

AMAURO ALVES DE SOUZA JÚNIOR

**Investigação da origem biossintética de
cromenos e cromanos em *Piper aduncum* e
Peperomia obtusifolia (Piperaceae)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química – Campus de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química, no Programa de Pós-
Graduação em Química, área de
concentração Química Orgânica.*

Orientadora: Prof^a Dr^a Maysa Furlan

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S729i	Souza Júnior, Amauri Alves de Investigação da origem biossintética de cromenos e cromanos em <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i> (Piperaceae) / Amauri Alves de Souza Júnior. – Araraquara : [s.n], 2014 145 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maysa Furlan 1. Química orgânica. 2. Biossíntese. 3. Fungos endofíticos. 4. Espectrometria de massas. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Amauri Alves de Souza Júnior

Filiação: Amauri Alves de Souza e Lúcia Dias Souza

Nascimento: 17/01/1989, Ipameri/GO - Brasil.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica.

NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Rua Profº Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, 14.800-900, Araraquara/SP, Brasil.

E-mail: amaurialvesjunior@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Pós-graduação

Mestrado em Química.

Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica.

NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Título: Investigação da origem biossintética de cromenos e cromanos em *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).

Orientadora: Profª Drª Maysa Furlan

Período: 2011-2013

Endereço: Rua Profº Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, 14.800-900, Araraquara/SP - Brasil.

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

Graduação

Bacharelado em Química.

Instituição: Universidade Federal de Goiás – UFG/Campus Catalão - Departamento de Química.

Título: Avaliação da fibra de coco (mesocarpo do fruto de *Cocos nucifera* L.) como adsorvente alternativo para a remoção de corantes orgânicos de meio aquoso.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia de Sousa Freitas

Período: 2007-2011

Endereço: Avenida Dr^o. Lamartine Pinto de Avelar, nº 1120, Setor Universitário, 75.704-020, Catalão/GO - Brasil.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

ARTIGO COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO

TAVARES, W. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JUNIOR, A. A.; FREITAS, S. S.; CONSOLARO, H. N.; RIBEIRO, P. E. A.; ZANUNCIO, J. C. Screening of extracts of leaves and stems of *Psychotria* spp. (Rubiaceae) against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) for Maize Protection. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 1892-1901, 2013.

EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 4th Brazilian Conference on Natural Products – 4th BCNP. 2013. Cidade: Natal, RN. (Congresso).
2. São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry – ESPCA. 2013. Cidade: Araraquara, SP. (Congresso).
3. 34^a Reunião anual da sociedade brasileira de química. 2011. Cidade: Florianópolis, SC. (Congresso).
4. 63^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2011. Cidade: Goiânia, GO. (Congresso).
5. XIX Seminário de Iniciação Científica/VIII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da Universidade Federal de Goiás. 2011. Cidade: Goiânia, GO. (Congresso).

6. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2010. Cidade: Águas de Lindóia, SP. (Congresso).
7. 2ª Semana de Química. 2010. Cidade: Catalão, GO. (Congresso).
8. VII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão. 2010. Cidade: Goiânia, GO. (Congresso).
9. I Ciclo de Palestras do Curso de Química. 2010. Cidade: Catalão, GO. (Seminário).
10. XXX Escola de Verão em Química Profº Drº José Tércio B. Ferreira. 2010. Cidade: São Carlos, SP. (Congresso).
11. III Feira de Profissões do CAC. 2010. Cidade: Catalão, GO. (Simpósio).
12. VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia 2009 - V Simpósio de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura - IV Fórum de C&T no Cerrado SBPC/GO. 2009. Cidade: Catalão, GO. (Simpósio).
13. 1º Simpósio de Matemática e Matemática Industrial. 2009. Cidade: Catalão, GO. (Simpósio).
14. 1ª Semana da Química. 2009. Cidade: Catalão, GO. (Encontro).
15. 1º Encontro Regional das águas. 2007. Cidade: Catalão, GO. (Encontro).

APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

1. SOUZA JÚNIOR, A. A.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Biosynthetic relationship of chromene and chromane derivatives in *Piper* and *Peperomia* species of Piperaceae. 2013. Cidade: Natal, RN; Evento: 4th Brazilian Conference on Natural Products.
2. SOUZA JÚNIOR, A. A.; GRAZZIOTTI, G. H.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; PARENTE, L. M. L.; LIAO, L. M.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Atividades inseticidas e repelente de ar-turmerona isolada de rizomas de *Curcuma longa* L. 2011.
3. SOUZA JÚNIOR, A. A.; AVELAR, M. P.; FREITAS, S.S.; PETACCI, F. Uso da fibra de coco como adsorvente de baixo custo para a remoção do corante têxtil azul turquesa remazol G 133% de solução aquosa. 2011. Cidade: Florianópolis, SC; Evento: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
4. NASCIMENTO, M. N. G.; GALDINO, J. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S.S.; PETACCI, F.; CONSOLARO, H. N.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Atividade inseticida de extratos de plantas do gênero *Psichotria* sp sobre *Sitophilus zeamais* e *Spodoptera frugiperda*. 2011. Cidade: Florianópolis, SC; Evento: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

5. SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S. S. Avaliação da casca de coco como adsorvente para a remoção de corante orgânico de meio aquoso. 2011. Cidade: Goiânia, GO; Evento: XIX Seminário de Iniciação Científica/VIII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da Universidade Federal de Goiás.
6. SOUZA JÚNIOR, A. A.; GRAZZIOTTI, G. H.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Atividade inseticida de compostos presentes nas flores de *Vochysia elliptica*. 2011.
7. GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Avaliação do efeito inseticida de óleo essencial de *Curcuma longa* sobre *Spodoptera frugiperda*. 2011.
8. SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S. S. Avaliação de taboa (*Typha angustifolia* L.) como adsorvente natural para remoção de corantes reativos de meio aquoso. 2011.
9. SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S. S.; PETACCI, F. Utilização da Casca de coco como bioadsorvente para a remoção do corante têxtil vermelho remazol RB 133% de meio aquoso. 2010. Cidade: Águas de Lindóia, SP; Evento: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
10. SOUZA JÚNIOR, A. A.; GRAZZIOTTI, G. H.; PETACCI, F.; FREITAS, S. S.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Avaliação do efeito inseticida do extrato etanólico de *Vochysia elliptica* sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). 2010.
11. SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S. S. Avaliação da casca de coco como adsorvente para remoção de corante orgânico de meio aquoso. 2010. Cidade: Goiânia, GO; Evento: VII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão.
12. GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; PETACCI, F.; TAVARES, W. S.; FREITAS, S.S.; CRUZ, I. Avaliação do efeito inseticida de compostos presentes na *Curcuma longa* sobre *Spodoptera frugiperda*. 2010.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. SOUZA JÚNIOR, A. A.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Biosynthetic relationship of chromene and chromane derivatives in *Piper* and *Peperomia* species of Piperaceae. 4th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2013, NATAL, RN.
2. SOUZA JÚNIOR, A. A.; GRAZZIOTTI, G. H.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; PARENTE, L. M. L.; LIAO, L. M.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Atividades inseticidas e repelente de ar-turmerona isolada de rizomas de *Curcuma longa* L. 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, FLORIANÓPOLIS, SC.
3. SOUZA JÚNIOR, A. A.; AVELAR, M. P.; FREITAS, S. S.; PETACCI, F. Uso da fibra de coco como adsorvente de baixo custo para a remoção do corante têxtil azul

turquesa remazol G 133% de solução aquosa. 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, FLORIANÓPOLIS, SC.

4. NASCIMENTO, M. N. G.; GALDINO, J. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S.S.; PETACCI, F.; CONSOLARO, H. N.; TAVARES, W. S.; CRUZ, I. Atividade inseticida de extratos de plantas do gênero *Psichotria* sp sobre *Sitophilus zeamais* e *Spodoptera frugiperda*. 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, FLORIANÓPOLIS, SC.

5. SOUZA JÚNIOR, A. A.; FREITAS, S.S.; PETACCI, F. Utilização da casca de coco como bioadsorvente para a remoção do corante têxtil vermelho remazol RB 133% de meio aquoso. 33ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2010, Águas de Lindóia, SP.

DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

Disciplinas	Créditos	Conceito
Teoria e métodos de separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos.	12	A
Métodos espectrométricos	12	A
Espectrometria de massas de produtos naturais	6	A
Química orgânica avançada	12	B
Tópicos especiais: métodos de purificação de proteínas e estudo da interação membrana/enzima	5	A
Seminários gerais	5	-
Total de créditos (créditos integralizados)	52	

AMAUURI ALVES DE SOUZA JUNIOR

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

Araraquara, 10 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



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



Dr. NIVALDO BORALLE
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



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

DEDICO ESTE TRABALHO...

AOS MEUS PAIS, IRMÃOS E FAMILIARES, QUE SEMPRE ACREDITARAM EM MIM.

VOCÊS SÃO FUNDAMENTAIS NESSA LUTA!

Ao Professor Fernando Petacci que faleceu no dia 15 de junho de 2012 (Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Catalão, Brasil) .

...Saudades do “Grande” Mestre e Amigo...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora professora Maysa Furlan, pela orientação, exemplo científico e acadêmico que traz grande admiração a todos. Obrigado pela confiança concebida nestes anos!

