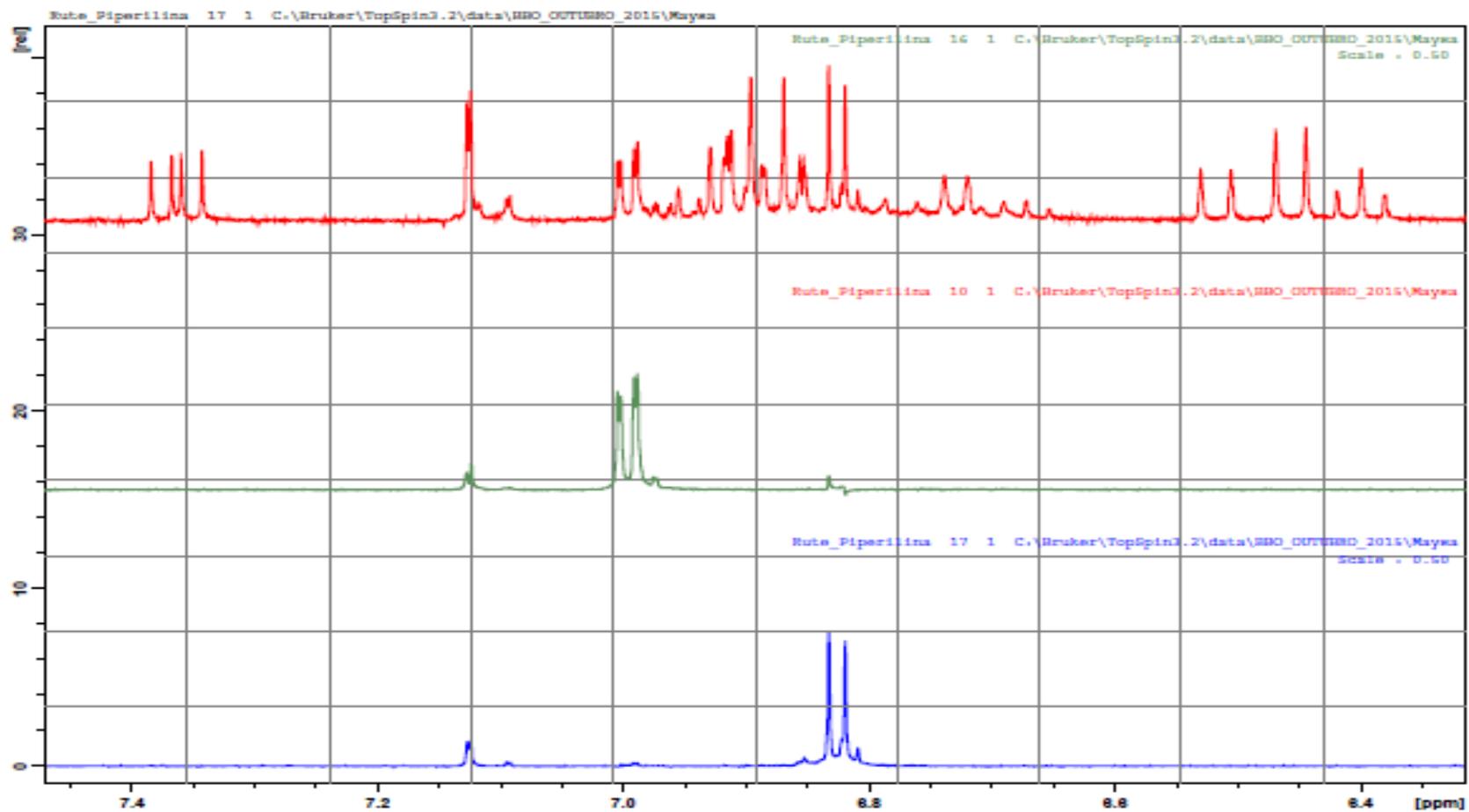
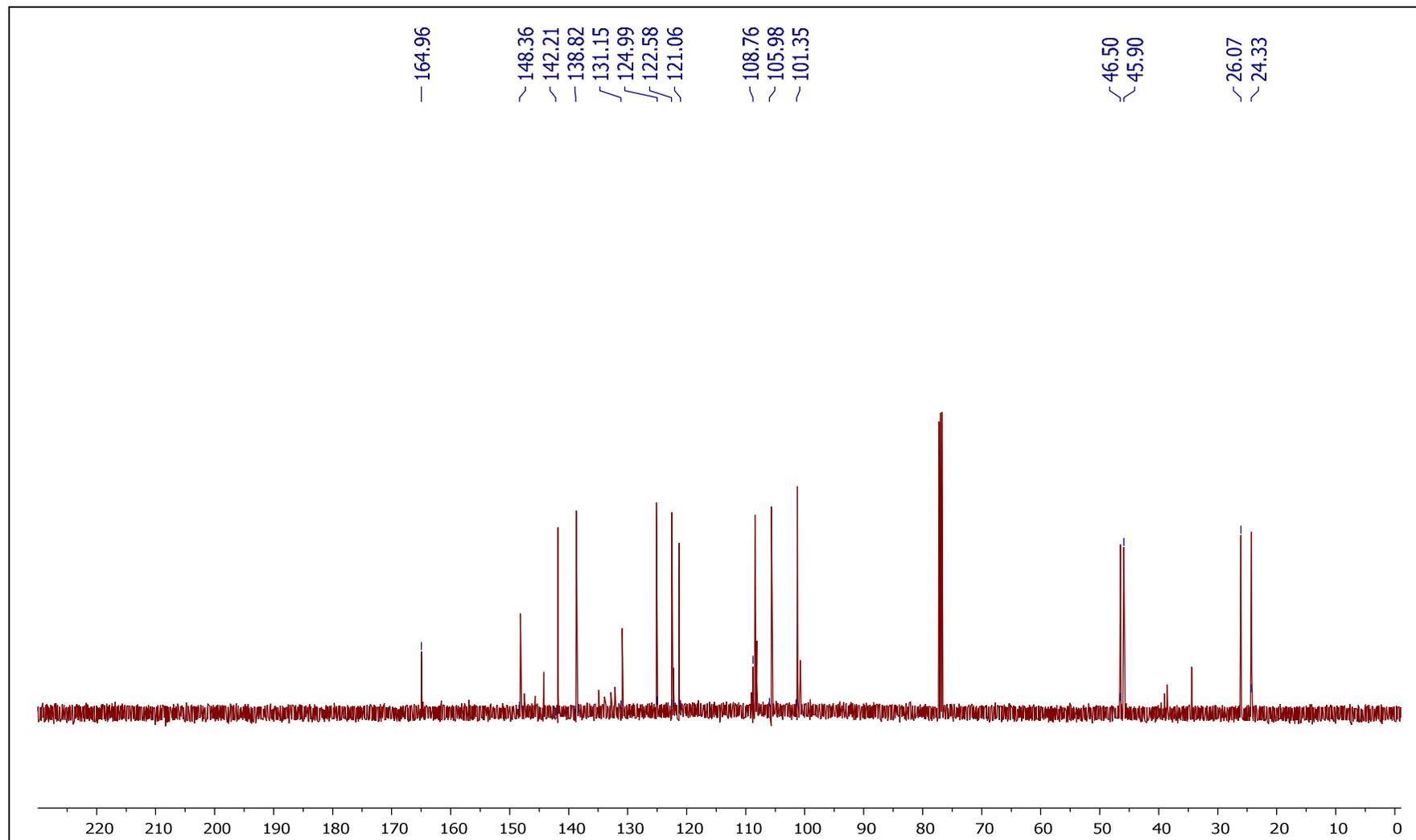
Figura 32: TOCSY 1D da piperilina (1) em CD₃OD, 600 MHz (sinal irradiado: δH 6,82).

Figura 33 Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da piperilina (**1**).

6.3 Dinâmica sazonal e circadiana da *Piper arboreum*

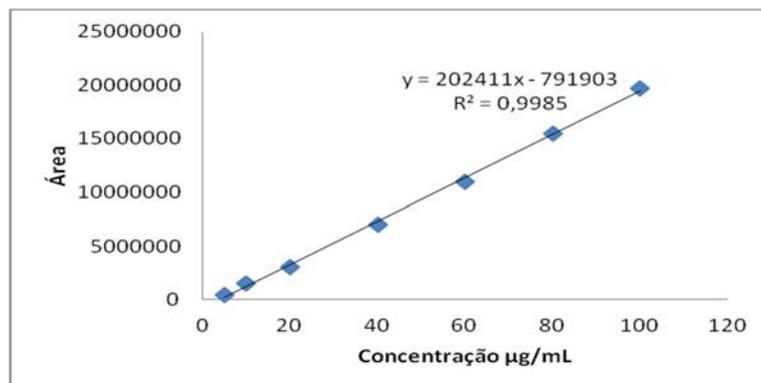
A sucessão de dias e noites em ciclos de 24 horas constitui um dos fatores ambientais desde o início da história da vida na Terra. Todos os organismos vivos exibem oscilações biológicas endógenas com o período de aproximadamente 24 horas, e contam o tempo com relógio sincronizado por sinais externos, como as variações ambientais, principalmente as de luz e temperatura. A regulação de funções biológicas pelo relógio circadiano tem a finalidade de otimizar os processos celulares e fisiológicos em antecipação a modificações periódicas no ambiente de um organismo (KERBAUY, 2008).

As plantas possuem um relógio circadiano que lhes permitem coordenar eventos biológicos internos com mudanças diárias externas. O relógio circadiano fornece a capacidade de antecipar a previsão diária e as mudanças sazonais que ocorrem no ambiente como uma consequência da rotação da terra (IMAIZUMI, 2010; FU et al., 2014), e apresentam duas características essenciais: o arrastamento para um ciclo ambiental e sustentabilidade rítmica sob condições constantes (GUERRIERO et al., 2012).

Alguns fatores ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica, solo, sazonalidade, desenvolvimento da planta, altitude, entre outros, podem influenciar diretamente na dinâmica envolvida na produção de um metabólito secundário (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). As reações enzimáticas decorrentes do metabolismo estão relacionadas diretamente com a luz e a temperatura (GOTTLIEB, et al 1996; GOTTLIEB e BORIN, 2012).

A análise das variações circadiana e sazonal na espécie *Piper arboreum* mostra o acúmulo da piperilina no período de um dia e durante um ano, respectivamente. Para isto, foi construída uma curva de calibração utilizando-se sete pontos da solução padrão em metanol nas concentrações de 5 a 100 µg/mL. O coeficiente de correlação médio da concentração foi 0,9985. A curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados foi expressa pela equação $y = 202411x - 791903$ (Figura 34, p.98).

Figura 34: Curva calibração para quantificação da piperilina (1).



A quantificação da piperilina, nas folhas de *P. arboreum*, foi realizada com base nas áreas relativas para cada pico (área do pico/área do padrão). A concentração da amida foi calculada inserindo as áreas relativas na equação obtida para a curva de calibração. Os cromatogramas (Figura 35, p. 99; Figura 36, p. 100) mostram o resultado destas análises, e possibilitaram a verificação do acúmulo da amida no período de um dia e durante um ano.

Figura 35: Cromatogramas (UV 344 nm) para quantificação circadiana da piperilina (1) nos extratos das folhas de *P. arboreum*.

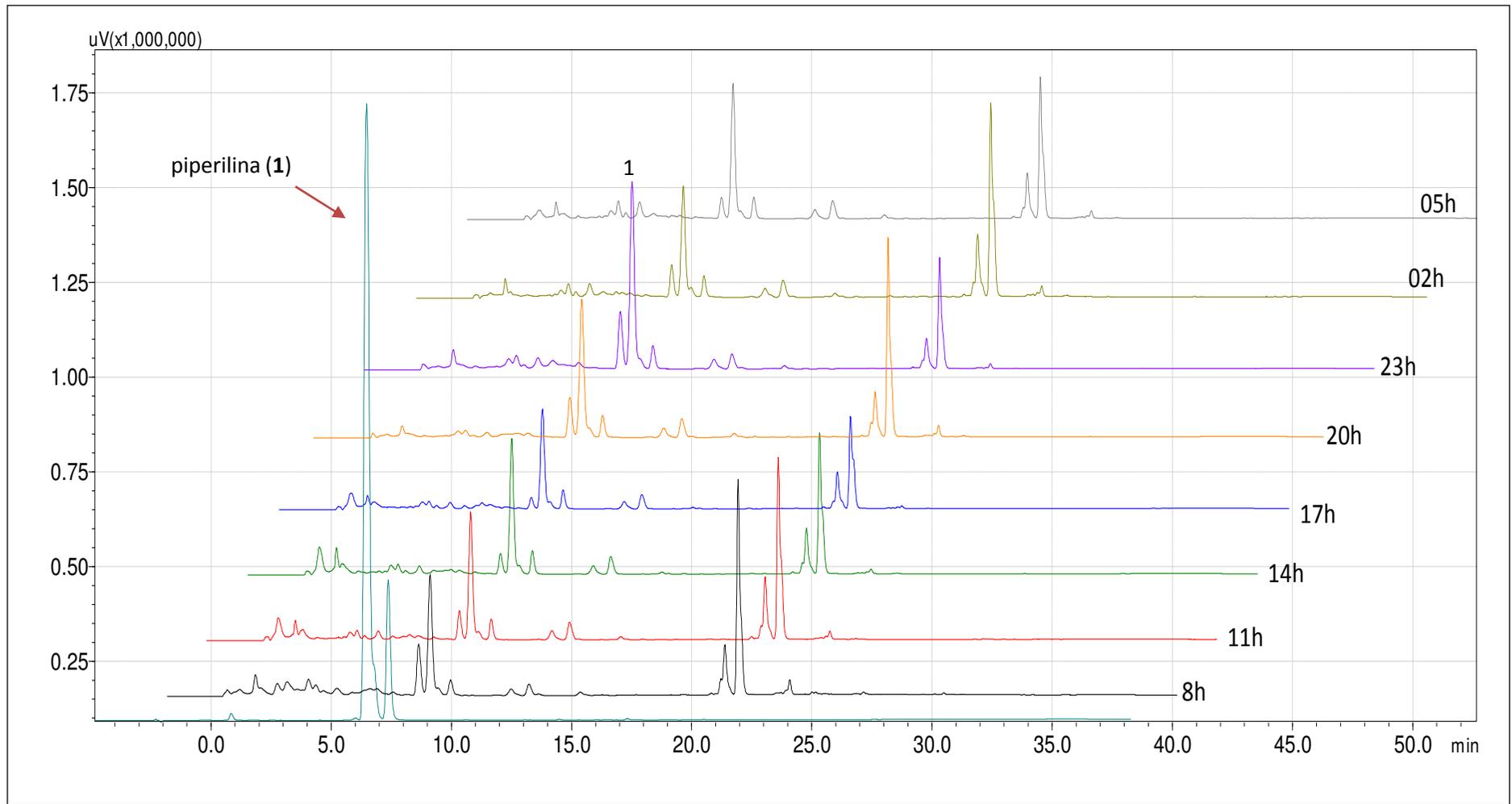
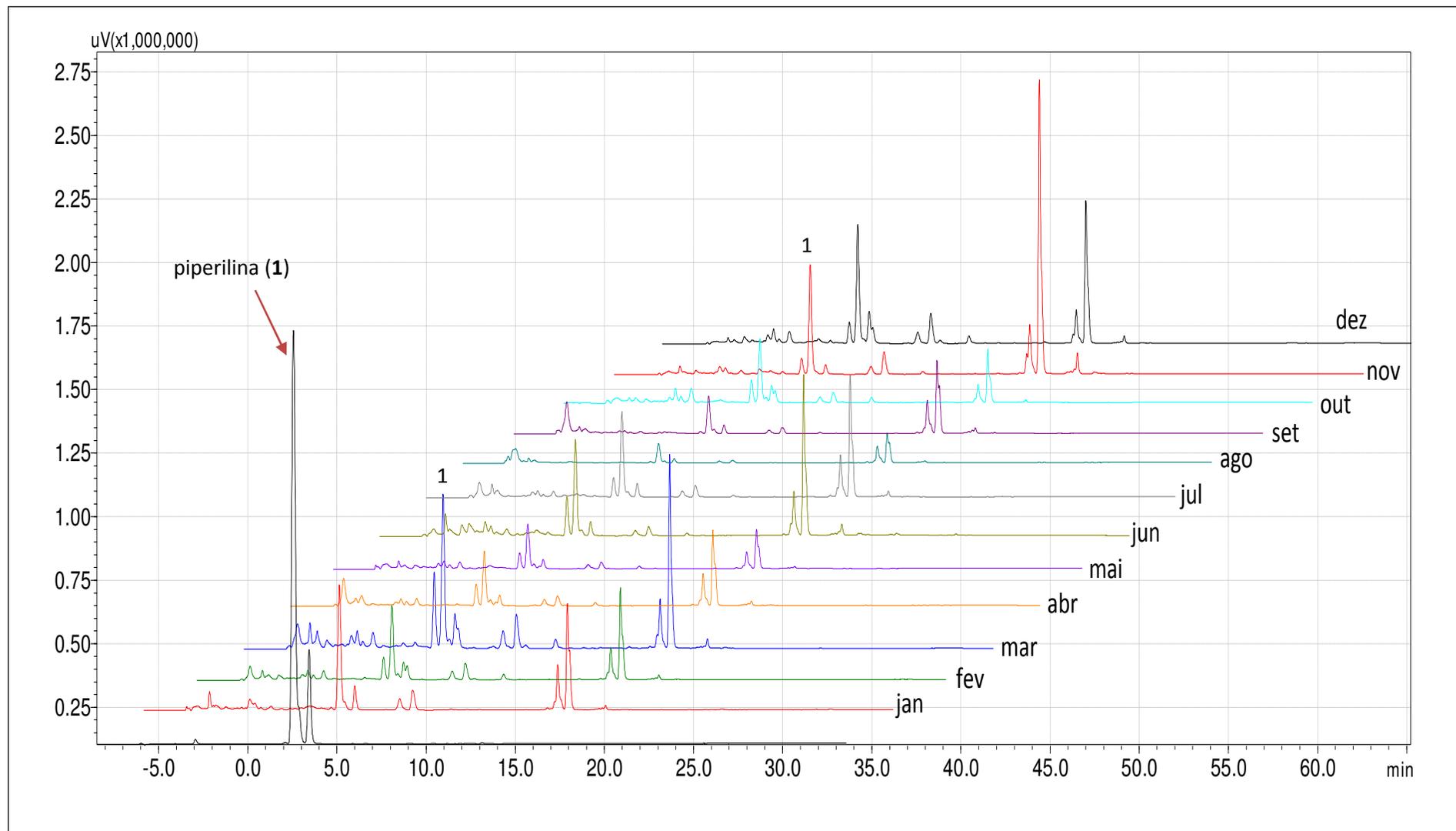


Figura 36: Cromatogramas (UV 344 nm) para quantificação sazonal da piperilina (1) nos extratos das folhas de *P. arboreum*.