Também gostaria de agradecer aos professores do NuBBE: Vanderlan da Silva Bolzani, Ian Castro-Gamboa, Alberto José Cavalheiro, Angela Regina Araújo, Márcia Nasser Lopes, Dulce Helena Siqueira Silva, por toda dedicação e apoio, convivência, momentos de descontração e aprendizagem.

À professora Dra. Márcia Nasser Lopes e ao Dr. Nivaldo Boralle pela contribuição no exame de qualificação.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto e Dr. Nivaldo Boralle pela contribuição no exame de defesa.

À professora Dra. Sílvia Noelí López pelas inúmeras discussões, amizade e dedicação. Obrigado!

Aos colegas João Bronzel e Juliana Rodrigues, extremamente prestativos, ajudando no trabalho de inúmeras maneiras.

Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes pelos momentos de aprendizagem e alegrias.

Ao José Carlos Tomaz, grande amigo, pelas análises espectrométricas.

A Profa Dra. Maria Valnice Boldrin e a colega Dra. Bianca Ferreira da Silva, também pelas análises espectrométricas.

Um agradecimento especial aos irmãozinhos e irmãzinhas do NuBBE e família biossíntese. Eternos!

A todos os amigos do laboratório, pela boa companhia que torna o dia-a-dia mais agradável.

Às funcionárias da biblioteca e do programa de pós-graduação, pelo esforço e compreensão.

A todos os funcionários do Instituto de Química que diretamente ou indiretamente contibuiram para o desenvolvimento do projeto.

A todos os amigos que conheci nesses dois anos que estou em Araraquara.

Também gostaria de deixar uma lembrança a todos os amigos que dividiram comigo um pouco do seu dia-a-dia durante minha estadia nas terras “hermanas”. Obrigado!

À FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa de estudo concedidos que permitiram a realização desse trabalho.

RESUMO

Cromanos e cromenos são metabólitos secundários comumente encontrados em espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*, pertencentes à família Piperaceae. São caracterizados pela presença de um núcleo benzopirânico (um anel benzeno fundido a um anel pirano). Essa classe de substâncias é importante do ponto de vista farmacológico, uma vez que apresenta vasta gama de atividades biológicas, incluindo antifúngica, tripanocida, antioxidante e antiparasitária. Os benzopiranos isolados de espécies de *Piper* e *Peperomia* apresentam diversidade quanto aos substituintes da unidade aromática de suas estruturas químicas. Baseado no exposto, rotas biossintéticas distintas foram propostas. Em espécies de *Piper* essas rotas envolveriam a via do ácido chiquímico pela atuação do ácido *para*-hidroxibenzóico, enquanto que em espécies de *Peperomia* estaria operando a via do acetato. O presente trabalho teve como objetivo estudar a relação biossintética dos benzopiranos presentes nas espécies *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*, bem como a determinação da dinâmica metabólica envolvida na formação dos mesmos, tanto em nível metabólico como enzimático, uma vez que os cromenos isolados de *Piper aduncum* descrevem ritmo circadiano bem determinado. Estudos de variação circadiana realizados em *Peperomia obtusifolia* com o objetivo de acompanhar a formação do cromano ácido 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2*H*-1-benzopirano carboxílico (**4**) não demonstraram ritmo uniforme, do tipo sigmoidal, comum aos cromenos isolados de *P. aduncum*. O acúmulo do cromano **4** mostrou um máximo às 18h00, mas outros picos de concentração do mesmo foram observados às 06h00 e 15h00 e corroboram para o estabelecimento de um ritmo aleatório. Para a avaliação da origem biossintética de **4**, foram realizados experimentos de incorporação utilizando precursor enriquecido com isótopos estáveis (acetato-[2-¹³C] de sódio) em folhas de *P. obtusifolia*. Estudos de incorporação *in vivo* empregando o mesmo precursor foram realizados utilizando plântulas de *P. obtusifolia*. Os extratos enriquecidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, sendo que os resultados não mostraram a incorporação deste precursor no cromano **4**. Associado a esses resultados foram realizados experimentos visando à extração enzimática das folhas de *P. obtusifolia* e *P. aduncum*, acompanhados por dosagem proteica e análise por gel de eletroforese monodimensional dos extratos enzimáticos

obtidos, principalmente com análise focada nas enzimas prenilttransferases e/ou subclasse das geranilttransferases, envolvidas na biossíntese dos cromanos e cromenos de *P. obtusifolia* e *P. aduncum*. A dosagem protéica e análise por eletroforese monodimensional mostraram maior concentração de proteínas em *P. aduncum*, principalmente aquela relacionada à banda de eletroforese correspondente à massa molecular que caracteriza as prenilttransferases. Esses resultados até então obtidos mostraram que os cromanos de *P. obtusifolia* não apresentam dinâmica metabólica bem estabelecida e descrevem rotas metabólicas distintas daquelas identificadas para os cromenos isolados de espécies do gênero *Piper* e que os experimentos biossintéticos realizados não demonstraram especificidade quanto ao sítio de reação dos cromanos. Com isso, análise do ponto de vista de diversidade química da população endofítica que habita as folhas e caules de *P. obtusifolia* foi realizada. Os endófitos foram isolados e crescidos em meio de cultivo de batata-dextrose-ágar (BDA), e os mesmos mantidos na Universidad Nacional de Rosario, Argentina. A análise das substâncias produzidas nas culturas de endófitos, por cromatografia em camada delgada comparativa e espectrometria de massas, mostrou indícios da presença de substâncias com perfil químico identificado em *P. obtusifolia* sugerindo que esta via metabólica pode estar também ativa nos fungos endofíticos associados à planta.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper aduncum*, *Peperomia obtusifolia*, cromeno, cromano, biossíntese, fungos endofíticos.

ABSTRACT

Chromanes and chromenes are secondary metabolites commonly found in species of the genera *Piper* and *Peperomia*, belonging to the Piperaceae family. They are characterized by the presence of a benzopyran core showing a benzene ring fused to a pyran ring. This class of compounds is pharmacologically important, since they have shown a broad range of biological activities including antifungal, trypanocidal, antioxidant and anti-parasitic. The benzopyrans isolated from *Piper* and *Peperomia* species showed diversity biosynthetic pathways, mainly related to the aromatic moieties. The biosynthesis of *Piper* species involve the shikimic pathway showing as the first precursor the *p*-hydroxybenzoic acid, whereas in *Peperomia* species would be operating the route of acetate. The present work aimed to study the biosynthetic relationship of benzopyrans present in *Piper aduncum* and *Peperomia obtusifolia* as well as to determine the metabolic dynamics involved in their formation related to metabolic and enzymatic levels, since the chromenes isolated from *Piper aduncum* describe well-defined circadian rhythm. Studies of circadian rhythm performed in *Peperomia obtusifolia*, aiming to follow the formation of chromane 3,4 -dihydro- 5 -hydroxy -2 ,7- dimethyl-8- (3-methyl -2- butenyl) -2 - (4 -methyl -1 ,3- pentadienyl)- 2*H* -1- benzopyran carboxylic acid (**4**) from *P. obtusifolia* showed no uniform sigmoidal curve, common to the chromenes isolated from *Piper aduncum*. The accumulation of the chromane **4** showed a maximum at 18:00 pm, but others peaks of the same concentration were observed at 06:00 am and 15:00 pm, corroborating to establish a random pace. To evaluate the biosynthetic origin of the chromane **4**, feeding experiments were conducted using a precursor enriched with stable isotopes (ethyl [2-¹³C]-sodium acetate) in the leaves of *P. obtusifolia*. Experiments were performed using seedlings of *P. obtusifolia*. The enriched extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS). The results showed no incorporation of the precursor in the chromane **4**. Associated with these results experiments were conducted to the enzymatic extraction of the leaves of both species, accompanied by protein dosage and analysis by one-dimensional electrophoresis gel, showing higher concentration of prenyltransferases enzymes in *P. aduncum*, which are involved in the biosynthesis of chromans and chromenes in this species. These results obtained so far have shown that chromanes of *P. obtusifolia* not have well-established metabolic dynamics and describe

metabolic routes different when compared with those chromenes of *Piper* genus and that the biosynthetic experiments showed no specificity related to the site of the chromanes biosynthesis. Based on this, the chemical diversity of endophytic population that inhabits the leaves and stems of *P. obtusifolia* was analysed. Endophytes fungi were isolated and grown in culture medium of potato-dextrose-agar (PDA). These experiments were conducted in the National University of Rosario, Argentina. The cultures were analysed by chromatographic and spectrometric techniques showing evidences of the presence of chemical compounds with the same profile identified in *P. obtusifolia*, suggesting that this metabolic pathway may also be active in endophytic fungi associated to plant.

Key-words: Piperaceae, *Piper aduncum*, *Peperomia obtusifolia*, chromene, chromane, biosynthesis, endophytic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Piper aduncum</i> (L.)	33
Figura 2 - <i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.	34
Figura 3 - Cromenos e cromanos isolados de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i>	35
Figura 4 - Biogênese dos cromenos 1 , 2 e 3 isolados de <i>Piper aduncum</i>	37
Figura 5 - Biogênese para os cromenos isolados de <i>Peperomia villipetiola</i> e <i>Peperomia choloriana</i> , unidade de ciclização ligada ao carbono 4 do ácido orselínico	40
Figura 6 - Biogênese para os cromanos 4 , 5 e 6 isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> , unidade de ciclização ligada ao carbono 6 do ácido orselínico	41
Figura 7 - Preparação do extrato AcOEt de folhas de <i>Piper aduncum</i>	48
Figura 8 - Partição líquido-líquido do extrato AcOEt de <i>Piper aduncum</i>	49
Figura 9 - Fracionamento cromatográfico da fração hexânica de folhas de <i>Piper aduncum</i>	50
Figura 10 - Preparação do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	51
Figura 11 - Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de <i>Peperomia obtusifolia</i>	52
Figura 12 - Extração enzimática das folhas de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i>	53
Figura 13 - Extração enzimática de folhas de <i>Piper aduncum</i>	60
Figura 14 - Foto ilustrativa dos experimentos de incorporação de acetato-[2- ¹³ C] de sódio em pecíolos com folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	62

Figura 15 - Incorporação do precursor acetato-[2- ¹³ C] de sódio em pecíolos com folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	63
Figura 16 - Fluxograma do processo de EFS dos EAcOEt	64
Figura 17 - Incorporação do precursor acetato-[2- ¹³ C] de sódio em <i>Peperomia obtusifolia</i>	66
Figura 18 - Processo cromatográfico para purificação do cromano 4 de <i>Peperomia obtusifolia</i> após incorporação <i>in vivo</i>	67
Figura 19 - Fluxograma de preparação dos EMeOH das folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	69
Figura 20 - Fluxograma do processo de EFS do EMeOH	70
Figura 21 - Preparo dos extratos	73
Figura 22 - Estrutura química do cromeno 2 isolado de <i>Piper aduncum</i>	75
Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H do cromeno 2 (300 MHz, CDCl ₃)	76
Figura 24 - Estrutura química do cromano 4 isolado de <i>Peperomia obtusifolia</i>	79
Figura 25 - IES-EM em alta resolução do cromano 4 , operando no modo negativo	79
Figura 26 - IES-EM/EM do pico <i>m/z</i> 369, operando no modo negativo (40 eV)	79
Figura 27 - Proposta de fragmentação do cromano 4 de <i>Peperomia obtusifolia</i> : a – formação da molécula desprotonada <i>m/z</i> 369; b – proposta de fragmentação da molécula desprotonada <i>m/z</i> 369: formação do íons <i>m/z</i> 351, 325 e 247	80
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H do cromano 4 (300 MHz, CDCl ₃)	81
Figura 29 - Gel de poliacrilamida obtido das frações provenientes do extrato bruto de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i> , revelado com nitrato de prata	86

Figura 30 - Ritmo circadiano do cromeno prenilado de <i>Piper aduncum</i>	88
Figura 31 - Biossíntese das unidades isoprênicas (IPP/DMAPP) em <i>Piper aduncum</i>	88
Figura 32 - Curva analítica do cromano 4	90
Figura 33 - Produção do cromano 4 durante 48 h em folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	91
Figura 34 - TIC do cromano 4	93
Figura 35 - IES-EM em alta resolução do cromano 4 ($t_R = 27,59$ min), operando em modo negativo	93
Figura 36 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 8 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	94
Figura 37 - Espectro na região do UV do pico com $t_R = 27,64$ min. Extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 8 h	94
Figura 38 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 8 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	95
Figura 39 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 12 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	96
Figura 40 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 16 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	97
Figura 41 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 24 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	97
Figura 42 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 48 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	98

Figura 43 - TIC do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 72 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2	98
Figura 44 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 12 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	99
Figura 45 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 16 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	99
Figura 46 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 24 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	100
Figura 47 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 48 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	100
Figura 48 - IES-EM do extrato de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> : tempo de incubação de 72 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo	101
Figura 49 - Perfis cromatográficos por CLAE-UV: a – controle: planta submetida ao estresse na ausência de precursor; b – controle: planta não submetida ao estresse “in natura”; c – planta submetida ao estresse e incubada com o precursor acetato-[2- ¹³ C] de sódio; d – padrão: cromano 4	104
Figura 50 - TIC do cromano 4 isolado de <i>Peperomia obtusifolia</i>	105
Figura 51 - IES-EM da banda entre 11,2 e 11,5 min referente ao cromano 4 isolado de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	105

Figura 52 - TIC do cromano 4 isolado de folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> após incorporação com acetato-[2- ¹³ C] de sódio	106
Figura 53 - IES-EM da banda entre 11,3 e 11,5 min referente ao cromano 4 isolado de <i>Peperomia obtusifolia</i> após incorporação com acetato- [2- ¹³ C] de sódio, operando em modo negativo	106
Figura 54 - IES-EM/EM dos picos com <i>m/z</i> 369 e 371, respectivamente, operando no modo negativo. Cromano 4 isolado de <i>Peperomia</i> <i>obtusifolia</i>	108
Figura 55 - Proposta de fragmentação do cromano 4 : mecanismo para formação do íon <i>m/z</i> 203	109
Figura 56 - IES-EM/EM dos picos com <i>m/z</i> 369 e 371, respectivamente, operando no modo negativo. Cromano 4 isolado de <i>Peperomia</i> <i>obtusifolia</i> após administração de acetato-[2- ¹³ C] de sódio	110
Figura 57 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anissaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anissaldeído (365 nm); empregando FM1*	115
Figura 58 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anissaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anissaldeído (365 nm); empregando FM2*	116
Figura 59 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anissaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anissaldeído (365 nm); empregando FM1*	117
Figura 60 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anissaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anissaldeído (365 nm); empregando FM2*	118

Figura 61 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anisaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anisaldeído (365 nm); empregando FM1*	119
Figura 62 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anisaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anisaldeído (365 nm); empregando FM2*	120
Figura 63 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anisaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anisaldeído (365 nm); empregando FM1*	121
Figura 64 - Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): a – 254 nm; b – 365 nm; c – <i>para</i> -anisaldeído (254 nm); d – <i>para</i> - anisaldeído (365 nm); empregando FM2*	122
Figura 65 - a - Proposta de fragmentação do cromano 5 ; b - proposta de fragmentação do cromano 6	124
Figura 66 - a - Proposta de fragmentação do cromano 7 ; b - proposta de fragmentação do cromano 8	126
Figura 67 - a - IES-EM do branco (meio de cultivo); b – IES-EM/EM do íon m/z 375; c – IES-EM/EM do íon m/z 329, todos operando em modo negativo	128
Figura 68 - a - IES-EM do extrato AcOEt PO14 de <i>Peperomia obtusifolia</i> ; b – IES-EM/EM do íon m/z 369, todos operando em modo negativo	129
Figura 69 - a - IES-EM do extrato AcOEt PO12 de <i>Peperomia obtusifolia</i> ; b – IES-EM/EM do íon m/z 247, operando em modo negativo	131

Figura 70 - IES-EM do extrato AcOEt PO20 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	132
Figura 71 - IES-EM do extrato AcOEt PO24 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	132
Figura 72 - IES-EM do extrato AcOEt PO27 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	132
Figura 73 - IES-EM do extrato AcOEt PO26 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	133
Figura 74 - IES-EM do extrato AcOEt PO49 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	133
Figura 75 - IES-EM do extrato AcOEt PO42 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	134
Figura 76 - IES-EM do extrato AcOEt PO33 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	134
Figura 77 - IES-EM do extrato AcOEt PO13 de <i>Peperomia obtusifolia</i> , operando em modo negativo	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas presentes na solução padrão utilizada na eletroforese e suas respectivas massas moleculares	57
Tabela 2 - Etapas envolvidas na revelação do gel de eletroforese utilizando AgNO ₃ (0,1%) como agente revelador	58
Tabela 3 - Ensaio enzimático em <i>Piper aduncum</i>	61
Tabela 4 - Dados de RMN ¹ H do cromeno 2 (300 MHz, CDCl ₃)	77
Tabela 5 - Dados de RMN ¹ H do cromano 4 (300 MHz, CDCl ₃)	82
Tabela 6 - Cálculo das concentrações de proteína estimada pelo método de Bradford; Equação: [proteína] = (Abs ₅₉₅ – 0,011)/0,878	84
Tabela 7 - Parâmetros da curva analítica do cromano 4	90
Tabela 8 - Abundâncias isotópicas do cromano 4 (padrão) e dos extratos de folhas após administração de acetato-[2- ¹³ C] de sódio a partir das análise por CLAE-DAD-MS em alta resolução	102
Tabela 9 - Agrupamento dos endófitos que apresentaram similaridade quanto à constituição do perfil cromatográfico por CCDC	113
Tabela 10 - Agrupamento dos endófitos que apresentaram similaridade quanto ao grupo cromóforo do cromano 4	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aq	Aquoso
BDA	Batata-dextrose-ágar
BSA	Soro albumina bovina
CaCO_3	Carbonato de cálcio
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCl_3COOH	Ácido tricloroacético
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CH_2O	Formaldeído
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Conc	Concentração
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
dd	Duplo dupleto
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DTT	1,4-ditiotreitol
EAcOEt	Extrato acetato de etila

EDTA	Ácido tetra-acético etilenodiamino
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
EMeOH	Extrato metanólico
eV	Elétron volt
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FM1	Fase móvel 1
FM2	Fase móvel 2
g	Grama
g.L ⁻¹	Grama por litro
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
Hex	Hexano
HOAc	Ácido acético
IES	Ionização por eletrospray
IES-EM	Espectro de massas com ionização por eletrospray
IES-EM-EM	Espectro de massas sequencial com ionização por eletrospray
IPP	Pirofosfato de isopentenila
J	Constante de acoplamento (em Hertz)
KDa	Kilo Dalton
KPi	Tampão fosfato de potássio
L	Litro