A variação sazonal da concentração da amidas piperidínicas, pode estar relacionada com a precipitação média anual (período de chuva) observada para o período da coleta das folhas. No mês de janeiro observou-se um maior volume de chuva e conseqüentemente um aumento expressivo da piperilina nas folhas de *P. arboreum*. No entanto, para o mês de agosto, ocorreu uma menor precipitação, sendo observado, também, um menor acúmulo do metabólito (Figura 37-A, p. 103).

A variação na concentração da piperilina, no decorrer do ano, deve estar relacionada ao estresse hídrico, uma vez que a água é essencial para as funções fisiológicas da planta, sendo o recurso mais abundante para o crescimento e funcionamento dos vegetais (PIMENTA, 2008). Assim, fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, abertura e fechamento dos estômatos, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados pelo estresse hídrico e conseqüentemente pode levar a variações no metabolismo secundário (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH et al., 1987; HARTMANN, 1996).

A análise do ritmo sazonal (Figura 37-A, p. 103) mostra um aumento significativo na concentração da piperilina nos meses de janeiro, março, junho, novembro e dezembro, enquanto o ritmo circadiano mostra um maior acúmulo da amida nos horários de 11 h e 23 h (Figura 37-B, p. 103). Estes horários estão perfeitamente acoplados aos turnos de visitaçao dos polinizadores e dispersores de espécies vegetais, dentre estes a avifauna (CAMPOS et al., 2012; MACHADO e ROCCA, 2010) que tem o hábito diurno de visitaçao na grande maioria das espécies, e a quiropterofauna (CAMPOS et al., 2012; CARVALHO e TAVOLONI, 2007) que tem o hábito noturno de visitaçao. Um dos fatores importantes, no estudo da sazonalidade, é a época de coleta das partes organográficas envolvidas, uma vez que a quantidade e, até mesmo, a natureza dos constituintes ativos sofrem uma grande variabilidade durante o ano (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Neste sentido, quase todas as classes de metabólitos secundários sofrem alterações no seu conteúdo, em função da variação sazonal, como exemplo, os alcaloides (ROBINSON, 1974; ELGORASHI, et al., 2002; WU, et al., 1996). Além disso, tem sido mostrado que estresses ambientais, tais como luz elevada, temperaturas frias, irradiação UV e infecção patogênica estimulam a produção de compostos fenólicos, tais como os flavonóides e fenilpropanóides em plantas (GRACE et al., 1998; BHARTI e KHURANA, 1997), por exemplo, a fenilalanina-amônia liase (PAL) que aumenta sua atividade em resposta ao estresse de refrigeração e/ou congelamento (LEIVA et al., 1995), ou sinais oxidativos intracelulares em resposta ao ataque de patógenos e, possivelmente, outras formas de estresses (LEVINE et al., 1994).

A análise dos dados circadiano e sazonal em *P. arboreum*, permitiu inferir que os teores da piperilina estão relacionados à variação da precipitação, ou seja, ao conteúdo hídrico da planta, e que os metabólitos são acumulados nos períodos mais frescos do dia (Figura 38, p. 103). As concentrações para quantificação da piperilina estão listadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 11: Dados da quantificação da análise sazonal da piperilina (1).

MÊS COLETA	[] mg/mL	%m/m
Jan	0,0956	9,56
Fev	0,054	5,40
Mar	0,0855	8,55
Abr	0,0456	4,46
Mai	0,0358	3,58
Jun	0,0660	6,60
Juh	0,0234	2,34
Ago	0,0155	1,55
Set	0,0310	3,10
Out	0,0499	4,99
Nov	0,0669	6,69
Dez	0,0794	7,74

Tabela 12: Dados da quantificação da análise circadiana da piperilina (1).

HORA COLETA	[] mg/mL	%m/m
8h	0,0663	6,63
11h	0,0917	9,17
14h	0,0671	6,71
17h	0,0513	5,13
20h	0,1102	1,10
23h	0,1485	1,48
2h	0,0562	5,62
5h	0,0623	6,23

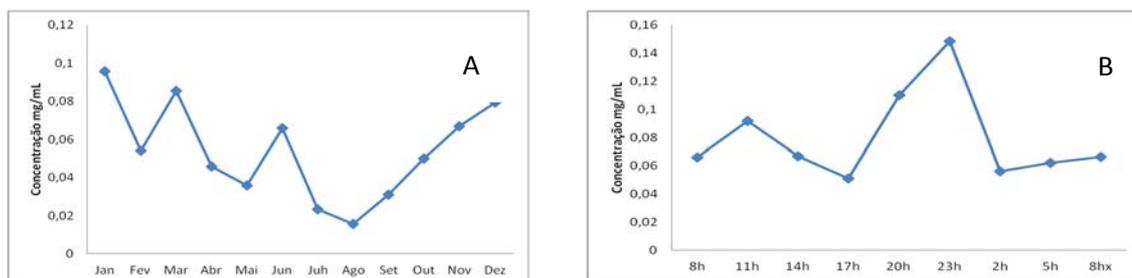
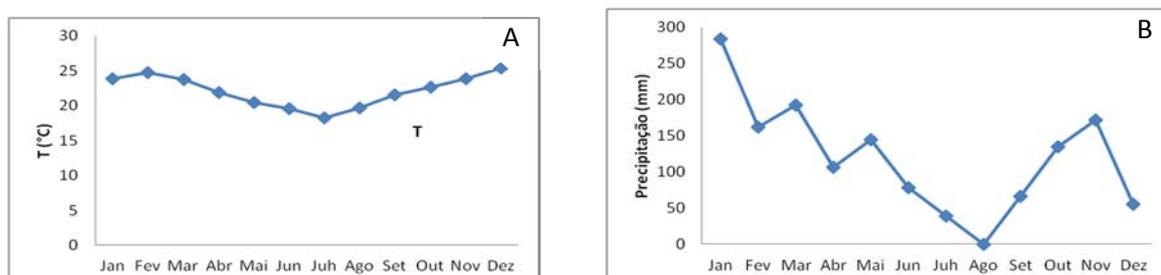
Figura 37: Gráfico da variação sazonal (A) e gráfico da variação circadiana(B) da piperilina (1) presente nas folhas adultas de *P. arboreum*.

Figura 38: Gráfico da temperatura média (A) e precipitação média (B) anual em Araraquara-SP, no ano de 2013.



6.4 Experimentos biossintéticos em *Piper arboreum*.

A biossíntese de produtos naturais é uma área recente na química, representando a interseção com a biologia molecular. Neste sentido, a engenharia metabólica se apresenta como uma importante alternativa para aumentar, de forma significativa, a produção de metabólitos secundários. A possibilidade de promover a

reconstrução *in vitro* favorece a caracterização de etapas individuais, a identificação de intermediários biossintéticos, além de permitir um melhor entendimento de como as etapas metabólicas podem ser manipuladas para a produção de análogos estruturais. Por meio da manipulação *in vitro* é possível alcançar um nível de diversificação inalcançável naturalmente (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos biossintéticos de piperamidas estão bem estabelecidas pelo nosso grupo pesquisa (NAVICKIENE, 2002; COTINGUIBA, 2011; PIOLI, 2014; SILVA, 2004). No entanto, ainda existem muitas etapas e enzimas que precisam ser conhecidas na biossíntese destas amidas. Com base nestes questionamentos a proposta do presente trabalho foi investigar a rota biossintética para formação da piperilina (**1**), principalmente quanto ao aumento da extensão da cadeia lateral e a formação do grupo metilenodioxílico. Sabendo que a formação deste grupo é dependente da enzima oxidoreductase do tipo P450, é importante conhecer em qual etapa este grupo é formado ao longo da biossíntese da piperilina.

A proposta biossintética das amidas pirrolidínicas em *Piper arboreum* envolve rota mista, com intermediários fenilpropanoídicos como precursores da unidade C₆-C₃, a L-ornitina pela unidade pirrolidínica, e acetil-CoA pelo prolongamento da cadeia carbônica.

A piperilina (**1**) é composta por um grupo 1,3- benzodioxola (subunidade A), ao lado da cadeia pentadienoico (subunidade B) e o fragmento pirrolidina (subunidade C) (Figura 39, p.) O grupo fenilpropanoídico da molécula (subunidade azul) tem como precursor o derivado cinamoil-CoA, o qual é biossintetizado a partir do ácido chiquímico, apresentando padrão de oxigenação 3,4-metilenodioxi, auxiliados pelas enzimas citocromo do tipo P450 e S-adenosil-metionina. Após reação do derivado cinamoil-CoA com uma unidade de malonil-CoA, seguida da redução da enona e de uma β -eliminação (desidratação), obtém o tioéster piperoil-CoA, que reage com a pirrolidina, formando a piperilina (**1**) (Figura 40, p. 105).

Figura 39: Estrutura química de (**1**).

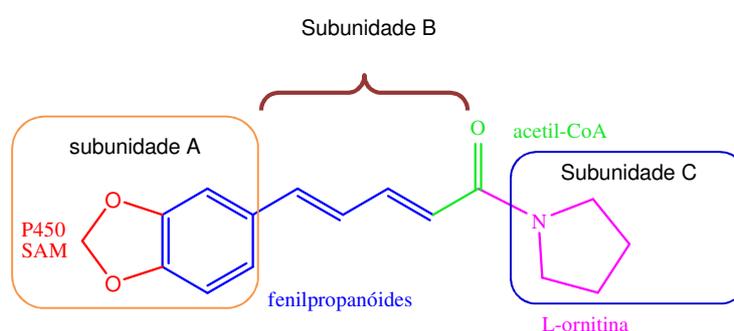
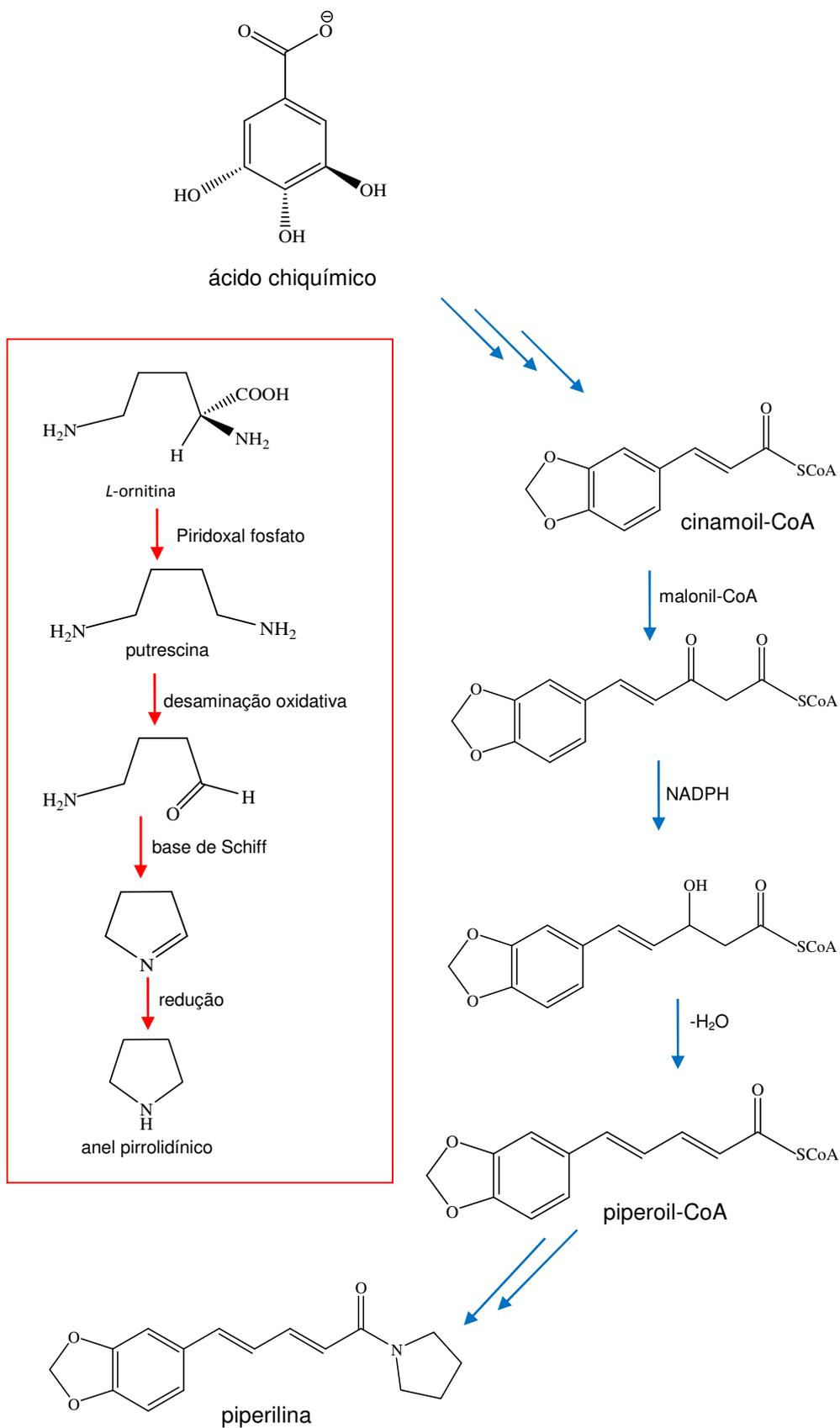


Figura 40: Precursores envolvidos na rota biossintética da piperilina (1) (DEWICK, 2009).



Com intuito de verificar a participação de precursores e enzimas envolvidas na formação da piperilina (**1**), foram realizados experimentos de incorporação de precursores, acetato de sódio ($\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$), ácido [1-OD, 2-D]-ferúlico, ácido [1-OD, 2-D]-3', 4' metilenodioxicinâmico, reações enzimáticas e análise em gel de eletroforese mono e bidimensional.

A proposta de incorporação do acetato de sódio ($\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$) era de realizar o experimento com as folhas jovens e adultas de *P. arboreum*, no entanto, o experimento foi realizado apenas com as folhas adultas devido a interação interespecífica entre as espécies ocorrida pela proximidade das mesmas, o que prejudicou a incorporação na fase jovem da planta.

A partir dos extratos obtidos da incorporação com acetato de sódio ($\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$), a piperilina foi isolada por CLAE preparativo e analisada por espectrometria de massas. O íon m/z 273 foi observado após a inspeção dos dados (Figura 41, p.107) bem como os seus íons fragmentos (Figura 42, p. 108). A incorporação do acetato marcado foi confirmada pelo aumento de uma unidade de massa, m/z 272 para m/z 273, confirmando que a extensão da cadeia carbônica da piperilina é oriunda da via acetato. A proposta de fragmentação pode ser vista na Figura 43, p.109.

Figura 41: Espectro de massas do extrato das folhas enriquecido com $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$.