<i>Loading buffer</i>	Tampão de corrida
m	Multiplete
M	Molar
m.m ⁻¹	Razão massa por massa
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
mA	Miliampere
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mL.g ⁻¹	Mililitro por grama
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MVA	Mevalonato
N ₂	Nitrogênio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
nm	Nanômetro
° C	Graus centígrados
P.A.	Para análise
p.v ⁻¹	Razão massa por volume
pág.	Página
Pf	Precipitado resultante

pH	Potencial hidrogeniônico
PSA	Persulfato de amônio
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
Sf	Sobrenadante resultante
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletilenodimina
T	Tesla
TIC	Cromatograma de íons totais
t_R	Tempo de retenção
TRIS	Triidroxiaminometano
u.m.a	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
V	Volts
δ	Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Família Piperaceae	31
1.2 Os gêneros <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i>	32
1.3 A espécie <i>Piper aduncum</i> (L.)	33
1.4 A espécie <i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.	34
1.5 Bioatividade dos benzopiranos	35
1.6 Origem biogenética dos cromenos e cromanos nos gêneros <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> , respectivamente	37
2 OBJETIVO	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Material vegetal	43
3.2 Reagentes	43
3.3 Meio de cultura empregado no desenvolvimento dos fungos endofíticos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	43
3.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	43
3.5 Cromatografia em coluna	44
3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
3.6.1 Solventes empregados	44
3.6.2 Cromatógrafos	44
3.6.3 Colunas cromatográficas	44
3.6.4 Condições de análises	45
3.6.5 Cartuchos e membranas de filtração para extração em fase sólida	46
3.7 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas	46

3.7.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	46
3.7.2 Espectrometria de massas/espectrometria de massas (EM/EM)	46
3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)	47
3.9 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)	47
3.10 Demais equipamentos	47
4 PARTE EXPERIMENTAL	48
4.1 Isolamento do cromeno <u>2</u> de <i>Piper aduncum</i>	48
4.1.1 Obtenção do extrato vegetal	48
4.1.2 Partição líquido-líquido do extrato bruto AcOEt de <i>Piper aduncum</i>	48
4.2 Isolamento do cromano <u>4</u> de <i>Peperomia obtusifolia</i>	51
4.2.1 Obtenção do extrato vegetal	51
4.2.2 Processo cromatográfico	51
4.3 Extração enzimática das folhas de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i>	53
4.4 Determinação da concentração proteica dos extratos enzimáticos	54
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	55
4.5.1 Preparo das soluções	55
4.5.2 Preparo do gel de eletroforese	56
4.5.3 Preparo e aplicação dos extratos enzimáticos de folhas de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i> e do padrão no gel de eletroforese	57
4.5.4 Desenvolvimento e revelação do gel de eletroforese	57
4.6 Extração enzimática para ensaio da enzima preniltransferase	59
4.6.1 Dessalinização	60
4.6.2 Ensaio enzimático	61

4.7 Experimentos de incorporação <i>in vivo</i> do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio em <i>Peperomia obtusifolia</i>	62
4.7.1 Preparo das amostras para análise por CLAE-DAD-EM/AR	63
4.7.2 Experimentos de incorporação <i>in vivo</i> do precursor acetato-[2- ¹³ C] de sódio em <i>Peperomia obtusifolia</i> – estudo de biossíntese “de novo” do cromano 4	64
4.8 Análise da variabilidade circadiana do cromano <u>4</u> em folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	68
4.8.1 Construção da curva analítica	68
4.8.2 Preparo das amostras	69
4.8.2.1 Extrato metanólico (EMeOH)	69
4.8.2.2 Extração em fase sólida (EFS)	70
4.8.2.3 Identificação e quantificação	71
4.9 Avaliação da presença de cromanos e/ou cromenos em extratos de fungos endofíticos isolados de folhas e caules de <i>Peperomia obtusifolia</i>	72
4.9.1 Coleta do material vegetal	72
4.9.2 Isolamento dos fungos endofíticos	72
4.9.3 Obtenção dos extratos AcOEt de fungos de <i>Peperomia obtusifolia</i>	73
4.9.4 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de fungos endofíticos de <i>Peperomia obtusifolia</i> por CCDC	73
4.9.5 Análise dos extratos de fungos endofíticos de <i>Peperomia obtusifolia</i> por espectrometria de massas	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Identificação estrutural do cromeno <u>2</u> isolado de <i>Piper aduncum</i>	75

5.2 Identificação estrutural do cromano <u>4</u> isolado de <i>Peperomia</i>	
<i>obtusifolia</i>	78
5.3 Extração enzimática das folhas de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia</i>	
<i>obtusifolia</i>	83
5.4 Análise dos extratos enzimáticos obtidos de <i>Piper aduncum</i> e	
<i>Peperomia obtusifolia</i> por eletroforese monodimensional	85
5.5 Determinação da dinâmica metabólica das etapas de prenilação dos	
cromenos isolados de <i>Piper aducum</i> (MORANDIM, 2004; MORANDIM	
et al., 2005)	87
5.6 Determinação da dinâmica metabólica das etapas de prenilação do	
cromano <u>4</u> em <i>Peperomia obtusifolia</i>	89
5.7 Determinação da origem biossintética dos cromanos de <i>Peperomia</i>	
<i>obtusifolia</i>: experimentos de incorporação <i>in vivo</i> do precursor	
acetato-[2-¹³C] de sódio	92
5.8 Experimentos de incorporação <i>in vivo</i> do precursor acetato-[2-¹³C] de	
sódio em <i>Peperomia obtusifolia</i> – estudo de biossíntese “de novo” do	
cromano <u>4</u>	103
5.9 Análise dos extratos de fungos endofíticos isolados de folhas e	
caules de <i>Peperomia obtusifolia</i>	112
6 CONCLUSÕES	136
REFERÊNCIAS	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Piperaceae

A família Piperaceae, juntamente com Aristolochiaceae, Saururaceae e Lactoridaceae, pertencem à ordem das Piperales e estão classificadas entre as mais primitivas das Angiospermas basais (KATO; FURLAN, 2007). Esta família compreende mais de 4000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo que a maioria de seus exemplares são arbustos ou trepadeiras que se agarram aos troncos das árvores por meio de raízes adventícias e, raramente, são arbóreas (LÓPEZ et al., 2010).

As espécies da família Piperaceae estão distribuídas em cinco gêneros, dos quais os mais abrangentes são: *Piper* (L.) e *Peperomia* (Ruiz e Pavon) com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente. Completando a família, os gêneros menos representativos são *Manekia* (Trel.) (anteriormente chamada de *Sarcorrhachis*), *Zippelia* (Blume) (WANKE et al., 2007) e *Verhuellia* (Miq.), descrito recentemente (SAMAIN et al., 2010).

Estudos da constituição química, dos aspectos biológicos e biossintéticos dos metabólitos secundários de espécies de Piperaceae podem contribuir para estabelecer os padrões evolutivos que dominam essa importante família (KATO; FURLAN, 2007).

Estudos químicos realizados anteriormente mostraram que espécies de Piperaceae apresentam constituição química diversificada, com acúmulo de diferentes classes de metabólitos secundários e entre as principais classes descritas estão lignanas/neolignanas (MARTINS et al., 2003; FELIPPE et al., 2008; FELIPPE et al., 2011; FELIPPE et al., 2012), amidas alifáticas e aromáticas (ALÉCIO et al., 1998; NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002; COTINGUIBA et al., 2009), policetídeos (CHENG et al., 2003), piperolídeos (LAGO et al., 2005), derivados do ácido benzóico (BALDOQUI et al., 1999; LAGO, et al., 2004; BERGAMO et al., 2005; MORANDIM et al., 2005, LOPES et al., 2008; FLORES et al., 2009), alcalóides (DODSON et al., 2000) e benzopiranos (BALDOQUI et al., 1999; LAGO et al., 2004; MORANDIM et al., 2005; SALAZAR et al., 2005, KITAMURA, et al., 2006; BATISTA JUNIOR et al., 2008; BATISTA JUNIOR, et al., 2009; MOTA et al., 2009; BATISTA

JUNIOR et al., 2010; BATISTA JUNIOR et al., 2011a; BATISTA JUNIOR et al., 2011b; BATISTA JUNIOR, et al., 2012).

1.2 Os gêneros *Piper* e *Peperomia*

As espécies do gênero *Piper* encontram-se largamente distribuídas nos dois hemisférios (KATO; FURLAN, 2007). Extensivamente exploradas nos últimos anos, os estudos químicos das espécies de *Piper* revelaram uma diversidade de substâncias biologicamente ativas, incluindo compostos nitrogenados (amidas e alcalóides), lignoides, flavonoides, derivados prenilados do ácido benzóico e cromenos (PARRA; DELGADO; CUCA, 2011). As principais atividades biológicas atribuídas às substâncias isoladas são antifúngica, inseticida, bactericida, antitumoral, tripanocida, antiparasitária, antimicrobiana, antiprotozoária, antiinflamatória e antioxidante (SILVA et al., 2002; LAGO et al., 2004; LOPES et al., 2008; REGASINI et al., 2008; COTINGUIBA et al., 2009; FLORES et al., 2009, LÓPEZ et al., 2010; PARRA; DELGADO; CUCA, 2011).

O gênero *Peperomia*, apesar de ser o segundo maior da família Piperaceae em número de espécies, foi menos estudado do ponto de vista químico (SALAZAR et al., 2005; KATO; FURLAN, 2007; MOTA et al., 2009). Suas espécies são utilizadas predominantemente como plantas ornamentais e alguns estudos etnofarmacológicos demonstraram seu potencial para o tratamento de inflamações, asma, úlceras gástricas, analgésicos e antibacterianos (ARRIGON-BLANK et al., 2004; FELIPPE et al., 2008). As substâncias isoladas do gênero *Peperomia* estão concentradas nas seguintes classes: flavonas e lignanas de *Peperomia obtusifolia* (MOTA et al., 2011), lignanas tetraidrofurânicas, cromenos e policetídeos de *Peperomia blanda* (FELIPPE et al., 2008; FELIPPE et al., 2011; FELIPPE et al., 2012) e benzopiranos de *Peperomia villipetiola*, *Peperomia serpens* e *Peperomia obtusifolia* (MOTA et al., 2009; BATISTA JÚNIOR et al., 2011a; BATISTA JÚNIOR et al., 2011b; BATISTA JÚNIOR et al., 2012).

1.3 A espécie *Piper aduncum* (L.)

Piper aduncum é uma espécie arbórea de pequeno porte, com altura aproximada de seis a dez metros a qual é distribuída na Ásia e América do Sul, principalmente em locais úmidos (Figura 1, pág. 33). Esta espécie, popularmente conhecida no Brasil como aperta-ruão ou pimenta de macaco, é muito empregada na medicina tradicional como antiséptica, bactericida (contra infecções vaginais), diurética, cicatrizante, anti-hemorrágica e no tratamento de diarreia (ORJALA et al., 1993; MORANDIM, 2004). Estudos químicos realizados com folhas e caules de *Piper aduncum* resultaram no isolamento de três diidrochalconas, dois flavonóides, um fenilpropanóide, três derivados do ácido benzóico prenilados, bem como quatro cromenos, dos quais, o derivado prenilado 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxilato de metila apresenta potente atividade antifúngica frente à *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (MORANDIM et al., 2005; LAGO et al., 2009).

Figura 1 - *Piper aduncum* (L.)



Fonte: Fotografado por Amauri Alves de Souza Júnior, 2013

1.4 A espécie *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.

A espécie *Peperomia obtusifolia* apresenta distribuição desde o México até a América do Sul (MOTA et al., 2009), além do sul da Flórida (Figura 2, pág. 34). Essa espécie cresce em grandes rochas como uma litófita, mas também pode ser encontrada no solo, ou ainda desenvolve-se como uma epífita, crescendo sob os troncos das árvores (FONDON; CASTRO-NAVA; HUERTA, 2009). Estudos fitoquímicos realizados com folhas e caules de *Peperomia obtusifolia* evidenciaram a presença de amidas, lignanas, flavonoides, cromanos, megamastigano glicosilado, (MOTA et al., 2011), diidrochalconas, benzoquinonas, derivados do ácido orselínico prenilados (TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998), benzopiranos (MOTA et al., 2009; BURKE et al., 2003; BATISTA JUNIOR et al., 2011a; BATISTA JUNIOR et al., 2012), além de sesquiterpenos, predominantes como constituintes do óleo essencial das folhas (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010). Dentre os relatos quanto a potencialidade biológica tanto dos extratos como dos constituintes químicos isolados da espécie, destaca-se a atividade antifúngica frente à fitopatógenos (MOTA et al., 2011), antibacteriana (LENTZ et al., 1998) e tripanocida (MOTA et al., 2009; BATISTA JUNIOR et al., 2011b).

Figura 2 - *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.



Fonte: Fotografado por Amauri Alves de Souza Júnior, 2013

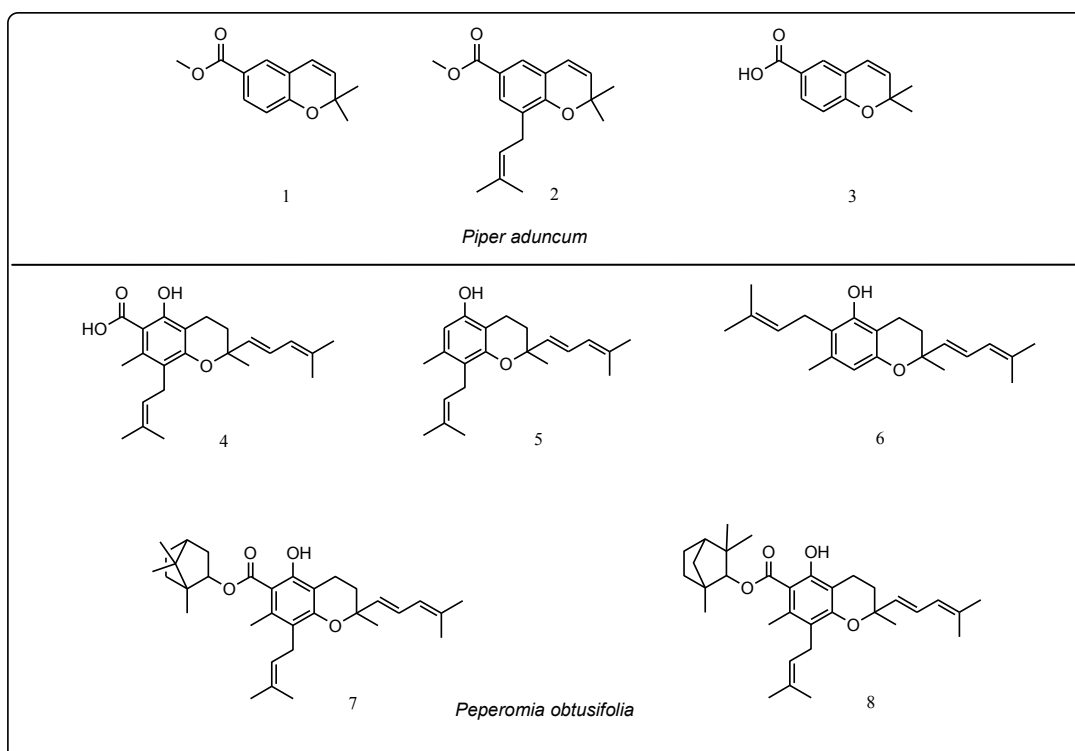
1.5 Bioatividade dos benzopiranos

Cromenos e cromanos são metabólitos secundários heterocíclicos comumente encontrados em espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia* (Figura 3, pág. 35). Esta classe é caracterizada pela presença de um núcleo benzopirânico, ou seja, um anel benzeno fundido a um anel pirano com diversos substituintes que podem apresentar diferentes níveis de saturação e oxidação (TANG et al., 2010).

Privilegiado do ponto de vista da química medicinal, o núcleo benzopirânico está presente como subunidade em um número significativo de moléculas naturais, tais como: chalconas, cumarinas, flavonas, vitamina E (tocoferóis) e tetraidrocanabinoides, as quais são responsáveis por diversas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo diurética e anticoagulante (TANG et al., 2010).

Inúmeras moléculas com atividade anti-hipertensiva (ASHWOOD et al., 1986), inibidoras da enzima aldose redutase (LIPINSKI et al., 1992), moduladora dos canais de potássio do miocárdio (GADWOOD et al., 1993; ATWAL et al., 1995), vasodilatadora coronariana (CHO et al., 1996) e hipolipêmica (KOYAMA et al., 2005) apresentam em comum o núcleo benzopirano em sua estrutura química.

Figura 3 - Cromenos e cromanos isolados de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*



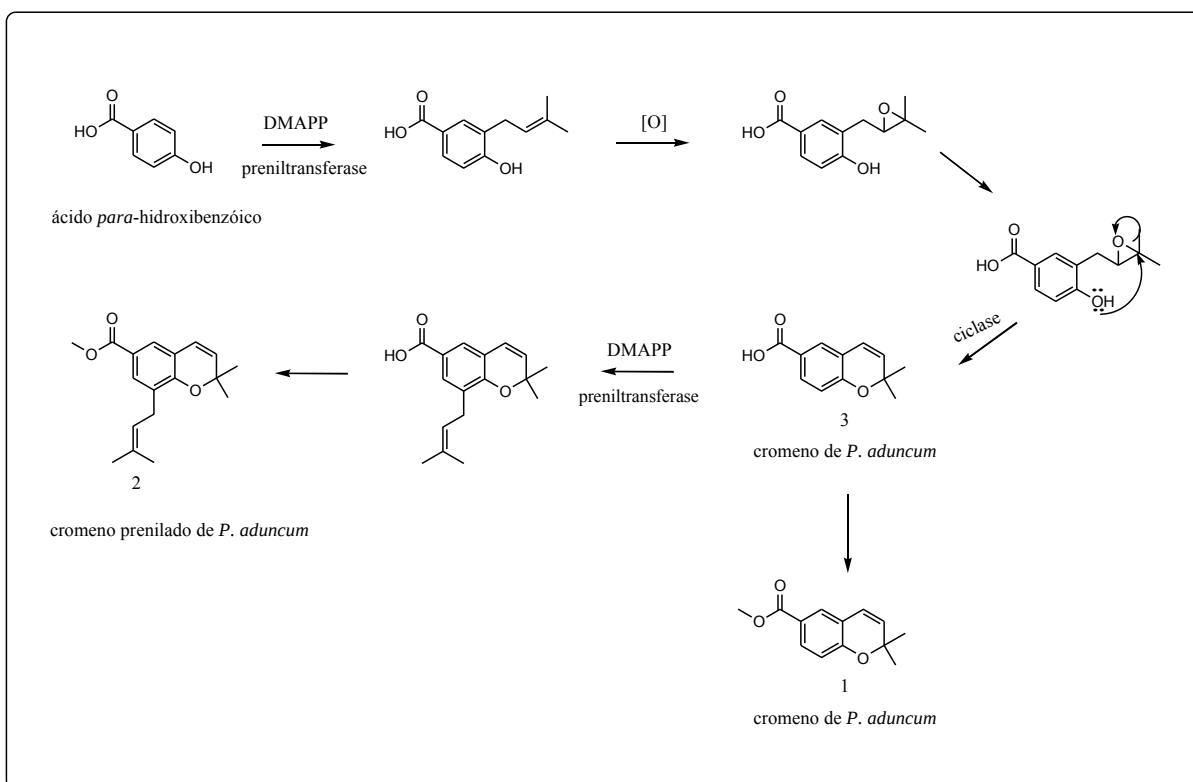
A exploração de substâncias contendo o núcleo benzopirano tem sido crescente para aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas, entre elas: síndrome de Down, Alzheimer, Parkinson, demência associada a AIDS e esquizofrenia (TANG et al., 2010; BONACORSO et al., 2012; KHOABI et al., 2012). Esta potencialidade farmacológica associada aos benzopiranos é atribuída, principalmente, a sua capacidade de se ligar a múltiplas classes de receptores protéicos com alta afinidade, além de ser suficientemente lipofílico, tornando-o mais eficiente quanto a sua capacidade para atravessar membranas celulares. Consequentemente, estima-se que mais de 12.000 substâncias naturais ou originárias de síntese planejadas contém o núcleo benzopirano (NICOLAOU et al., 2000).