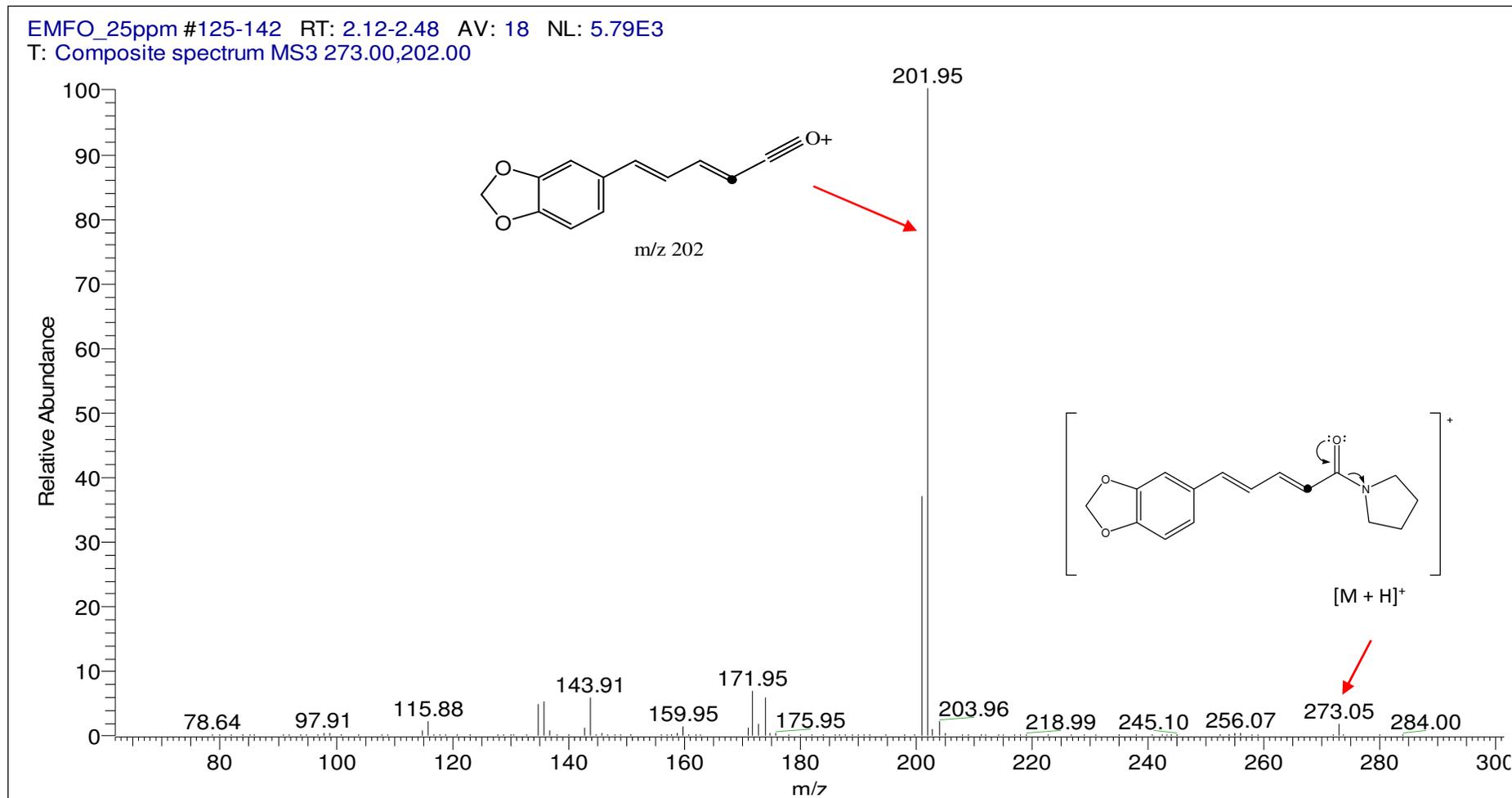


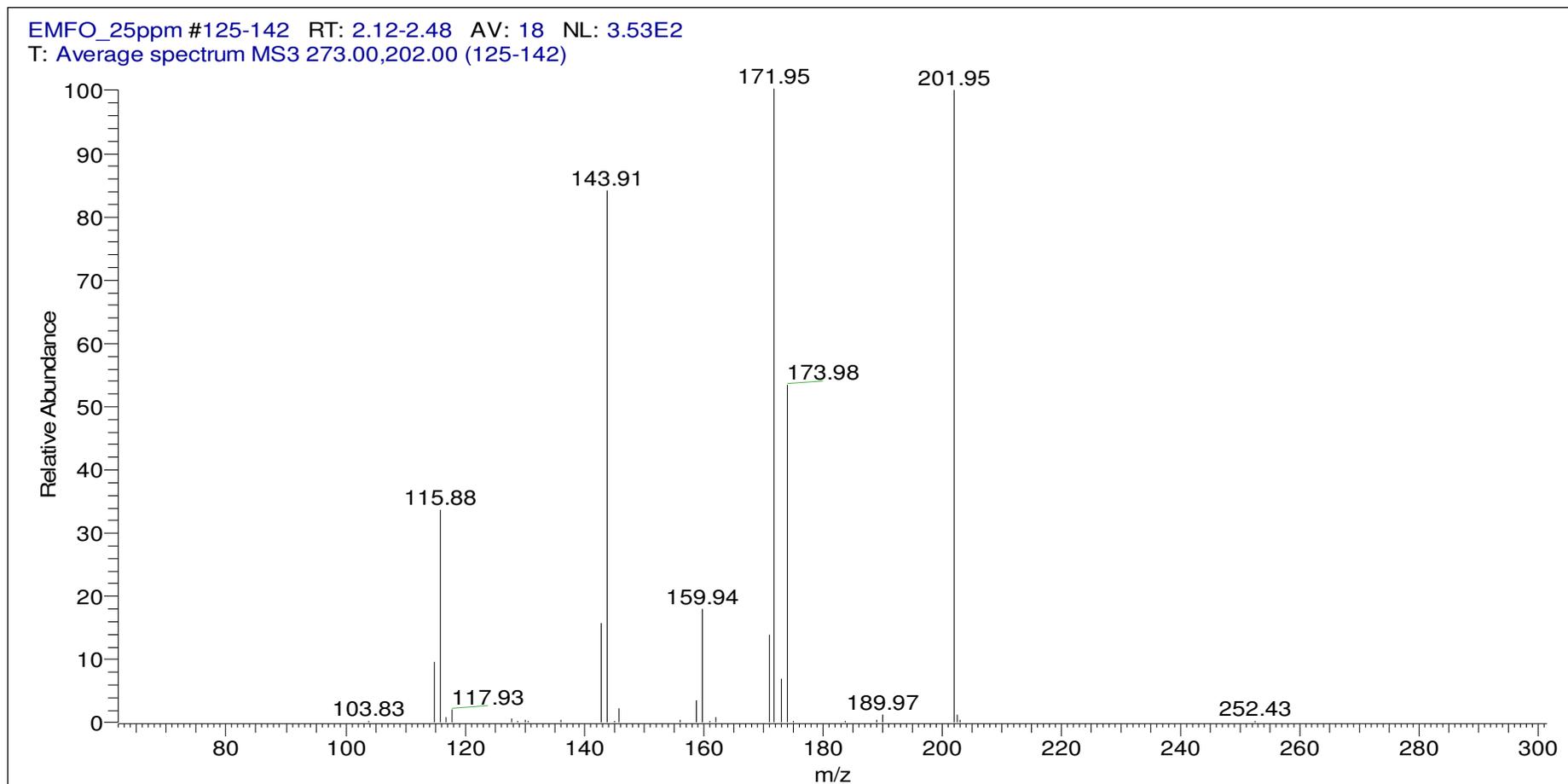
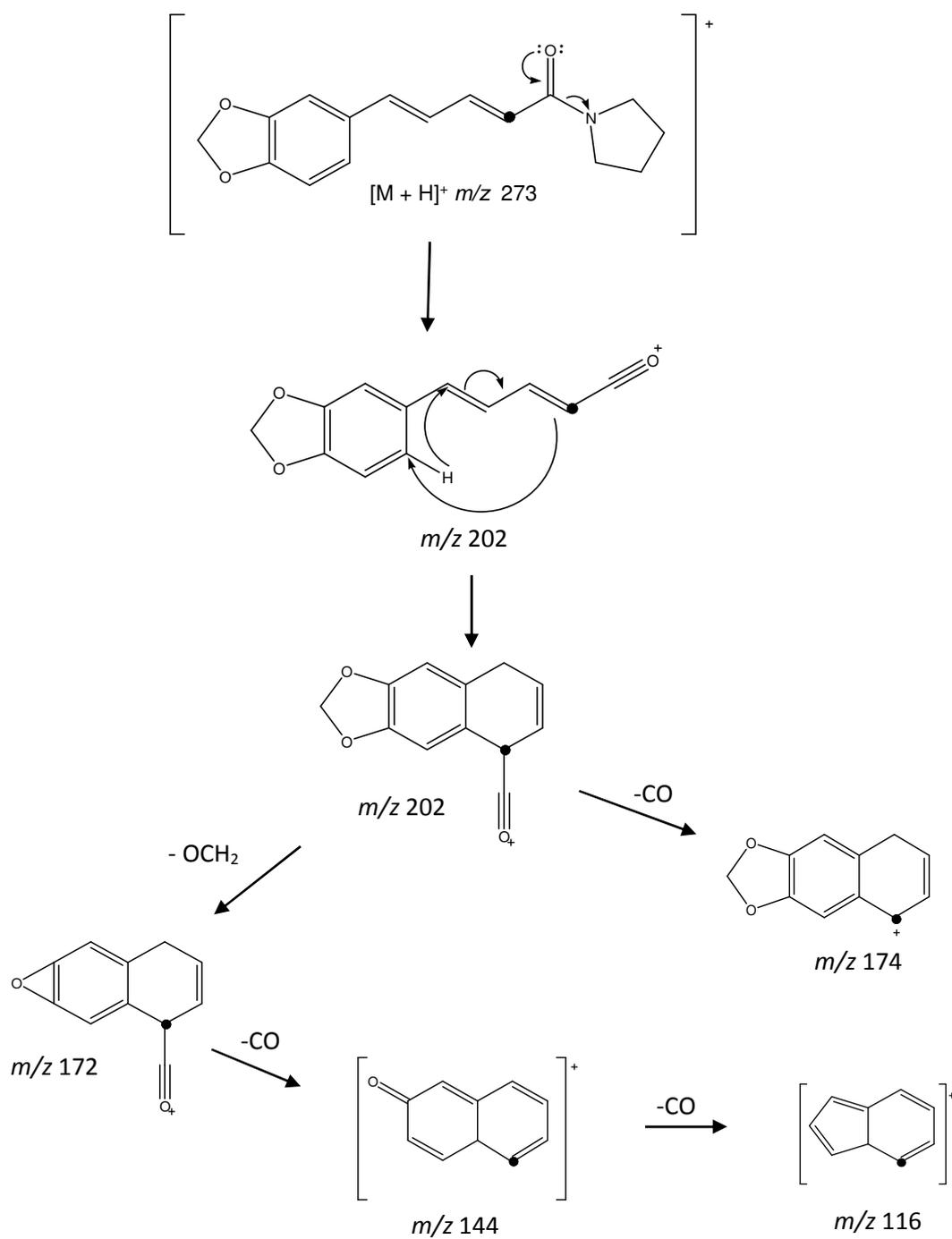
Figura 42: Espectro de massas das fragmentações do extrato das folhas enriquecido com $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$.

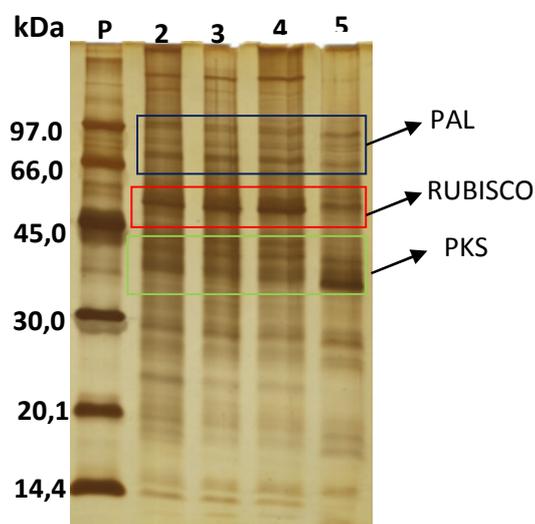
Figura 43: Proposta de fragmentação da piperilina marcada com $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$.

6.5 Análise por eletroforese monodimensional do extrato enzimático do fruto e folhas de *Piper arboreum* (SDS-PAGE)

Uma forma de determinar a massa molecular de proteínas de um determinado organismo é através de análise em gel poliacrilamida monodimensional, onde as proteínas são separadas por sua massa molecular utilizando-se soro albumina bovina como padrão. Para isso, os extratos enzimáticos dos frutos, folhas jovens e adultas de *P. arboreum* foram preparados seguindo a metodologia descrita anteriormente.

Após revelação do gel de poliacrilamida com nitrato de prata, os extratos enzimáticos das folhas (2-4) e frutos (5), foram analisados e comparados com o padrão (P), sendo possível verificar semelhanças nos pesos moleculares de enzimas presentes nas folhas e frutos (Figura 44, p. 111). As bandas entre 55 e 14 kDa foram atribuídas à enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxidase (RubisCO). Esta enzima é encontrada em elevada quantidade nos tecidos fotossintéticos de plantas superiores e responsável pela de formação de moléculas orgânicas a partir da fixação de carbono atmosférico (KERBAUY 2008). Também foi observada bandas entre 66 e 97 kDa, que pode ser atribuído à enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Essa enzima é um tetrâmero com subunidades de 77-83 KDa, sendo uma das enzimas mais estudas no metabolismo de plantas, por ser a enzima chave na formação do ácido cinâmico, precursor de fenilpropanóides, metabólitos essenciais para fisiologia e patologia de plantas. Estudos visando a clonagem desta enzima podem colaborar para manipulação da biossíntese de fenilpropanóides em plantas usando processos biotecnológicos (HASHEMITABAR et al, 2014; HELDT & PIECHULLA, 2011). Também foi observado bandas expressivas que podem estar relacionadas com a extensão da cadeia da amida piperilínica. Essas bandas podem ser atribuídas à enzima policetídeo sintase do tipo III (PKS- III). As chalconas sintase (CHS) e estilbeno sintase (STS), fazem parte desta superfamília e apresentam subunidades entre 40 e 47 KDa. Estas enzimas catalisam as condensações usando unidades de acetato, atuando diretamente nos substratos acil-CoA como unidades iniciadoras. Estas enzimas têm sido observadas em todos os tipos de plantas e desempenham importante papel na formação dos metabólitos secundários (FLORES-SANCHEZ e VERPOORTE, 2009; MOORE e HOPKE, 2001).

Figura 44: Gel SDS-PAGE dos extratos enzimáticos da folha jovem (2), folha adulta coletada as 11h (3), folha adulta coletada as 23h (4), fruto (5) de *P. arboreum*. Gel revelado com nitrato de prata.



6.6 Análise por eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) do extrato enzimático das folhas e frutos de *Piper arboreum*.

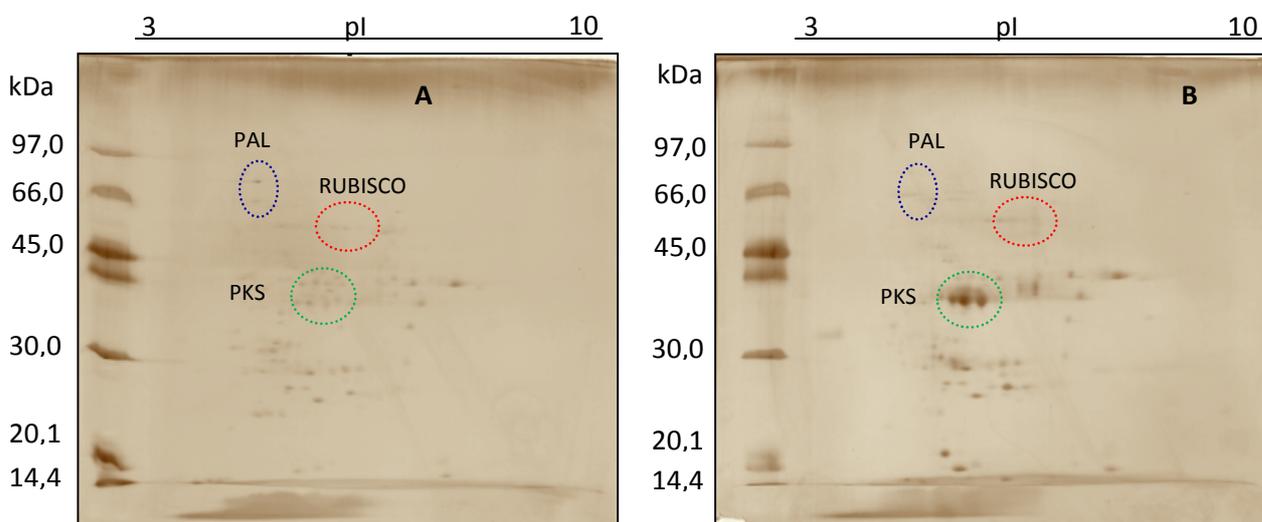
Como as bandas protéicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais como a eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE), podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional ao combinar dois processos distintos de separação pode ser usada para separar mais de mil proteínas em um único gel. Na primeira dimensão (IEF) as proteínas são separadas pelas suas cargas e na segunda dimensão separadas de acordo com sua massa molecular. O resultado final consiste em um gel com diversos pontos (*spots*) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína em particular.

Para determinar as regiões com predomínio de proteínas, as amostras foram preparadas como descritas anteriormente. Após focalização isoeletrica e separação em gel de poliacrilamida, fez-se a revelação utilizando-se nitrato de prata. Na figura 45, p. 112, são apresentados os géis 2D SDS-PAGE das folhas e frutos de *P. arboreum*.

A análise do gel permitiu observar a presença de inúmeros *spots* mais proeminentes entre 45 a 14 kDa. No gel dos frutos as proteínas foram melhor reveladas. Os géis das folhas e frutos apresentam semelhanças, porém no fruto existe conjunto de proteínas observadas entre 30 – 40 kDa. Moore e Hopke (2001) relataram

que as enzimas PKS do tipo III estão inseridas nessa faixa de peso molecular, e constituem enzimas importantes para a formação de diversos metabólitos.

Figura 45: 2D SDS-PAGE das folhas (A) e frutos (B) de *P. arboreum*. Separação entre pI 3-10 (IPG 3-10 Linear) e padrão de MW entre 14 e 97 kDa. Massa aplicada: 250 µg de proteína total.



6.7 Síntese de precursores biossintéticos

6.7.1 Determinação estrutural dos precursores sintetizados.

A identificação dos precursores sintetizados (ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico e ácido ferúlico) foi realizada por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). A comparação dos dados obtidos com a literatura corroborou para confirmação das substâncias sintetizadas. Dados experimentais da síntese dos compostos marcados e não marcados estão descritos na parte experimental.

6.7.1.1 Ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico

O ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico (Figura 46, p.113) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. Seu espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) apresentou sinais característicos de hidrogênio H α e H β a carbonila com valores em δ 6,38 e δ 7,49, respectivamente. Os sinais em δ 7,36, 6,94 e 7,15 relativos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' respectivamente, confirmaram a presença do anel aromático tri-substituído enquanto o singlete em δ 6,06 é referente ao hidrogênio

metilenodioxílico (Figura 47, p. 114). No espectro de RMN de ^{13}C , foi possível observar um sinal em δ 168,2 atribuído ao C-1' da carboxila, além de cinco sinais em δ 117,5, 144,3, 108,9, 107,1 e 125,1 relativos aos carbonos sp^2 da dupla e do anel aromático respectivamente. O sinal em δ 101,1 foi atribuído ao C-7' metilenodioxifenílico e os três sinais em δ 129,1, 148,4 e 149,5, são relativos aos carbonos sp do anel aromático C-1', C-3' e C-4' respectivamente (Figura 48, p. 115). Os dados obtidos (Tabela 13), comparados com a literatura (FERREIRA, 2006), confirmam a estrutura do ácido ferúlico para molécula sintetizada.

Figura 46: Estrutura química do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico

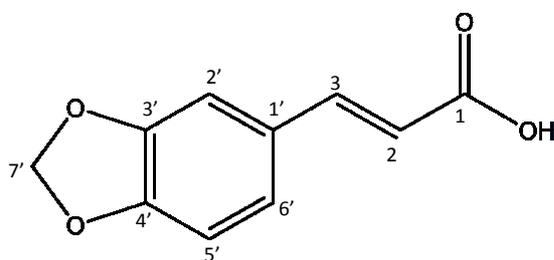


Tabela 13: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) e ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico comparados com dados da literatura (FERREIRA, 2006).

Posição	Dados experimentais		Dados da literatura	
	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))	δ ^{13}C	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))	δ ^{13}C
1	-	168,2	-	168,9
2	6,38 (1H, d, 15,9)	117,5	6,32 (1H, d, 15,7)	117,3
3	7,49 (1H, d, 15,9)	144,3	7,48 (1H, d, 16,01)	144,0
1'	-	129,1	-	128,9
2'	7,36 (1H, d, 1,5)	108,9	7,36 (1H, d, 1,5)	108,6
3'	-	148,4	-	148,2
4'	-	149,5	-	149,3
5'	6,94 (1H, d, 8,1)	107,1	6,86 (1H, d, 8,0)	106,9
6'	7,15 (1H, dd, 1,5 e 8,1)	125,1	7,08 (1H, dd, 1,5 e 8,0)	124,8
7'	6,06 (2H, s)	101,1	6,10 (2H, s)	101,7

Figura 47: Espectro e expansão de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) do ácido 3',4'- metilenodioxicinâmico.

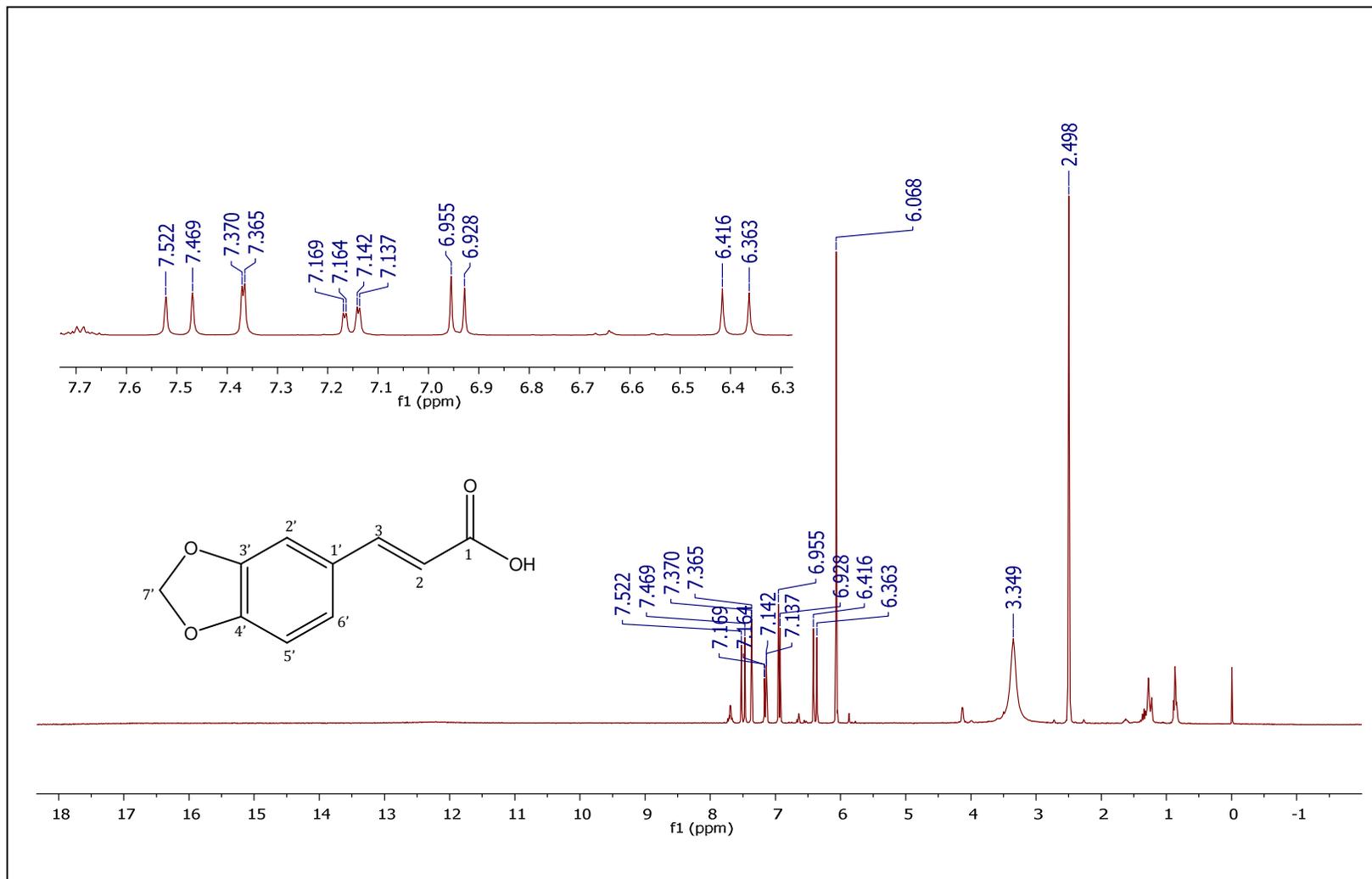
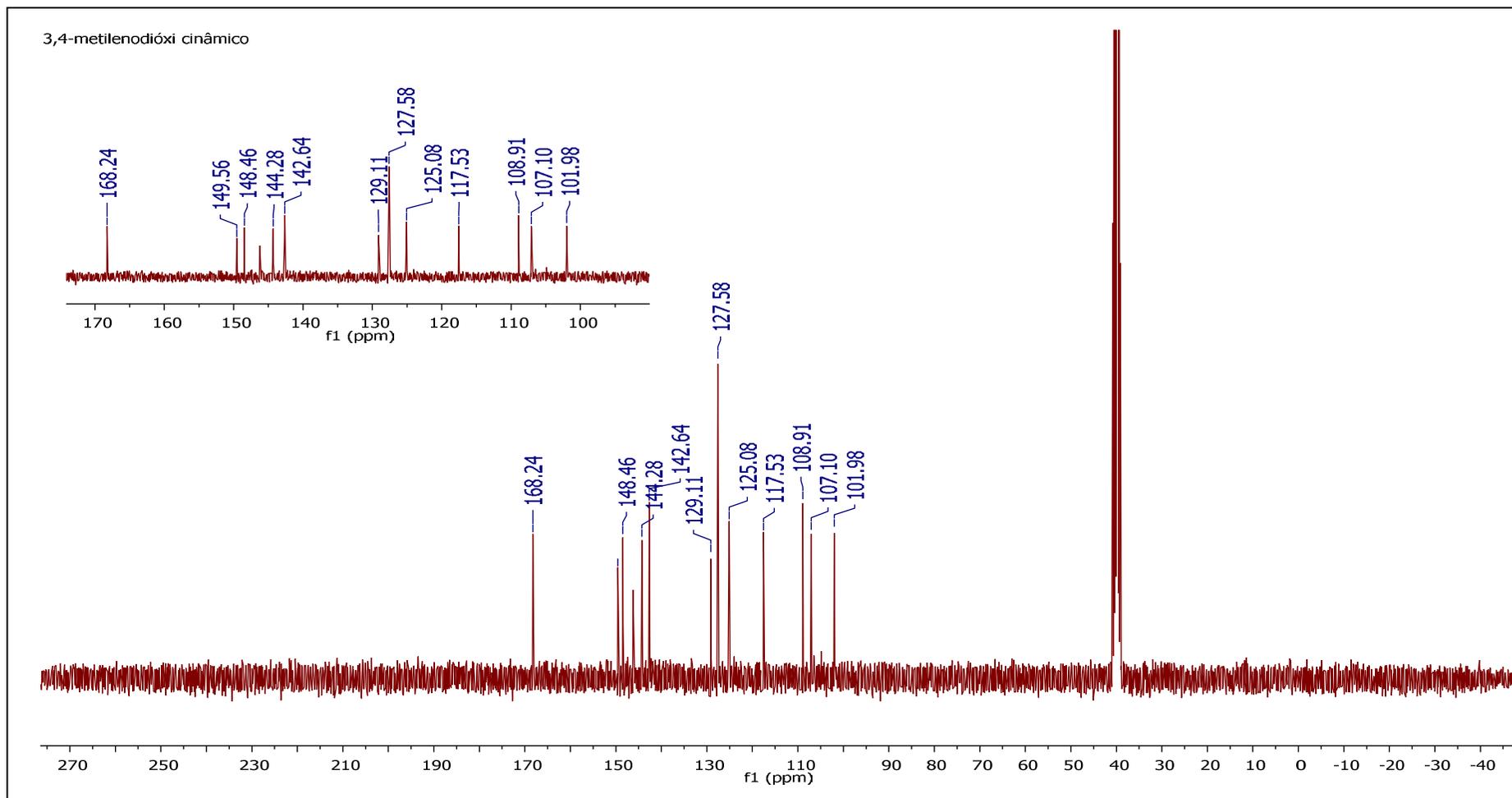


Figura 48: Espectro e expansão de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do ácido 3',4'- metilenodioxicinâmico.

6.7.1.2 Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (Figura 59), foi obtido como um sólido amorfo de coloração branca. Seu espectro de RMN de ^1H (DMSO d_6 , 500 MHz), apresentou dois dubletos característicos de alcenos em sistemas aromáticos $\text{C}_6\text{-C}_3$, com sinais em δ_{H} 6,36 e δ_{H} 7,49, com constante de acoplamento 15.9 Hz respectivamente. Os sinais em δ 7,28, 6,79 e 7,08 foram atribuídos aos hidrogênios H-2'', H-5'' e H-6'' respectivamente, confirmando a presença do anel aromático tri-substituído. A presença dos hidrogênios da metoxila foram confirmados pela presença de um singleto em δ 3,82 (Figura 50, p. 118). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um sinal característico de carboxila em δ 168,4 atribuído ao C-1, além dos sinais em δ 123,2, 116,1 e 111,6 relativos aos carbonos sp^2 do anel aromático. Os sinais em δ 144,9 e δ 115,9 são característicos de carbonos sp^2 *alfa* e *beta*, em relação à carbonila, respectivamente, enquanto o sinal em δ 56,1 é relativo ao carbono de metoxila (Figura 51, p. 119). Os dados obtidos, comparados com a literatura (REGASINI et al., 2008), confirmam a estrutura do ácido ferúlico para molécula sintetizada (Tabela 14, p. 117).

Figura 49: Estrutura química do ácido ferúlico

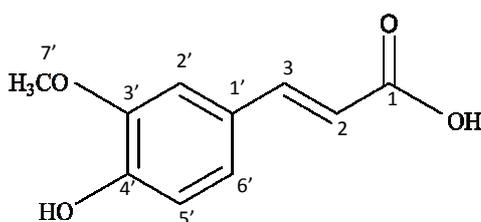


Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do ácido ferúlico comparados com os dados da literatura (REGASINI et al, 2008).

Posição	Dados experimentais		Dados da literatura	
	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))	δ ^{13}C	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))	
1	-	168,4	-	
2	6,36 (1H, <i>d</i> , 13,5)	115,9	6,23 (1H, <i>d</i> , 16,0)	
3	7,49 (1H, <i>d</i> , 13,5)	144,9	7,53 (1H, <i>d</i> , 16,0)	
1'	-	126,2	-	
2'	7,28 (1H, <i>d</i> , 1,5)	111,6	δ7,12 (1H, <i>d</i> , 2,5)	
3'	-	149,5	-	
4'	-	148,3	-	
5'	6,79 (1H, <i>d</i> , 7,0)	116,1	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,5)	
6'	7,08 (1H, <i>dd</i> , 1,5 e 7,0)	123,2	7,04 (1H, <i>dd</i> , 2,5 e 8,5)	
7'	3,82 (3H, <i>s</i>)	56,1	δ3,90 (3H, <i>s</i>)	