Nesse contexto, é importante destacar que além das atividades relacionadas ao sistema cardiovascular e endócrino, cromanos e cromenos apresentaram atividade antitumoral (PARMAR et al., 2003), antimicrobiana (KATO; FURLAN, 2007; SABRY et al., 2011), tripanocida (MOTA et al., 2009; BATISTA JUNIOR et al., 2011b), anti HIV-1 (MA et al., 2008), antioxidante, antiviral (MORI et al., 2006), antiúlcera (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2010) e leishmanicida (NAZARIAN et al., 2010).

1.6 Origem biogenética dos cromenos e cromanos nos gêneros *Piper* e *Peperomia*, respectivamente

A formação de cromanos e cromenos em plantas, baseado nos estudos químicos realizados, é determinada por duas rotas biossintéticas distintas. Em espécies do gênero *Piper*, os cromenos devem ter como precursor base derivados do ácido benzoico, especialmente o ácido *para*-hidroxibenzoico ou protocatecúico. A biogênese dessa classe de metabólitos envolve a condensação de uma unidade C6-C1 (ácido *para*-hidroxibenzoico) e uma unidade isoprênica (IPP e/ou DMAPP). Uma posterior etapa de ciclização origina o anel oxibenzílico (LOPES et al., 2007) (Figura 4, pág. 37). O núcleo benzopirano pode ainda sofrer reações adicionais, tais como esterificações e prenilações.

Figura 4 - Biogênese dos cromenos **1**, **2** e **3** isolados de *Piper aduncum*



As enzimas responsáveis pelas reações de prenilação desses compostos, as preniltransferases, catalisam também as condensações das unidades isoprênicas (IPP e DMAPP) formando moléculas acíclicas que são precursoras de mais de 20.000 terpenoides. Dentre essas classes, destacam-se: esteroides, carotenoides, terpenoides, cromenos, cromanos, quinonas, catequinas e flavonas. As unidades isoprênicas podem a partir de reações de alquilação, dar origem aos compostos prenilados (LOPES, 2008).

Cabe ressaltar que existe uma gama de preniltransferases que atuam nas reações de C- e/ou O-prenilações em compostos aromáticos. E na atualidade são conhecidos mais de 700 metabólitos prenilados (LOPES, 2008). As condições de extração ótima das preniltransferases sugerem pH que varia de 7,5 até 10,0 e temperatura do meio reacional de 35,0 até 40,0° C, o que permite afirmar que se trata de uma classe de enzima estável. Além disso, as mesmas podem ter sua atividade potencializada na presença de cátions bivalentes, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , que atuam como cofatores (MORANDIM, 2004; MORANDIM et al., 2005; LOPES, 2008).

As unidades isoprênicas eram classicamente conhecidas como derivadas da via do mevalonato. No entanto, no início dos anos 2000 foi proposta uma via alternativa em plantas para a biossíntese de unidades isoprênicas, denominada via do metileritritol 4-fosfato (ROHMER, 2010). Inúmeros estudos utilizando glicose marcada com carbono ^{13}C , mais especificamente glicose-[1- ^{13}C], demonstraram que, essencialmente em plantas, as unidades isoprênicas derivadas da via do MVA participam da formação dos sesquiterpenos e triterpenos, enquanto que a via do MEP participa da biossíntese dos monoterpenos, diterpenos, e tetraterpenos (carotenoides) (ROHMER, 2010).

Um dos aspectos mais interessantes relacionados a essas duas vias metabólicas é que se apresentam compartimentalizadas; a via do MVA se encontra compartimentalizada no citoplasma, enquanto a via alternativa (MEP) nos plastídios. Estudos demonstraram também que as unidades de IPP/DMAPP poderiam transpor os interstícios celulares e uma biossíntese cruzada poderia ocorrer (LOPES et al., 2007, LEITE et al., 2007).

Mais recentemente, Rohmer (2010) demonstrou que a via MEP aparentemente segue um ritmo circadiano diurno. Por outro lado, não há indícios na literatura de que a via do MVA também descreve ritmo circadiano padrão.

Estudos desenvolvidos pelo grupo da Prof^a Dr^a Maysa Furlan demonstrou que o cromeno prenilado **2** (Figura 3, pág. 35) isolado de *Piper aduncum*, apresenta um ritmo circadiano diurno. Esses estudos circadianos também foram realizados com enfoque na prenilttransferase envolvida na prenilação do cromeno **1** (Figura 4, pág. 37) mostrando que a mesma também tem seu máximo de atividade coincidente com a produção dos cromenos **1** e **2** (MORANDIM et al., 2005). Estudos complementares foram realizados para a comprovação da origem biossintética das unidades IPP/DMAPP em *Piper aduncum*, os quais demonstraram que a prenilação do ácido *para*-hidroxibenzóico ocorre via MEP, enquanto que a prenilação subsequente ocorre via MVA (LEITE et al., 2007). Porém, o ritmo circadiano da ciclase em *Piper aduncum* envolvida na formação do anel oxibenzílico ainda é desconhecido, assim como o ritmo circadiano dos cromanos de *Peperomia obtusifolia*.

Diferentemente dos cromenos provenientes do gênero *Piper*, os cromanos e cromenos encontrados em espécies do gênero *Peperomia* apresentam biogênese baseada na via policetílica, tendo como precursor o ácido orselínico, cuja biossíntese é semelhante aos dibenzenofurano e derivados do ácido úsnico produzidos por líquens, via condensação aldólica (Figuras 5 e 6, págs. 40 e 41) (SALAZAR et al., 2005; KITAMURA et al., 2006; KATO; FURLAN, 2007; MOTA, 2007). Os substituintes do anel aromático nos cromanos de *Peperomia*, mais especificamente, um grupo metílico e a presença de uma hidroxila fenólica em posição *meta* entre si, corroboram para que a biossíntese dos cromanos no gênero *Peperomia* seja por uma via metabólica diferente daquela presente em espécies do gênero *Piper*.

A posição da metila aromática é determinada pela ligação da unidade prenila ou geranila que irá produzir a ciclização do anel pirano. Quando a unidade isoprênica (como por exemplo, prenila) está substituída no carbono **4** do ácido orselínico, o cromeno produzido terá a metila ligada ao anel aromático no carbono **5**, como observado para os cromenos de *Peperomia villipetiola* e *P. choloriana*, respectivamente (Figura 5, pág. 40) (MOTA, 2007). Consequentemente, quando a unidade isoprênica (como por exemplo, geranila) estiver substituída no carbono **6**, o cromano formado terá a metila ligada ao anel aromático no carbono **7**, como observado para os cromanos que mostram acúmulo em *Peperomia obtusifolia* (Figura 6, pág. 41) (MOTA, 2007). Outro aspecto importante é estudar a elucidação

da origem biossintética das unidades isoprênicas responsáveis pela prenilação do ácido orselínico e formação dos cromanos em espécies do gênero *Peperomia*. Essa etapa é importante uma vez que as unidades isoprênicas, IPP/DMAPP, podem ser originárias de vias biossintéticas distintas, incluindo a via do MVA e do MEP (BERGAMO et al., 2005; LEITE et al., 2007; LOPES et al., 2007).