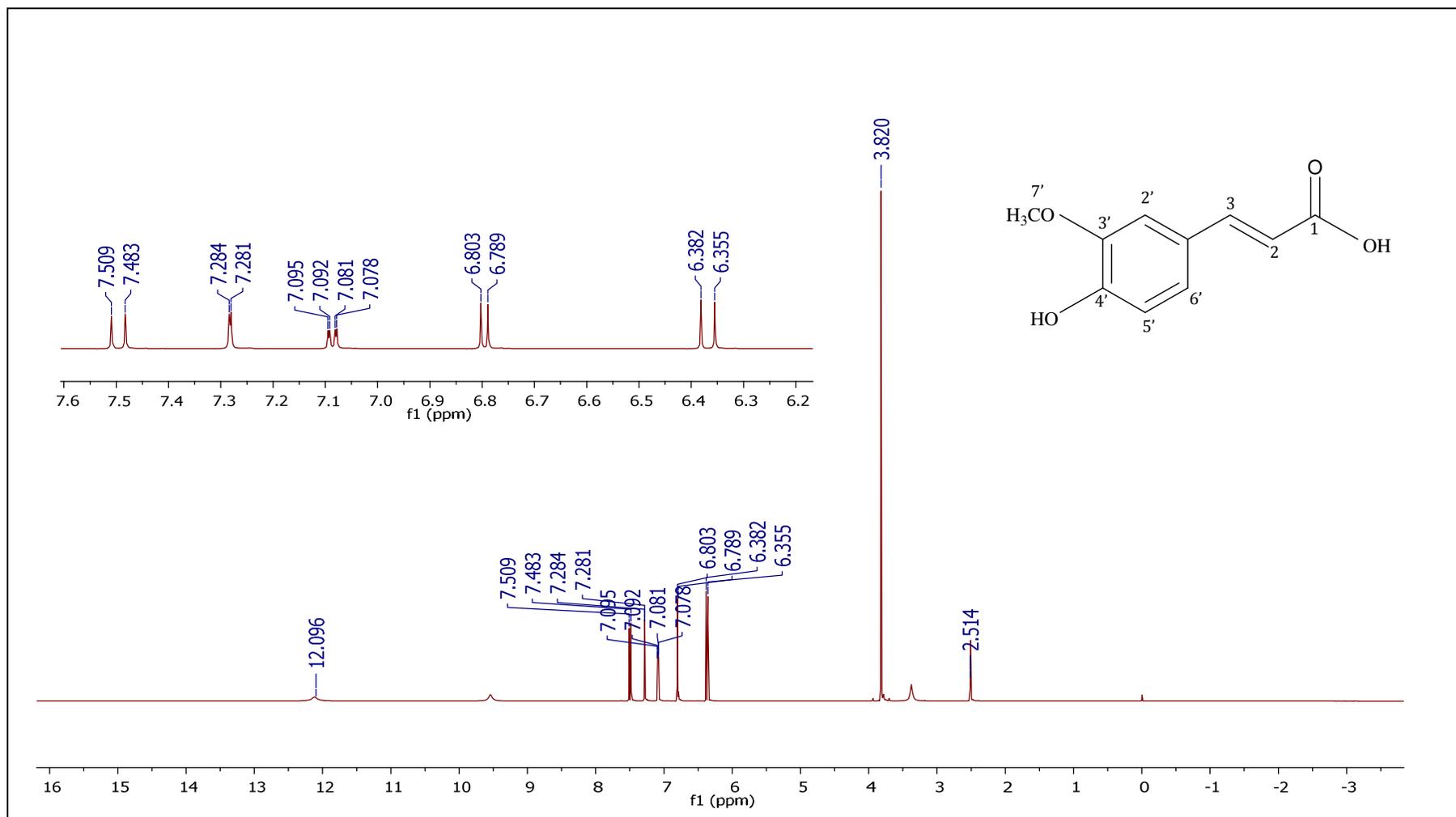
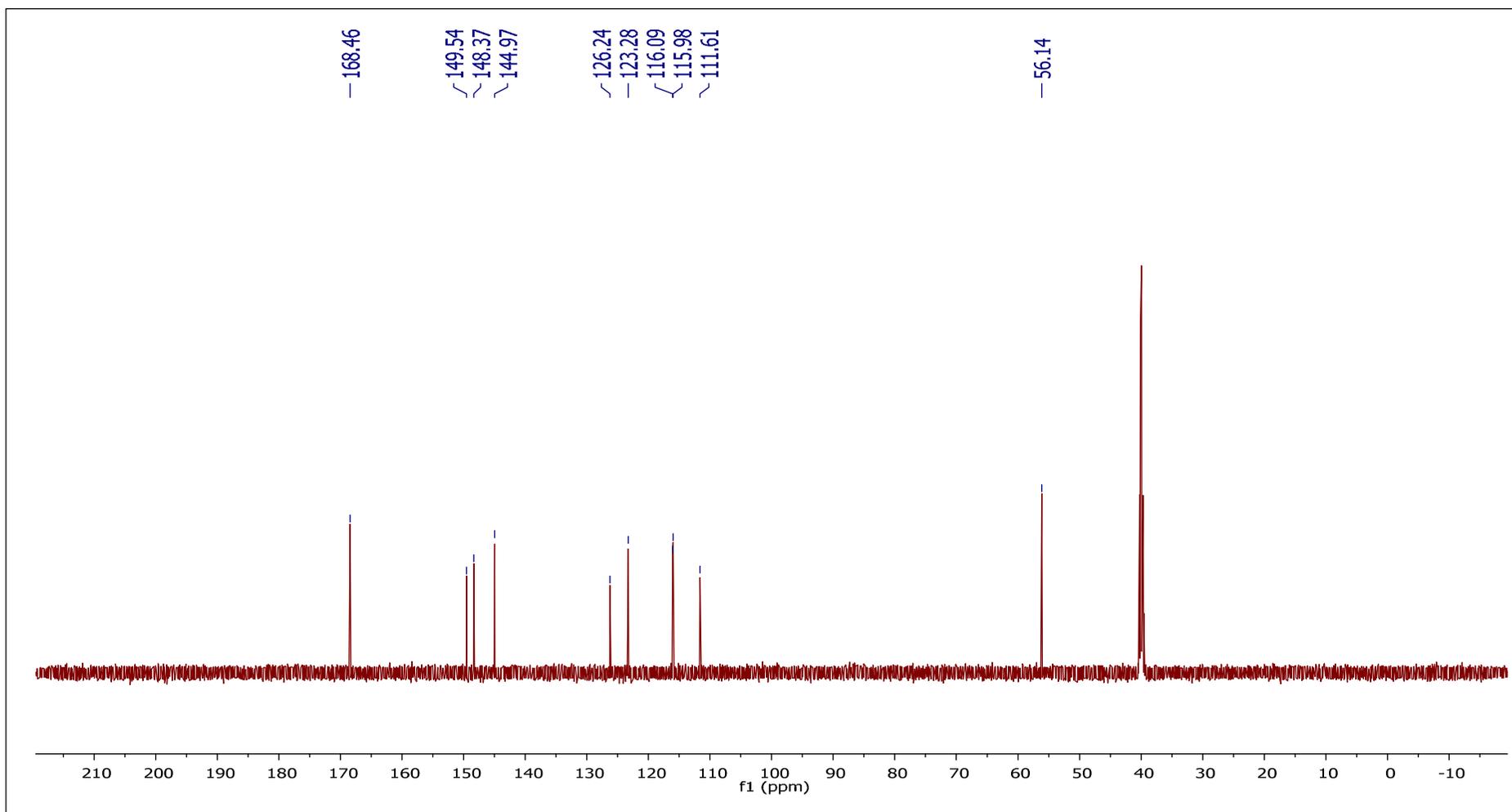
Figura 50: Espectro e expansão de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido ferúlico.

Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do ácido ferúlico.

6.7.2 Determinação estrutural dos precursores marcados.

6.7.2.1 Ácido [1-OD,2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico

A análise ácido [1-OD, 2-D]- 3', 4' metilenodioxicinâmico (Figura 52), mostrou sinais de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) em δ 7,36, 6,94 e 7,15, relativos aos hidrogênios metínicos H-2', H-5' e H-6' respectivamente, confirmando a presença do anel aromático tri-substituído, enquanto o hidrogênio do grupo metilenodioxílico mostrou sinal em δ 6,07. O padrão de marcação para o composto sintetizado foi confirmado através da modificação da multiplicidade do sinal em δ 7,50 ($J = 13,5$ Hz) de um duplete para um singleto (δ 7,49) (Figura 53, p.121). Este resultado está relacionado à mistura de compostos marcados e não marcados, uma vez que o ácido malônico deuterado não era totalmente puro. Dados espectrais podem ser visto na Tabela 15.

Figura 52: Estrutura química do ácido [1-OD, 2-D]-3', 4' metilenodioxicinâmico.

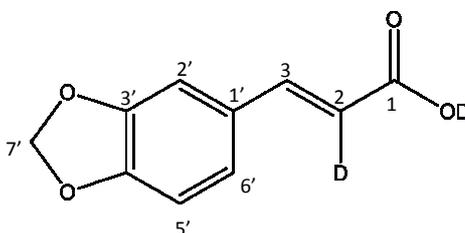


Tabela 15: Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do ácido [1-OD,2-D]- 3',4'-metilenodioxicinâmico.

Posição	δ ^1H (H, multiplicidade, J (Hz))
3	7,49 (1H, s)
2'	7,36 (1H, d, 1,0)
5'	6,94 (1H, d, 6,5)
6'	7,15 (1H, dd, 1,0 e 6,5)
7'	6.07 (2H, s)

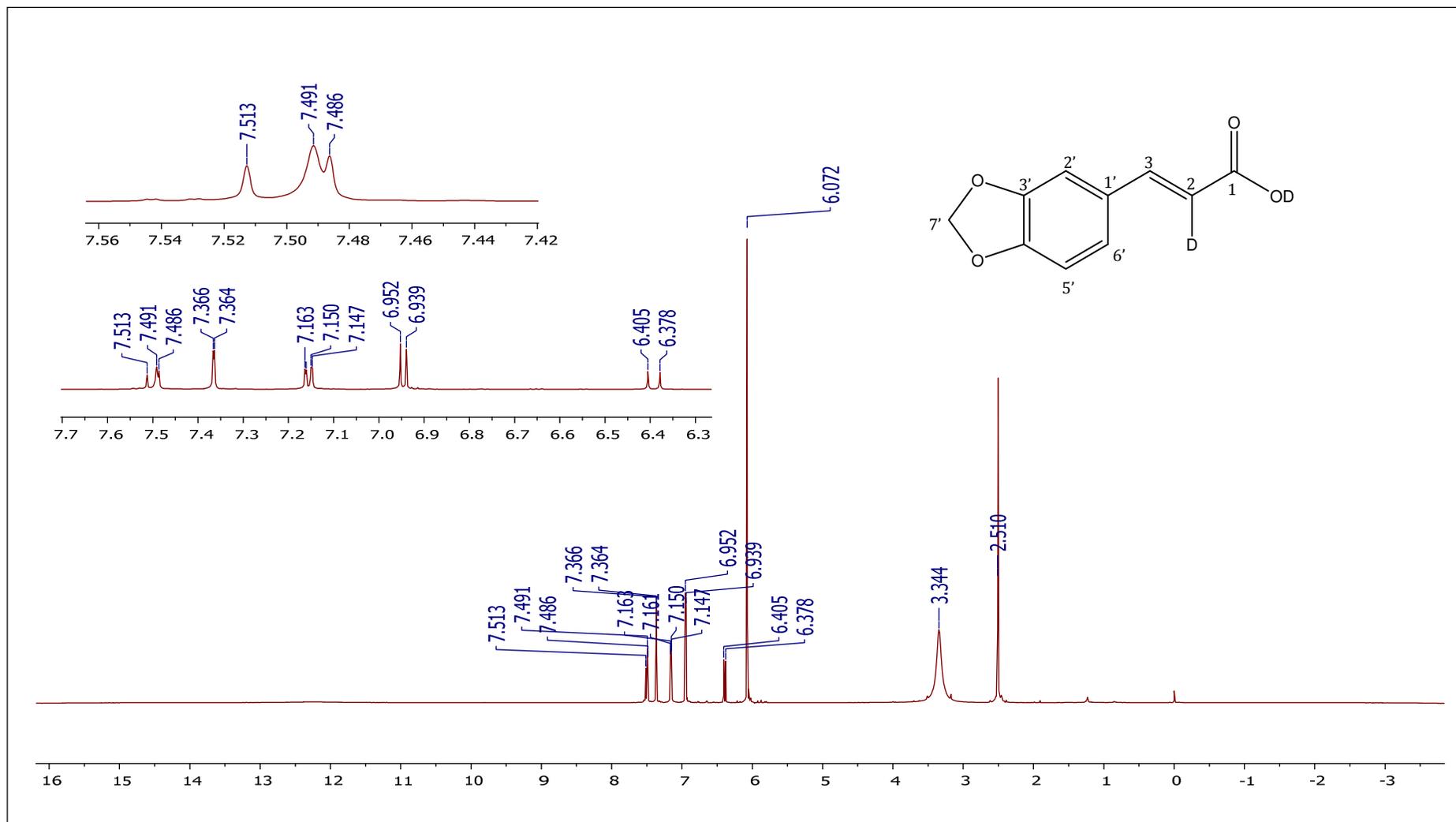
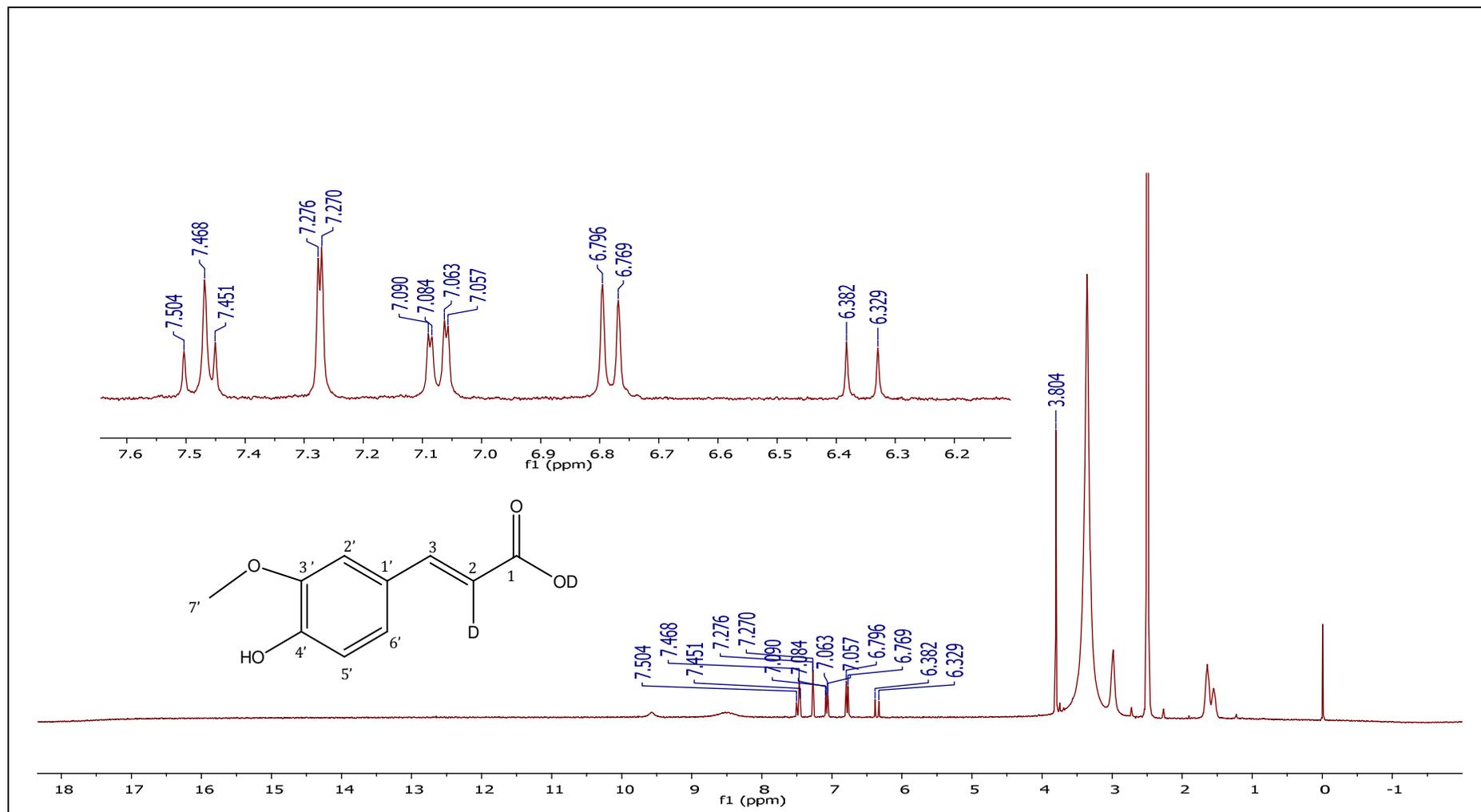
Figura 53: Espectro e expansão de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido [1-OD,2-D]-3',4'-metilendioxicinâmico.

Figura 55: Espectro e expansão de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) do ácido [1-OD,2-D]- ferúlico.



6.8 Reação Enzimática

Ensaio para incorporação de precursores nos extratos enzimáticos em *Piper* tem sido alvo de pesquisa por algum tempo em nosso grupo. A partir de extratos enzimáticos da espécie *Piper arboreum*, Silva (2004) monitorou as atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), acetil coenzima A (CoA) e formação da amida pela administração de precursor marcado *L*-fenilalanina-[U-¹⁴C]. Em *Piper tuberculatum*, Navickiene (2002) mostrou que a enzima SCoA-ligase está envolvida na ativação do ácido cinâmico, sugerindo que este metabólito é o precursor da unidade C₆-C₃, e que a oxidação do anel ocorre via enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450. Esta espécie também foi investigada por Cotinguiba (2011) que monitorou as atividades de diversas enzimas presentes nesta espécie, que são chaves para reações iniciais da via fenilpropanoídica, como a fenilalanina amônia-liase (PAL) e cinamato 4-hidroxilase (C4H) e a atividade da enzima oxidoredutase do tipo citocromo P-450 na conversão do ácido ferúlico ao ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico.

Com o intuito de determinar a participação do ácido ferúlico e do ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico como intermediários na biossíntese das amidas pirrolidínicas, foi realizado um experimento para síntese desses intermediários marcados com deutério. Os precursores, ácido malônico e *L*-ornitina, foram adicionados nos extratos enzimáticos juntamente com os precursores marcados. A condição da otimização *in vitro* foi realizada utilizando protocolos realizados pelo grupo de pesquisa com algumas modificações. A melhor condição encontrada foi utilizando-se a temperatura de 31 °C e tempo reacional de 90 minutos.

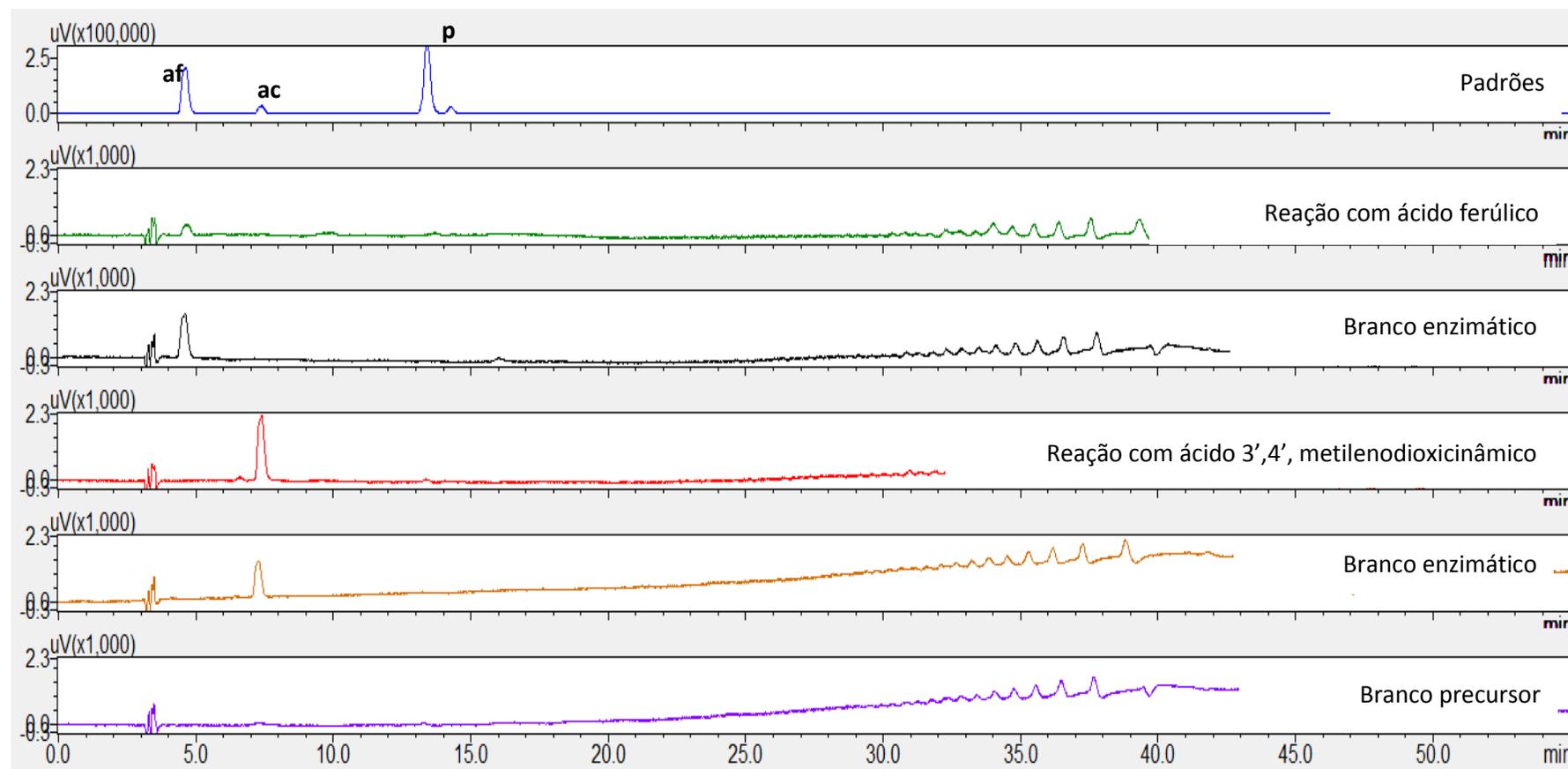
A confirmação do produto foi realizado através de comparação dos tempos de retenção e UV obtidos com seus padrões injetados em CLAE nas mesmas condições.

A análise dos resultados utilizando a fração enzimática das folhas jovens (Figura 56, p. 126), mostrou que não houve formação do produto. Este resultado pode ser justificado pela falta das enzimas responsáveis pela formação do produto nesta fase da planta, ou pela presença de algum outro interferente.

Para as frações enzimáticas utilizando as folhas da planta adulta e os precursores separadamente, foi observado a formação do produto com o mesmo tempo de retenção e UV do padrão ($t_R=13,04$) (Figura 57, p. 127). O mesmo experimento foi realizado com o frutos da planta adulta, no entanto, não foi observado

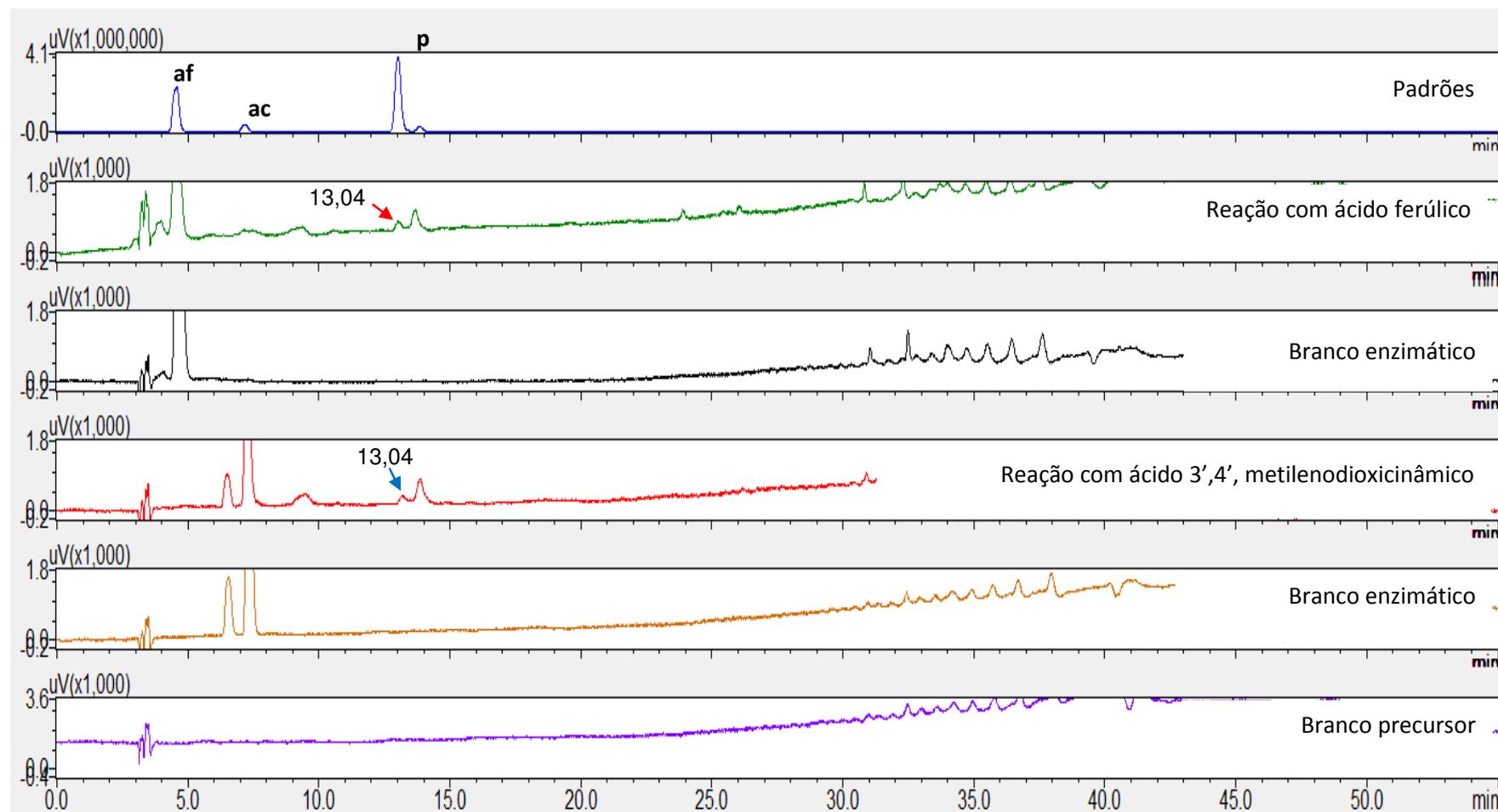
a formação do produto esperado (Figura 58, p. 128). Em outro experimento utilizando os dois precursores juntos com a fração enzimática das folhas da planta adulta, foi observado a formação do produto com mesmo tempo de retenção e UV do padrão ($t_R=12,81$) (Figura 59, p. 129). De acordo com os dados experimentais, os precursores: o ácido ferúlico e o ácido 3',4'-metilenodioxicinâmico participam da rota biossintética da piperilina sendo dependentes de enzimas ativas para formação do produto.

Figura 56: Reação enzimática utilizando as folhas da planta jovem e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilendioxicinâmico.



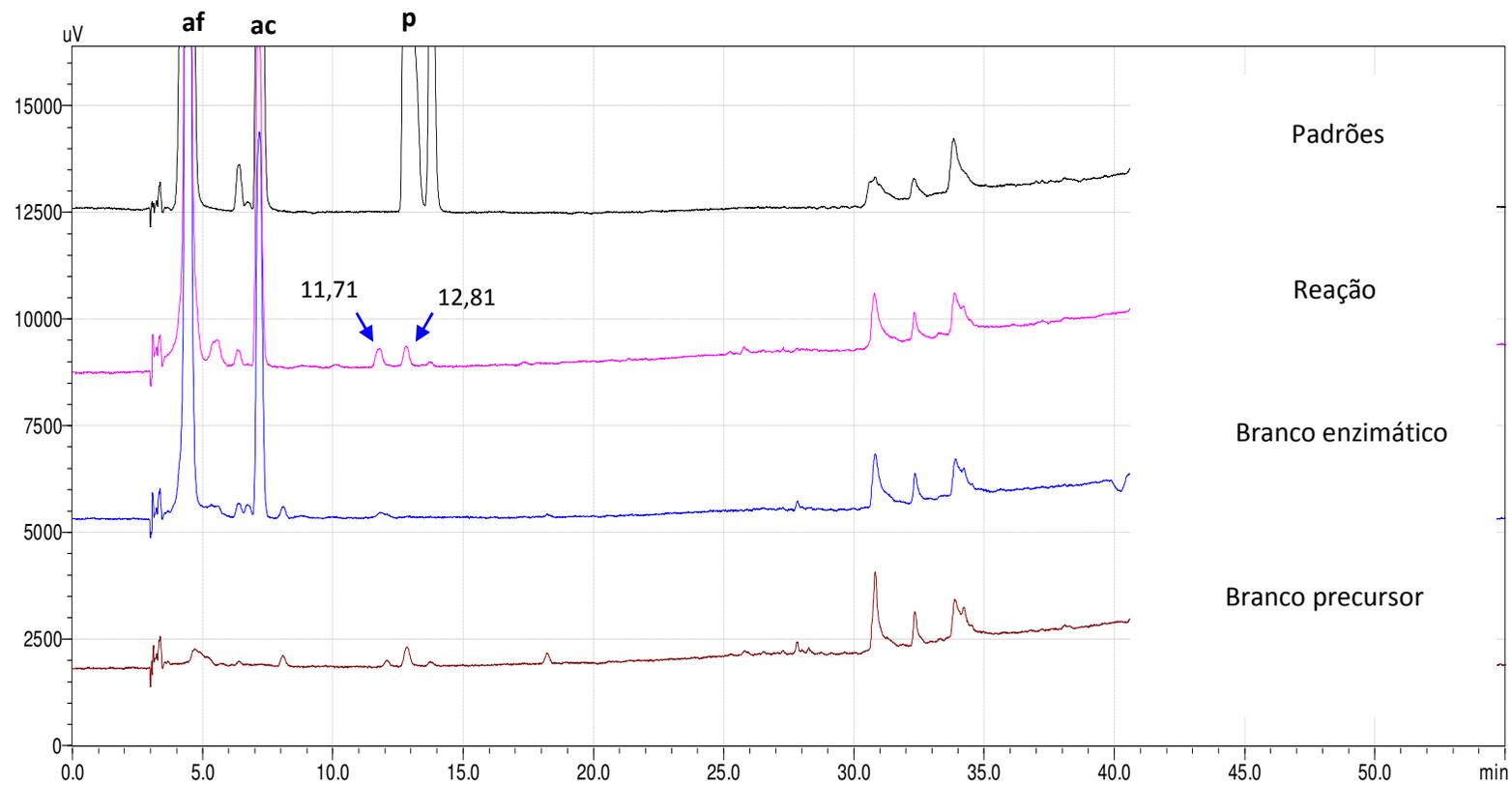
af - ácido ferúlico ($t_R=4,62$ min.); **ac** - ácido 3',4'metilendioxicinâmico ($t_R=7,39$ min.); **p** - piperilina ($t_R=13,04$ min.)

Figura 57: Reação enzimática utilizando as folhas planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilendioxicinâmico



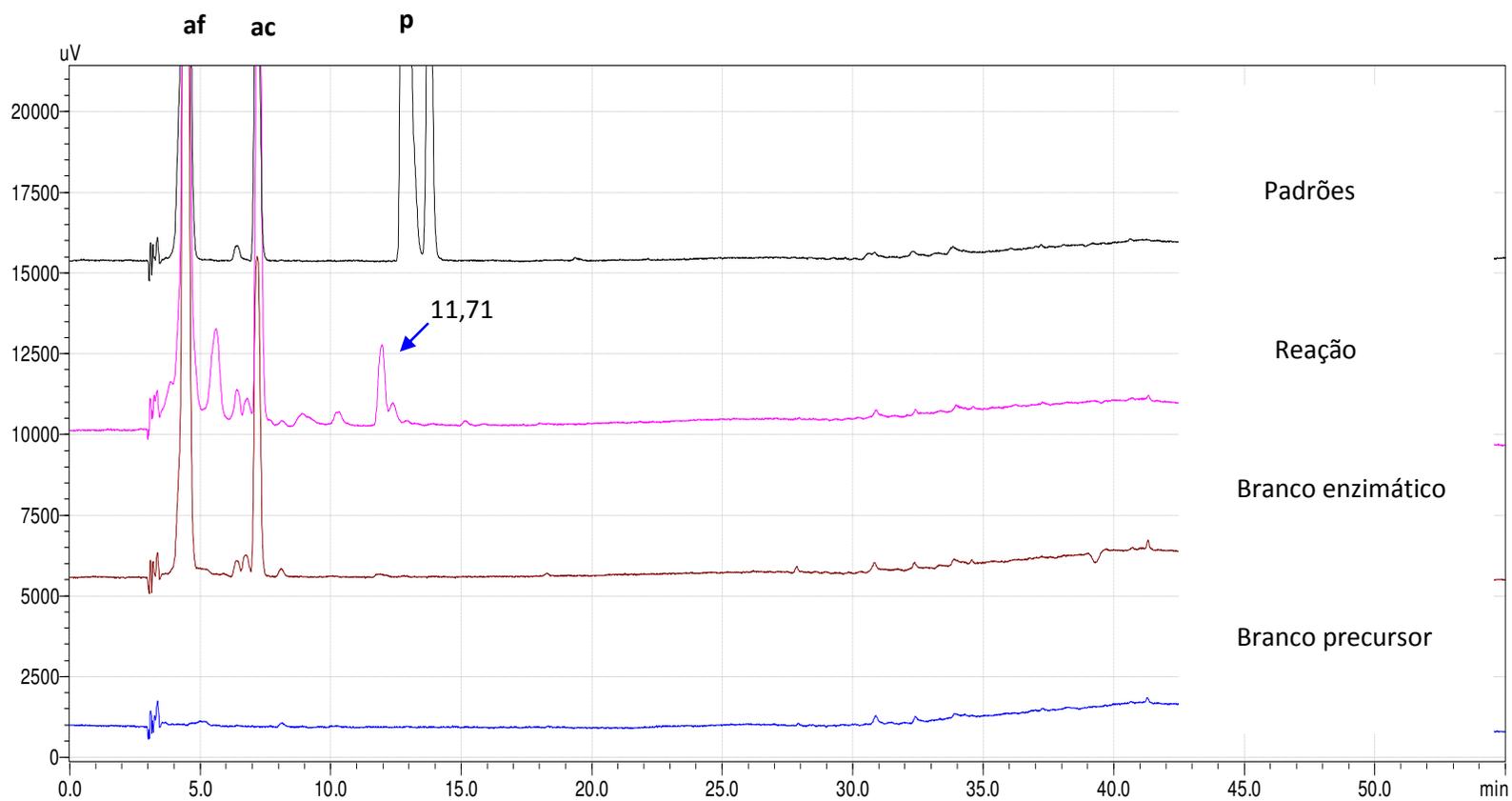
af - ácido ferúlico ($t_R=4,62$ min.); **ac** - ácido 3',4'metilendioxicinâmico ($t_R=7,39$ min.); **p** - piperilina ($t_R=13,04$ min.)