Figura 5 - Biogênese para os cromenos isolados de *Peperomia villipetiola* e *Peperomia choloriana*, unidade de ciclização ligada ao carbono 4 do ácido orselínico

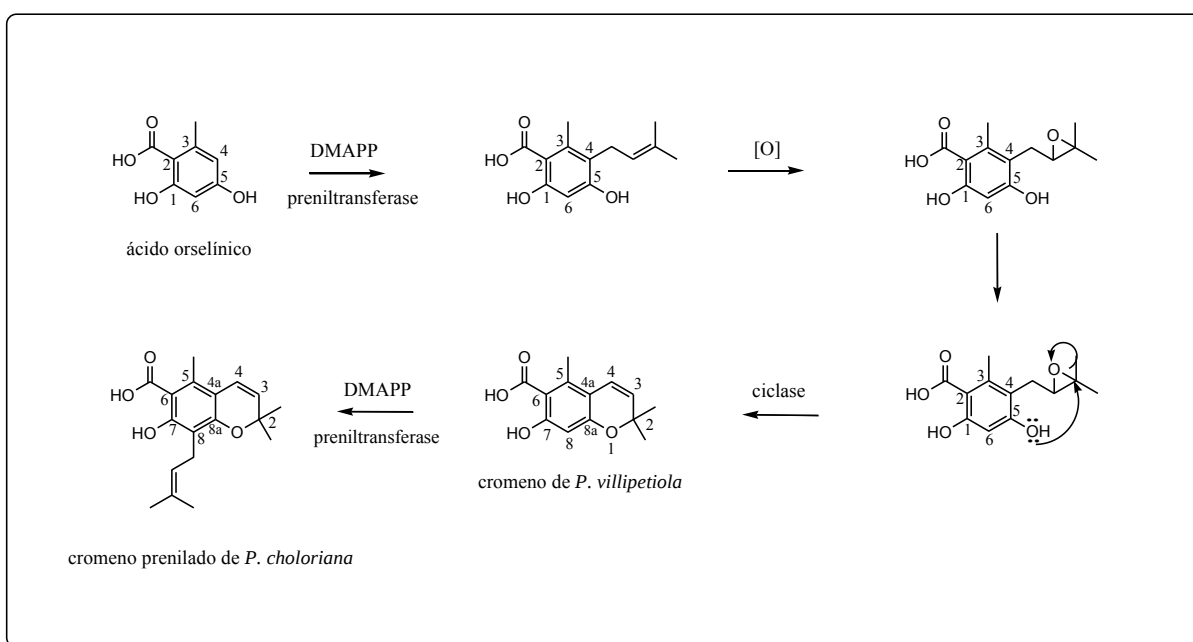
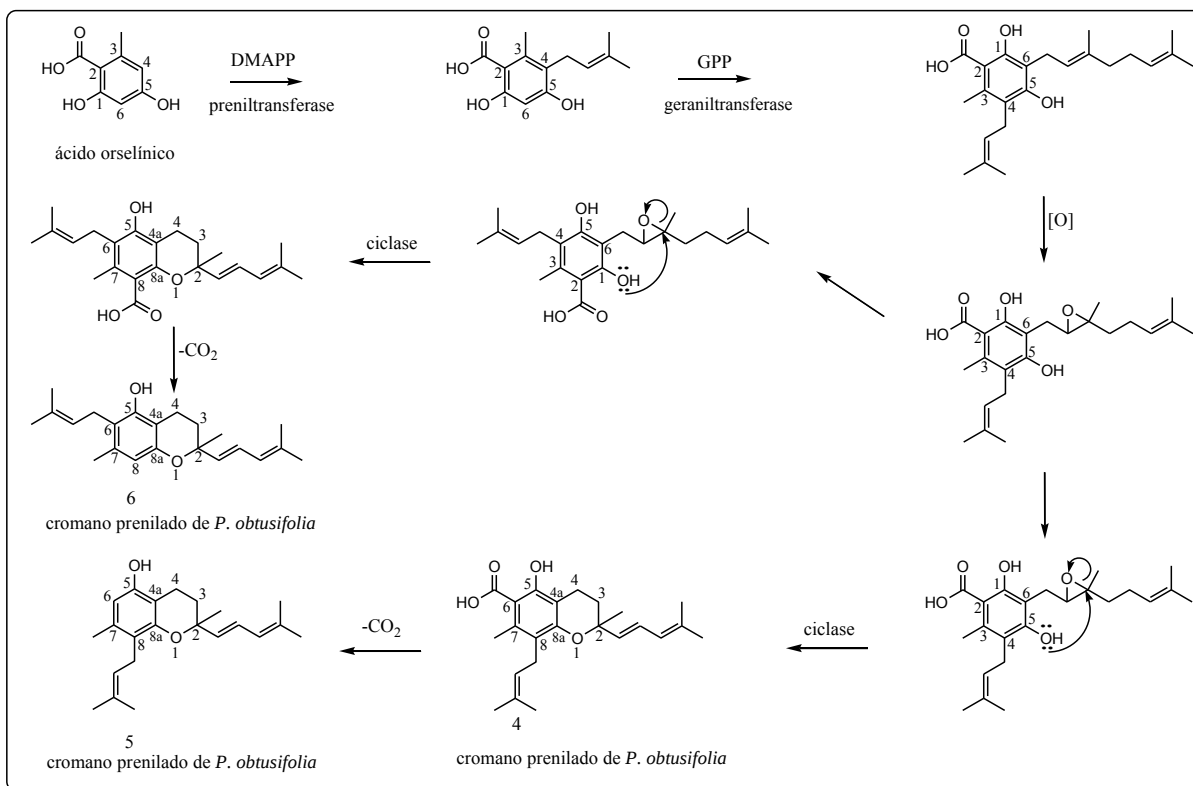


Figura 6 - Biogênese para os cromanos **4**, **5** e **6** isolados de *Peperomia obtusifolia*, unidade de ciclização ligada ao carbono **6** do ácido orselínico



Hipóteses foram postuladas quanto à biossíntese dos cromenos e cromanos de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* e novas perspectivas se abriram permitindo vários questionamentos que merecem ser elucidados. Todos os aspectos envolvidos na biossíntese dos cromenos e cromanos precisam ser investigados em *Piper aduncum* e sistematizados em *Peperomia obtusifolia*, sendo ainda proposto um modelo de biogênese diferenciada, a policetídica, cuja biossíntese e etapas de prenilação não foram ainda estudadas.

Portanto, experimentos visando o estabelecimento da dinâmica de formação dos cromanos de *Peperomia obtusifolia* e da prenilttransferase envolvida nas etapas de prenilação podem trazer subsídios importantes para a elucidação desta rota biossintética.

2 OBJETIVO

- Determinar a relação biossintética dos cromenos e cromanos provenientes das espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*, incluindo a determinação do ritmo de formação dos mesmos em nível metabólico e enzimático e analisar os extratos enzimáticos obtidos por eletroforese monodimensional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As espécies *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* são mantidas na casa de vegetação do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil. Ambas espécies foram identificadas pela Dr^a Inês Cordeiro do Instituto de Botânica (IBt de São Paulo, SP, Brasil) e suas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP – SP) exsicata Kato 0057 e no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo” (São Paulo) exsicata Kato 070, respectivamente.

3.2 Reagentes

- acetato-[2-¹³C] de sódio 99% de abundância isotópica (Sigma-Aldrich);
- ácido *para*-hidroxibenzóico (Sigma-Aldrich);
- difosfato de dimetilalila (DMAPP - Sigma-Aldrich);
- *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma-Aldrich);

3.3 Meio de cultura empregado no desenvolvimento dos fungos endofíticos isolados de *Peperomia obtusifolia*

O cultivo dos endófitos foi realizado em um único meio de cultura comercial composto de: batata, dextrose e ágar (Britania[®]) com adição de CaCO₃ (0,1 g.L⁻¹) e MgSO₄ (0,1 g.L⁻¹).

3.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) de 0,2 mm (Sorbent). As revelações das cromatoplas foram efetuadas pela inspeção em câmara com luz ultravioleta (UV) (Solab), nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e também mediante o uso dos seguintes reveladores: iodo sublimado e/ou solução de anisaldeído (0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido

acético glacial, 8,5 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado), mantido em estufa por 5 min.

3.5 Cromatografia em coluna

Para a cromatografia em coluna (CC) foram utilizadas colunas de vidro, de diâmetros variados, preenchidas com sílica gel 60 de granulometria entre 70 - 230 Mesh (63 – 200 μm) e 230 – 400 Mesh (40 – 63 μm) (Sigma-Aldrich).

3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.6.1 Solventes empregados

Metanol grau CLAE (Mallinckrodt, J.T. Baker e Tedia) e H_2O deionizada (18 m Ω ; Milli-Q, Millipore), os quais foram acidificados com ácido acético glacial grau P. A..

3.6.2 Cromatógrafos

- Analítico 1/Preparativo 1: cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-6AD, detector DAD modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF (analítico), injeção manual (preparativo) e *software* LC-Solution (1.23 SP1).
- Analítico 2: cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-10Ai, detector UV-vis modelo SPD-10A VP, injetor automático modelo SIL-10Ai e *software* CLASS-VP.

3.6.3 Colunas cromatográficas

- Analítica 1: coluna Phenomenex, Onyx[®] Monolítica C_{18} (100 x 4,6 mm, de 2-5 μm) e uma pré-coluna: Phenomenex, Onyx[®] C_{18} (50 x 4,6 mm);
- Analítica 2: coluna Phenomenex Gemini[®] C_{18} (250 x 4,6 mm, de 5 μm);

- Analítica 3: coluna Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ (150 x 4,6 mm, de 5 µm) e uma pré-coluna: Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ (50 x 4,6 mm);
- Semi-preparativa: coluna Phenomenex, Luna[®] C₁₈ (150 x 21,20 mm, 5 µm).