Figura 58: Reação enzimática utilizando os frutos planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilendioxicinâmico.



af - ácido ferúlico ($t_R=4,46$ min.); **ac** - ácido 3',4'metilendioxicinâmico ($t_R=7,21$ min.); **p** - piperilina ($t_R=12,82$ min)

Figura 59: Reação enzimática utilizando as folhas planta adulta e os precursores marcados, ácido ferúlico e 3',4' metilendioxicinâmico.



af - ácido ferúlico ($t_R=4,46$ min.); **ac** - ácido 3',4'metilendioxicinâmico ($t_R=7,21$ min.); **p** - piperilina ($t_R=12,82$ min)

6.9 Atividade Biológica

Algumas classes de substâncias presentes em espécies de Piperaceae têm despertado interesse da comunidade científica por apresentar importantes atividades biológicas, além de serem utilizadas para fins industriais e como fármacos. A indústria alimentícia tem utilizado óleo essencial de *Piper auritum* como condimento e as folhas para alimentação de peixes (CONDE-HERNÁNDEZ e GUERRERO-BELTRÁN, 2014).

As lignanas isoladas de *Peperomia blanda*, foram ativas em ensaios com tripanossoma (FELIPPE et al, 2008) e apresentaram importante atividade frente o vírus hepatite C, assim como as kavalactonas isoladas de *Piper fuliginum*, (JARDIM, et al, 2015). Extratos, frações e óleos essenciais das folhas de *P. arboreum* foram avaliados frente à bactéria *Staphylococcus aureus* e frente aos fungos *Microsporium gypseum* e *Epidermophyton. Floccosum*, mostrando potente atividade (NASCIMENTO et al, 2015). Os metabólitos isolados de *Piper carniconnectivum* mostraram potente atividade antileucêmica (FREITAS et al, 2014). Muitas espécie de *Piper* tem mostrado atividade antileishmania, destacando-se *Piper nigrum*, *Piper augustifolium*, *Piper clausseiaum*, *Piper betle* (FERREIRA et al., 2012; BOSQUIROLI et al, 2015; MARQUES et al, 2011; MISRA et al.; 2009).

As piperamidas são metabólitos já estudados pelo nosso grupo de pesquisa e seus derivados foram ativos em ensaios com tripanossoma (COTINGUIBA et al, 2009). *P. arboreum* e *P. tuberculatum* quando avaliadas apresentaram importantes atividade antifúngica, antitripanossoma e antioxidante (REGASINI et al, 2009a; REGASINI et al, 2009b, REGASINI et al, 2008; SILVA et al, 2002).

A avaliação dos extratos etanólicos das folhas, galhos e frutos de *Piper arboreum* mostraram significante atividade fungitóxica em ensaios contra fungos patogênicos (Tabela 17, p. 131).

Tabela 17: Atividade antifúngica dos extratos de *Piper arboreum*.

Extrato EtOH	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90180	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012
Folhas	31,2	62,5	31,2	125	62,5
Galhos	250	125	250	125	125
Fruto	250	62,5	250	62,5	31,2

CIM*- Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$); Controle positivo: Fluconazol e anfotericina B

Todas as amostras testadas foram capazes de inibir o crescimento dos fungos com concentração inibitória mínima com valor entre 31 a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato bruto das folhas mostrou atividade fungicida para *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato dos frutos apresentou potente atividade contra *C. krusei*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato dos frutos mostrou potente atividade contra *Cryptococcus neoformans* quando comparado com o extrato das folhas com valores de $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, o extrato etanólico de *Piper arboreum* mostrou ser promissor para a pesquisa de novas moléculas bioativas especialmente contra algumas cepas de fungos oportunistas.

Para avaliação antiinflamatória, o extrato etanólico de *P. arboreum*, na concentração de $0,097 \text{ mg/mL}$, desencadeou linfoproliferação de células do baço e a dose abaixo de $0,196 \text{ mg/mL}$ prejudicou a liberação de NO. Entretanto, não foram observadas diferenças na produção de H_2O_2 . A inibição da produção de NO pelo extrato bruto etanólico de *P. arboreum* destaca o seu potencial como uma opção interessante no tratamento de imunoterapia.

A piperilina, isolada dos frutos de *P. arboreum*, apresentou inibição de aproximadamente 50% da atividade da enzima tirosinase utilizando a concentração final de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando ser potente antioxidante.

O controle de formigas cortadeiras tem sido feito, preferencialmente, por inseticidas químicos, no entanto, estes são geralmente caros, causam sérios efeitos contaminantes no ambiente, tem efeitos tóxicos indesejáveis sobre espécies não-alvo e, por vezes, os resultados não são satisfatórios (HEBLING et al, 2000). Por outro lado, os agentes de controle biológicos conhecidos não têm sido muito eficientes na superação das defesas biológicas e comportamentais das formigas. Por estas razões,

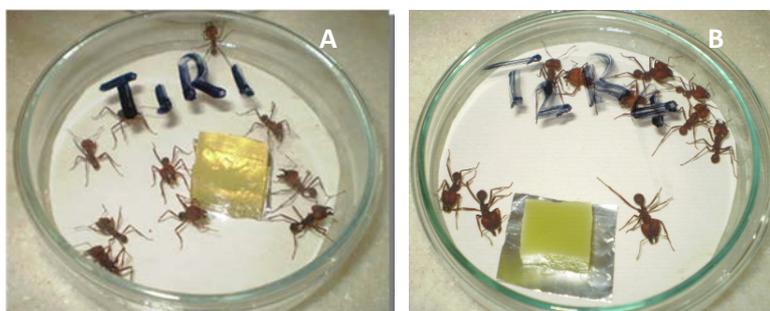
a busca de métodos alternativos de controle, eficientes, seletivos e amigos do ambiente é uma necessidade constante.

Neste sentido tem sido estudadas várias espécies de plantas que causam repelência, perturbação comportamental, efeito tóxico sobre as formigas e/ou um efeito inibitório sobre o fungo simbiótico, devido à presença de metabolitos secundários (QUINTANA et al., 2013).

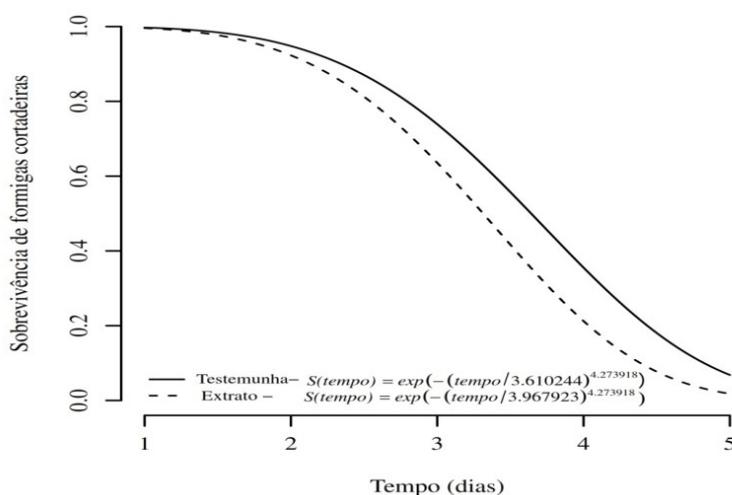
A atividade inseticida de *P. arboreum* sobre formigas cortadeiras (*Atta sexdens*) foi avaliada através da oferta de dietas artificiais sólidas preparadas com extrato bruto de *P. arboreum* (Figura 60). Outrossim, segundo Bueno et al (1997), o emprego de dietas artificiais, para bioensaios de laboratório, constitui a melhor opção quando se trabalha com formigas cortadeiras.

A análise de variância mostrou que a sobrevivência de formigas cortadeiras diferiu entre os tratamentos ($X^2 = 8,484$; $p = 0,0035$). O tratamento constituído pelo extrato testado provocou maior mortalidade quando comparado à testemunha (Figura 61, p. 133). Estes resultados corroboram com os encontrados por Bicalho et al. (2011) e Peñaflor et al. (2009), que observaram, em seus estudos, atividade inseticida de extratos bruto de plantas sobre as formigas cortadeiras *A. sexdens*. Compostos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas são fontes potenciais para o desenvolvimento de inseticidas de baixo risco, que diferem dos inseticidas sintéticos convencionais por sua baixa toxicidade aos mamíferos, rápida degradação, e disponibilidade local (ISMAN, 2006, 2008; REGNAULT-ROGER et al 2012)

Figura 60: Atividade inseticida: testemunha (A) e tratamento (B)



Fonte: arquivo pessoal

Figura 61: Curva de sobrevivência de operárias *Atta sexdens* mantidas com dietas artificiais sólidas.

Estes metabólitos podem ter vários efeitos sobre os insetos, incluindo ação inseticida, repelência, dissuasão de alimentação e oviposição e inibição do crescimento (EBADOLLAHI, 2013). Entretanto, um grande número de insetos é relatado alimentando-se de Piperaceae (RAUT e BHATTACHARYA, 1999). Portanto, apesar das evidências de que *Piper* spp. contêm esses compostos naturais de defesa, aparentemente, parece que alguns herbívoros de *Piper* podem alimentar-se com sucesso, até mesmo da fruta. No entanto, piperamidas isoladamente, ou mais importante, em combinação, ainda poderia substituir inseticidas de contato, especificamente compostos neurotóxicos, tais como carbamatos, organofosforados e piretróides, para os quais os insetos desenvolveram resistência. Uma combinação destas amidas, dentro de uma formulação botânica, poderia, assim, fornecer inúmeras vantagens no controle de insetos (SCOTT et al., 2007).

7 CONCLUSÕES

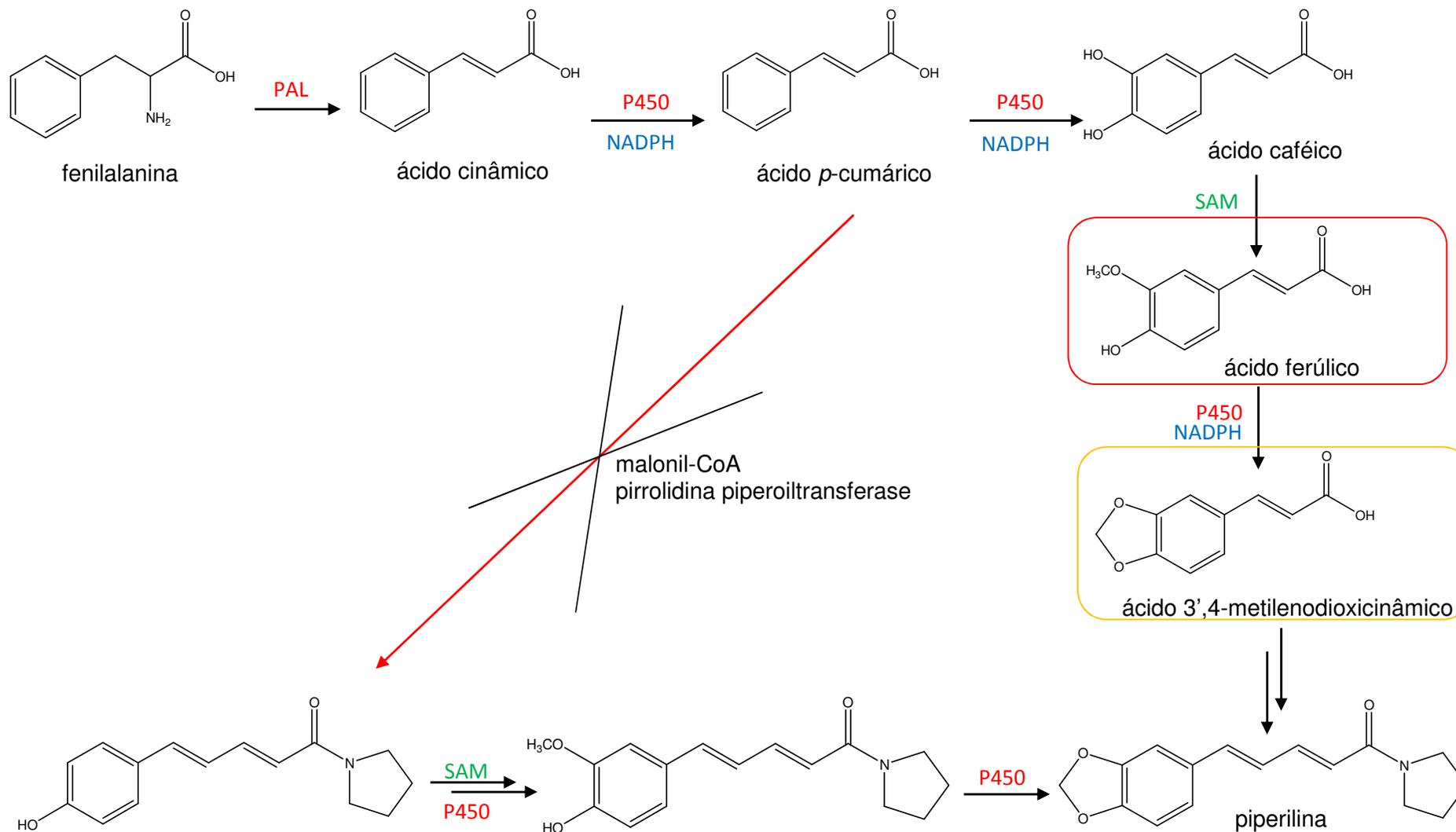
O isolamento da piperilina (**1**), utilizada como padrão, permite o monitoramento da produção da amida em todas as partes da planta e revela um maior acúmulo nos frutos. A análise sazonal e circadiana por CLAE-DAD mostra que o acúmulo da piperilina ocorre nos períodos de maior disponibilidade hídrica.

Experimentos de biossíntese, utilizando-se acetato de sódio marcado ($\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$) e folhas da planta adulta de *P. arboreum*, permitiram estabelecer que o acetil no final da extensão da cadeia, na estrutura, tem origem na via do acetato. A participação dos precursores marcados, ácido [1-OD, 2-D]-ferúlico e ácido [1-OD, 2-D]-3', 4' metilendioxicinâmico como intermediários biossintético, pôde ser evidenciada nas reações enzimáticas, com a formação da amida.

A análise do gel em poli(acrilamida) das folhas e frutos de *P. arboreum*, mostra a presença de bandas características de enzimas envolvidas nos metabolismos primário e secundário. No primário, as bandas em 55 e 14 KDa são indicativas da Rubisco, enzima presente no estroma dos cloroplastos que catalisa as reações de carboxilação/oxidação no ciclo de Calvin. No metabolismo secundário, as bandas em 77-83 atribuídas à fenilalanina amônia-liase (PAL), enzima chave na formação do ácido cinâmico, precursor de fenilpropanoídicos, compostos importantes para a fisiologia e proteção de plantas; As bandas em 40 a 47 KDa podem ser relativas as poliacetil sintases, enzimas que catalisam a condensação de unidades de acetato promovendo a extensão da cadeia. Com base nessas evidências experimentais, uma possível rota biossintética para formação da piperilina está sendo proposta (Figura 62, p. 135).

O extrato etanólico das folhas mostra potente atividade para as cepas fúngicas oportunistas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, enquanto o extrato do fruto, atividade contra *C. krusei*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. O ensaio *in vitro* da piperilina frente à enzima tirosinase mostra inibição de 50% da atividade da enzima, destacando importante atividade antioxidante. O extrato das folhas avaliado frente à atividade antiinflamatória e inseticida destaca o seu potencial como uma opção interessante no tratamento de doenças imunossupressoras e controle de pragas respectivamente.

Figura 62: Nova proposta biossintética para formação da piperilina.



REFERÊNCIAS

- ALBAGLI, S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 7-10, jan./abr. 1998.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H. B. & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19 n. 2, p. 305-312, 2005.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 379-371, jul/set. 2006.
- ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 637-639, 1998.
- AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. L. B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster), an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 448-454, 2007.
- AUFFRAY, C.; IMBEALD, S.; ROUX-ROUQUIÉ, M.; HOOD, L. From functional genomics to systems biology: concepts and practices. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 879-892, 2003.
- BACHER, A.; RIEDER, C.; DIETMAR, E.; ARIGONI, D.; FUCHS, G.; EISENREICH, W. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 567-598, 1999.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.
- BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (PIPERACEAE). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.
- BARBOSA FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 109-139, 2006.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromenes derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 538-540, 2008.

- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.
- BENÍTEZ, N. P.; MELENDEZ, E.; STASHENKO, E. E. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, n. 4, p. 301-304, 2009.
- BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1406-1409, 2005.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SAKER NETO, N.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 453-463, 2013.
- BICALHO, K. U.; TEREZAN, A. P.; MARTINS, D. C.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/785424.
- BOSQUIROLI, L. S. S.; DEMARQUE, D. P.; RIZK, Y. S.; CUNHA, M. C.; MARQUES, M. C. S.; MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C. T.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. P. In vitro anti-leishmania infantum activity of essential oil from *Piper angustifolium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 124-128, 2015.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2 p. 248-254, 1976.
- BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.
- BURCI, L. M.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; RODRIGUES, R. V.; FACUNDO, V. A.; MILITÃO, J. S. L. T.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 165-174, 2013.
- CAMPOS, W. H.; MIRANDA NETO, A.; PEIXOTO, H. J. C.; GODINHO, L. B.; SILVA, E. Contribuição da fauna silvestre em projetos de restauração ecológica no Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 429-440, 2012.
- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

- CARVALHO, M. C.; TAVOLONI, P. Dieta das principais espécies de morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) da Estação Experimental Agrozootécnica “Hildegard Georgina Von Pritzelwitz”, Londrina, Paraná. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** São Paulo, SP: SEB, 2007.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa-MG: UFG, 2004. 113 p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 98-105, 1998.
- CHEN, S.; HUANG, H.-Y.; CHENG, M.-J.; WUA, C.-C.; ISHIKAWA, T.; PENG, C.-F.; CHANG, H.-S.; WANG, C.-J.; WONG, S.-L.; CHEN, I.-S. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203-209, 2013.
- CHENG, M. J.; LEE, S.-J.; CHANG, Y.-Y.; WU, S.-H.; TSAI, I.-L.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I.-S. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia* sp. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, 2003.
- CONDE-HERNÁNDEZ, L. A.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. **Food Chemistry**, v. 142, p. 455-460, 2014.
- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.
- COTINGUIBA, F. **Investigação biossintética, transcriptômica e proteômica em espécies de Piperaceae**. 2011. 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICALI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, Dec. 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262 p.
- CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural product from plants**. Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis, 2006. 611 p.

CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 642-647, 2012.

CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; COCCO, L. C.; LOPES, A. R.; YAMAMOTO, C. J.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato e raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, p. 746-749, 2006.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four *Piper* species from the state of Ceará - northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1378-1381, 2005.

DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, n. 555-559, 2003.

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

Di STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Florida: CRC Press, 1994. 215 p.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. **Piper: a model genus for studies of evolution, chemical ecology and tropic interactions**. New York: Klumer Academic, 2004. 228 p.

EBADOLLAHI, E. Essential oils isolated from Myrtaceae family as natural insecticides. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 3, 148-175, 2013.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN, J. V. Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 490-495, 2002.

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

ENGLARD, S; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; PISANGO, M. T.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evolution of the leishmanicidal activity of plants used by *Peruvian Chayahuita* ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 254-259, 2007.

FELIPPE, L. G. ; BALDOQUI, D. C. ; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S. ; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B ; FURLAN, M. Thypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445-450, 2008.

- FELIPPE, L. G.; BATISTA JUNIOR, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Piperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 245-249, 2011.
- FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v.4, n 3, p. 208-224, 2012.
- FLORES-SANCHEZ, I. J.; VERPOORTE, R. Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 167-174, 2009.
- FREITAS, G. C.; BATISTA JUNIOR, J. M.; FRANCHI JUNIOR, G. C.; NOWILL, A. E.; YAMAGUCHI, L. F.; FILCACHAGUA, J. D.; FAVARO, D. C.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; JEFFREY, C. F.; KATO, M. J. Cytotoxic non-aromatic B-ring flavanones from *Piper carniconnectivum* C. DC. **Phytochemistry**, v. 97, p. 81-87, 2014.
- FU, J.; YANG, L.; DAI, S. Conservation of *Arabidopsis thaliana* circadian clock genes in *Chrysanthemum lavandulifolium*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 337-347, 2014.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B. **Biodiversidade**: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.
- GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I. da; SILVA, M. L. da; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia. VII. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 143-148, 1981.
- GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 355, p. 1499-1510, 2000.
- GRACE, S. C.; LOGAN, B. A.; ADAMS III, W. W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 513-521, 1998.
- GUERRIERO, M. L.; POKHILKO, A.; FERNÁNDEZ, A. P.; HALLIDAY, K. J.; MILLAR, A. J.; HILLSTON, J. Stochastic properties of the plant circadian clock. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 744-756, 2012.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39-48, 2009.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-97, 2010.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-26, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; SILVA, M. C.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E. S.; QUEIROZ, G. A. Piperaceae. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 26 ago. 2015.

HAMEDT, A. L.; ORTIZ, I. C.; GARCÍA-HUERTAS, P. A.; SÁENZ, J.; ARAUJO, A. C. de; MATTOS, J. C. P.; RODRÍGUEZ-GAZQUEZ, M. A.; TRIANA-CHÁVEZ, O. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericoense* with trypanocidal action. **Acta Tropica**, v. 131, p. 92-97, 2014.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, n. 1, p. 177-188, 1996.

HASHEMITABAR, M.; KOLAH, M.; TABANDEH, M. R.; JONOUBI, P.; MAJD, H. cDNA cloning, phylogenetic analysis and gene expression pattern of phenylalanine ammonia-lyase in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 456-465, 2014.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hym. Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, n. 5/6, p. 249-252, 2000.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. **Plant biochemistry**. 4th ed. Londres: Academic Press, 2011. 630 p.

IMAIZUMI, T. Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 83-89, 2010.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Management Science**, v. 64, p. 8-11, 2008.

- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 3, p. 403-416, 2004.
- JARDIM, A. C. G.; IGLOI, Z.; SHIMIZU, J. F.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; AMAKO, Y.; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 115, p. 39-47, 2015.
- KANIS, L. A.; RABELO, B. D.; MOTERLE, D.; NOGARETTIA, R. M.; NUNES, T.; SILVA, O. S.; PROPHIRO, J. S. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 816-820, 2013.
- KAOU, A. M.; LEDDET, V. M.; CANLET, C.; DEBRAUWER, L.; HUTTER, S.; AZAS, N.; OLLIVIER, E. New amide alkaloid from the aerial part of *Piper capense* L.f. (Piperaceae). **Fitoterapia**, v. 81, p. 632-635, 2010.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, p. 529-538, 2007.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431 p.
- LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.
- LANDOLINO, A. B.; COOK, D. R. Phenylpropanoid metabolism in plant: biochemistry, functional biology, and metabolic engineering. In: FRAGA, C. G. (Ed.). **Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. Chap. 21, p. 489-563.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994.
- LEYVA, A.; JARILLO, J. A.; SALINAS, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. **Plant Physiology**, v. 108, n. 1, p. 39-46, 1995.
- LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, H. P.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 274-282, 2012.

- LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal pattern in phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 6, p. 681-686, 1987.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biosíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press, 2007. 272 p.
- LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JÚNIOR, J. M.; AMBRÓSIO, D. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Products Research**, v. 22, n. 12, p. 1040-1046, Sept. 2008.
- LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA JÚNIOR, J. M.; FLAUSINO JÚNIOR, O.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4251-4260, 2010.
- MACEDO JÚNIOR, F. C. de. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.
- MACHADO, C. G.; ROCCA, M. A. Protocolos para estudo de polinização por aves. In: Von MATTER, S.; STRAUBE, F. C.; ACCORDI, I. A.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO JUNIOR, J. F. **Ornitologia e conservação**: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010.
- MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MADHU S. K.; VIJAYAN, V. A.; SHAIKATH, A. K. Bioactivity guided isolation of mosquito larvicide from *Piper longum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 2, p. 112-116, 2011.
- MALAMI, I.; GIBBONS, S.; MALKINSON, J. P. Synthesis and antibacterial evaluation of 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid from *Piper multiplinervium*. **Fitoterapia**, v. 93, p. 189-193, 2014.
- MARQUES, A. M.; BARRETO, A. L. S.; CURVELO, J. A. R.; RAMOS, M. T. V.; SOARES, R. M. A.; KAPLAN, M. A.C. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 5, p. 908-914, 2011.
- MARQUES, J. V.; OLIVEIRA, A.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal piperolides, coumarins, pyrones and amides from *Piper* species and analogs. **Planta Médica**, v. 74, n. 9, p. 1169, 2008.
- MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667- 670, 2003.

- MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: structural requirements, mode of action, and new amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7313-7323, 2009.
- MELO, A.; GUIMARÃES, E. F.; ALVES, M. Piperaceae do Parque Nacional do Viruá, Caracará, Roraima, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 455-470, 2014.
- MIKICH, S.B. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19 n.1, p. 239-249, 2002.
- MISRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P.; GUPTA, S.; KUMAR, N.; DUBE, A. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1058-1066, 2009.
- MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 168-173, 2010.
- MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 222-227, 2012.
- MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 282-286, 2005.
- MORANDIM, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, C. M.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of *Piper* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6135-6139, 2010.
- MOORE, B. S.; HOPKE, J. N. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. **ChemBioChem**, v. 2, p. 35-38, 2001.
- MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JUNIOR, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. In vitro trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, v. 75, p. 620-623, 2009.
- MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; GUPTA, M. P.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Leaf essential oil of three panamanian *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1277-1282, 1998.

- NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.
- NASCIMENTO, S. A.; ARAÚJO, E. A.; SILVA J. M.; RAMOS, C. S. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 60, n. 1, p. 2837-2839, 2015.
- NAVICKIENE, H. M. D. **Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper tuberculatum***. 2002. 233 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.
- NAVICKIENE, H. M.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. da S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YONG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NOVAES, A. S.; MOTA, J. S.; BARISON, A.; VEBER, C. L.; NEGRÃO, F. J.; KASSUYA, C. A. L.; BARROS, M. E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 21, p. 523-528, 2014.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PARRA, J. E.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 280-282, 2011.
- PARRA, J. E.; PATIÑO, J. A.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 590-592, 2013.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein**, v. 10, n.1, p. 118-119, 2012.

PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2009.

PERAZZO, F. F.; RODRIGUES, I. V.; MAISTRO, E. L.; SOUZA, S. M.; NANAYKKARA, N. P. D.; BASTOS J. K.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. H. B. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 5, p. 13-16, 2013.

PESSINI, G. L.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G. Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 22, p. 209-216, 2003.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, (6A), n. 1130-1133, 2005.

PIMENTA, J. A. Relações hídricas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap.1, p. 1-32.

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

PIOLI, R. M. **Abordagens biossintéticas em *Piper tuberculatum* auxiliada pela síntese de precursores fenilpropanoídicos**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

POTZERNHEIM, M. C.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.

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

QUINTANA, K. C.; LERMA, J. M.; ECHEVERRI, C. G. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 391-395, 2013.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008.

RAMOS, C. S.; KATO, J. K. Hidrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* Beetle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 3, p. 560-563, 2009.

RAO, V. R. S.; SURESH, G.; BABU, K. S.; RAJU, S. S.; VARDHAN, M. V. P. S. V.; RAMAKRISHNA, S.; RAO, J. M. Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. **Tetrahedron**, v. 67, p. 1885-1892, 2011.

RAO, V. R. S.; MUTHENNA, P.; SHANKARAIHAH, G.; AKILESHWARI, C.; BABU, K. H.; SURESH, G.; BABU, K. S.; KUMAR, R. S. C.; PRASAD, K. R.; YADAV, P. A.; PETRASH, J. M.; REDDY, G. B.; RAO, J. M. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 344-361, 2012.

RAUT, S. K.; BHATTACHARYA, S. S. Pests and diseases of betelvine (*Piper betle*) and their natural enemies in India. **Experimental & Applied Acarology**, v. 23, p. 319-325, 1999.

REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

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

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

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, v. 184, p. 430-435, 1974.

- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Relatório Técnico**, n. 136, 2005. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2015.
- RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; BERENQUER, J.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 1998-2003, 1996.
- RUIZ, C.; HADDAD, M.; ALBAN, J.; BOURDY, G.; REATEGUI, R.; CASTILLO, D.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E.; ESTEVEZ, Y.; AREVALO, J.; ROJAS, R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 363-366, 2011.
- RUKACHAISIRIKUL, T.; PRABPAI, S.; CHAMPUNG, P.; SUKSAMRARN, A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. **Planta Medica**, v. 68, p. 853-855, 2002.
- SAMAIN, M. S.; MATHIEU, G.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; GOETGHEBEUR, P. *Verhuellia* revisited-unravelling its intricate taxonomic history and a new subfamilial classification of Piperaceae. **Taxon**, v. 57, p. 583-587, 2008.
- SANTARÉM, E. R. Saat: transformação de plantas mediada por ultra-som e agrobacterium. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 725-730, 2000.
- SANTOS, P. V.; DESOTI, V. C.; MIRANDA, N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 349-356, 2013.
- SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 455-465, 2007.
- SCODRO, R. B. L.; PIRES, C. T. A.; CARRARA, V. S.; LEMOS, C. O. T.; CARDOZO FILHO, L.; SOUZA, V. A.; CORRÊA, A. G.; SIQUEIRA, V. L. D.; LONARDONIA, M. V. C.; CARDOSO, R. F.; CORTEZ, D. A. G. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 600-604, 2013.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S. ; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGE`NE, B. J. R.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 65-75, 2008.

SHENOY, P. A.; NIPATE, S. S.; SONPETKAR, J. M.; SALVI, N. C.; WAGHMARE, A. B.; CHAUDHARI, P. D. Production of high titre antibody response against Russell's viper venom in mice immunized with ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) and piperine. **Phytomedicine**, v. 21, p. 159-163, 2014.

SHI, Y.-N.; SHI, Y.-M.; YANG, L.; LI, X.-C.; ZHAO, J.-H.; QU, Y.; ZHU, H.-T.; WANG, D.; CHENG, R.-R.; YANG, C.-R.; XU, M.; ZHANG, Y.-J. Lignans and aromatic glycosides from *Piper wallichii* and their antithrombotic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 162, v. 87-96, 2015.

SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.

SILVA JUNIOR, I. F.; OLIVEIRA, R. G.; SOARES, I. M.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 137-143, 2014.

SILVA, R. V. **Estudo químico e biossintético em *Piper arboreum* Aublet (Piperaceae)**. 2004. 275 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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

SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D'Arc.; SOUZA, H. E. M.; CORRÊA, R. da S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, p. 9-30, 2008.

SOUZA, D. S. **Estudo químico do óleo essencial das espécies *Piper amalago* e *Peperomia obtusifolia* e biológico de *Piper amalago***. 2010. 37 f. Monografia (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2010.

- SOUZA, L. A.; ALBIERO, A. L. M.; ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S. Estudo morfo-anatômico da folha e do caule de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 103-107, 2009.
- SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.
- SPEROTTO, A. R. M.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.
- SUWANPHAKDEE, C.; CHANTARANOTHAI, P. The monotypic genus *Zippelia Blume* (Piperaceae): a new record for Thailand. **Thai Forest Bulletin (Botany)**, v. 37, p. 147-150, 2009.
- TEBBS, M.C. Piperaceae. In: KUBITZI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. (Ed.). **Flowering plants, dicotyledons**: magnoliid, hamamelid and caryophyllid. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1993. p. 516-520. (The families and genera of vascular plant, v. 2).
- TEIXEIRA, S. D. **Estudo fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua interação com morcegos frugíferos**. 2003, 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- THERNEAU, T. **Survival**: survival analysis, including penalised likelihood. R package Version 2.35-8. [S.l.: s.n.], 2012.
- THIES, W.; KALKO, E. K. V.; SCHNITZLER, H.-U. The roles of echolocation and olfaction in two neotropical fruit-eating bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea*, feeding on *Piper*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 42, p. 397-409, 1998.
- van den BERG, M. E. Piperaceae. In: _____. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: PR/MCT/CNPq, 1993. p. 55-66.
- WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 477-497, 2007.
- WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; WHEELER, C. H.; LINDSKOG, I.; SANCHEZ, J. C.; BAIROCH, A.; APPEL, R. D.; DUNN, M. J.; HOCHSTRASSER, D. F. Multiple parameter cross-species protein identification using Multident. A world-wide web accessible tool. **Electrophoresis**, v. 19, n.18, p. 3199-3206, 1998.
- WILM, M.; SHEVCHENKO, A.; HOUTHAEVE, T.; BREIT, S.; SCHWEIGER, L.; FOTSIS, T.; MANN, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. **Nature**, v. 379, p. 466-469, 1996.

WU, T. S.; WANG, M. L.; WU, P. L. Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 4, p. 785-789, 1996.

XIE, H.; YAN, M. C.; JIN, D.; LIU, J. J.; YU, M.; DONG, D.; CAI, C. C.; PAN, S. L. Studies on antidepressant and antinociceptive effects of ethyl acetate extract from *Piper laetispicum* and structure-activity relationship of its amide alkaloids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1086-1092, 2011.

YAMAGUCHI, L. F.; LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; MASCOIO, P.D.; KATO, M. J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, n. 1838-1843, 2006.

YAO, C. Y.; WANG, J.; DONG, D.; QIAN, F. G.; XIE, J.; PAN, S. L. Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 823-829, 2009.

ZACHARIAH, T. J.; PARTHASARATHY, V. A. Black pepper. In: PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T. J. (Ed.). **Chemistry of spices**. Wallingford; Cambridge: CABI, 2008. Chap. 2, p. 21-40.