3.6.4 Condições de análises

- ✓ Condição 1 – modo analítico: a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O/HOAc 0,1% em eluição gradiente de 40 a 100% de MeOH em 30 min e 100% de MeOH até 40 min. O volume injetado foi de 30 µL, o fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, os comprimentos de onda analisados foram de 270 e 320 nm e temperatura do forno de 30° C.
- ✓ Condição 2 – modo analítico: a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O/HOAc 0,1% em eluição gradiente de 43 a 85% de MeOH de 0 à 4 min, mantendo nesta proporção até 7 min, chegando a 100% em 13 min e mantendo até 16 min. O volume injetado foi de 20 µL, o fluxo de 1 mL.min⁻¹, os comprimentos de onda analisados foram de 254 nm e temperatura do forno de 30° C;
- ✓ Condição 3 – modo analítico: a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O/HOAc 0,1% em eluição gradiente de 43 a 85% de MeOH em 15 min, mantendo nesta proporção até 35 min, chegando a 100% em 40 min e mantendo até 55 min. O volume injetado foi de 20 µL, o fluxo de 1 mL.min⁻¹, os comprimentos de onda analisados foram de 270 e 320 nm e temperatura do forno de 30° C;
- ✓ Condição 4 – modo preparativo: a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O em eluição gradiente de 73 a 90% de MeOH em 45 min e a 100% em 50 min. O volume injetado foi de 500 µL, o fluxo de 10 mL.min⁻¹, os comprimentos de onda analisados foram de 270 e 320 nm.
- ✓ Condição 5 – modo analítico: a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O/HOAc 0,5% em eluição isocrática 88% de MeOH em 20 min. O volume injetado foi de 20 µL, o fluxo de 1,3 mL.min⁻¹, o comprimento de onda analisado foi de 270 nm e temperatura do forno de 40° C;

3.6.5 Cartuchos e membranas de filtração para extração em fase sólida

- Cartuchos de fase reversa Strata C₁₈ (500 mg, 3 mL, Phenomenex®);
- Microfiltro de polipropileno (25 mm, 0,22 µm, Chromafil® Xtra RC-20/25).

3.7 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas

3.7.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA 300 (7,0 Tesla), operando em frequência de 300 MHz na frequência para o núcleo de hidrogênio. O solvente utilizado foi CDCl₃ (99,8%) com tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.7.2 Espectrometria de massas/espectrometria de massas (EM/EM)

As análise de espectrometria de massas em alta resolução e sequencial foram obtidas em um espectrômetro Bruker Daltonics® modelo ultrOTOF_Q ESI-TOF (Billerica, MA, EUA), operando em modo negativo. As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando uma seringa (100 µL) adaptada a uma bomba de infusão com fluxo de 100 µL.h⁻¹. O capilar foi aquecido a 150° C com fluxo de gás nebulizante 4L.min⁻¹ e 4 kV. Para a aquisição de dados foi utilizado o *software* Bruker Data Analysis, versão 3.2. A calibração interna foi realizada utilizando uma solução de Na-TFA (10 mg.mL⁻¹).

Também foi utilizado o espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics® modelo micrOTOF-Q II, operando em modo negativo. As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando uma seringa (100 µL) adaptada a uma bomba de infusão com fluxo de 100 µL.h⁻¹. O capilar foi aquecido a 180° C com fluxo de gás nebulizante 4L.min⁻¹ e 4 kV. Para a aquisição de dados foi utilizado o *software* Bruker Data Analysis, versão 3.2. A calibração interna foi realizada utilizando uma solução de Na-TFA (10 mg.mL⁻¹).

3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

Alta resolução (CLAE-EM): CLAE da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AD, injetor automático modelo SIL – 20 A e *software* LC-Solution (1.23 SP1) e detector de DAD modelo SPD-M20A, acoplado ao espectrômetro Bruker Daltonics® ultrOTOFG ESI-TOF (Billerica, MA, EUA), operando no modo negativo. Nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação e nebulização em fluxo de 265 e 27 L.h⁻¹, respectivamente. As condições instrumentais utilizadas foram: sonda eletrospray de 3 kV e cone de 25 V;

Baixa resolução (CLAE-EM e CLAE-EM-EM): CLAE da marca Agilent Technologies equipado com uma bomba quaternária Agilent 1200, injetor automático Agilent 1200 e detector de DAD Agilent 1260 acoplado ao espectrômetro de massas 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC-MS-MS Mass Spectrometer), operando em modo negativo e ionização por IES. Os parâmetros de operação instrumental para aquisição dos dados foram: energia do capilar: 4,500 kV; temperatura de dessolvatação: 450° C; gás de nebulização: 10 psi.

3.9 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

Os espectros na região do UV foram obtidos a partir dos detectores de DAD, acoplados aos equipamentos de CLAE utilizados nas separações cromatográficas.

As determinações da concentração proteica foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/visível modelo “Ultrospec 2100 Pro UV/Visible”.

3.10 Demais equipamentos

- ✓ A cuba utilizada na eletroforese SDS-PAGE foi uma Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster; Fonte Eletrophoresis Power Supply EPS 301;
- ✓ As imagens dos géis foram obtidas em um *Scanner* Magic Scan 32 V-4,6 (Amersham Biosciences);
- ✓ Centrífuga refrigerada para o processo de extração enzimática (SORVALL® RC PLUS) e Microcentrífuga empregada no preparo das amostras para eletroforese SDS-PAGE (Denver Instrument Force 7).

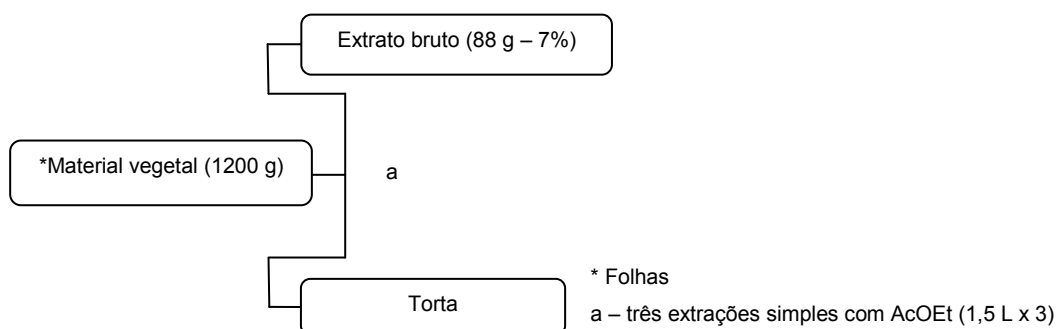
4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Isolamento do cromeno 2 de *Piper aduncum*

4.1.1 Obtenção do extrato vegetal

As folhas (1200 g) de *Piper aduncum* foram coletadas na casa de vegetação do Instituto de Química de Araraquara e secas em estufa de ar circulante a 40° C por cinco dias. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas tipo *Willey* e submetidas à extração por maceração (1,5 L x 3, com intervalo de quatro dias) com AcOEt a temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi concentrado a pressão reduzida (Figura 7, pág. 48).

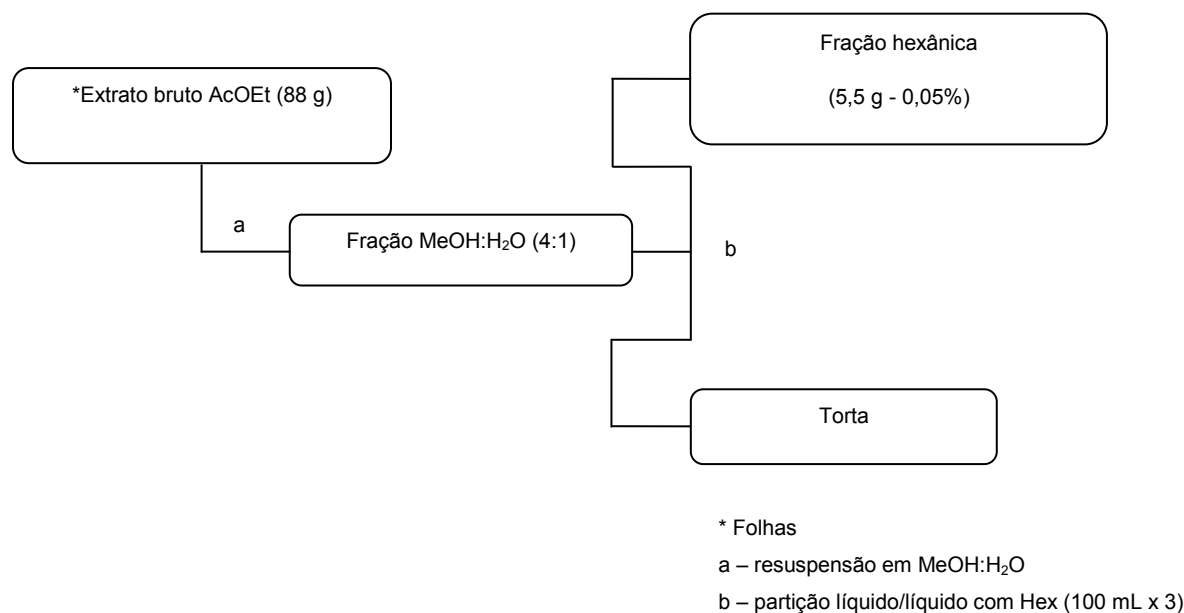
Figura 7 - Preparação do extrato AcOEt de folhas de *Piper aduncum*



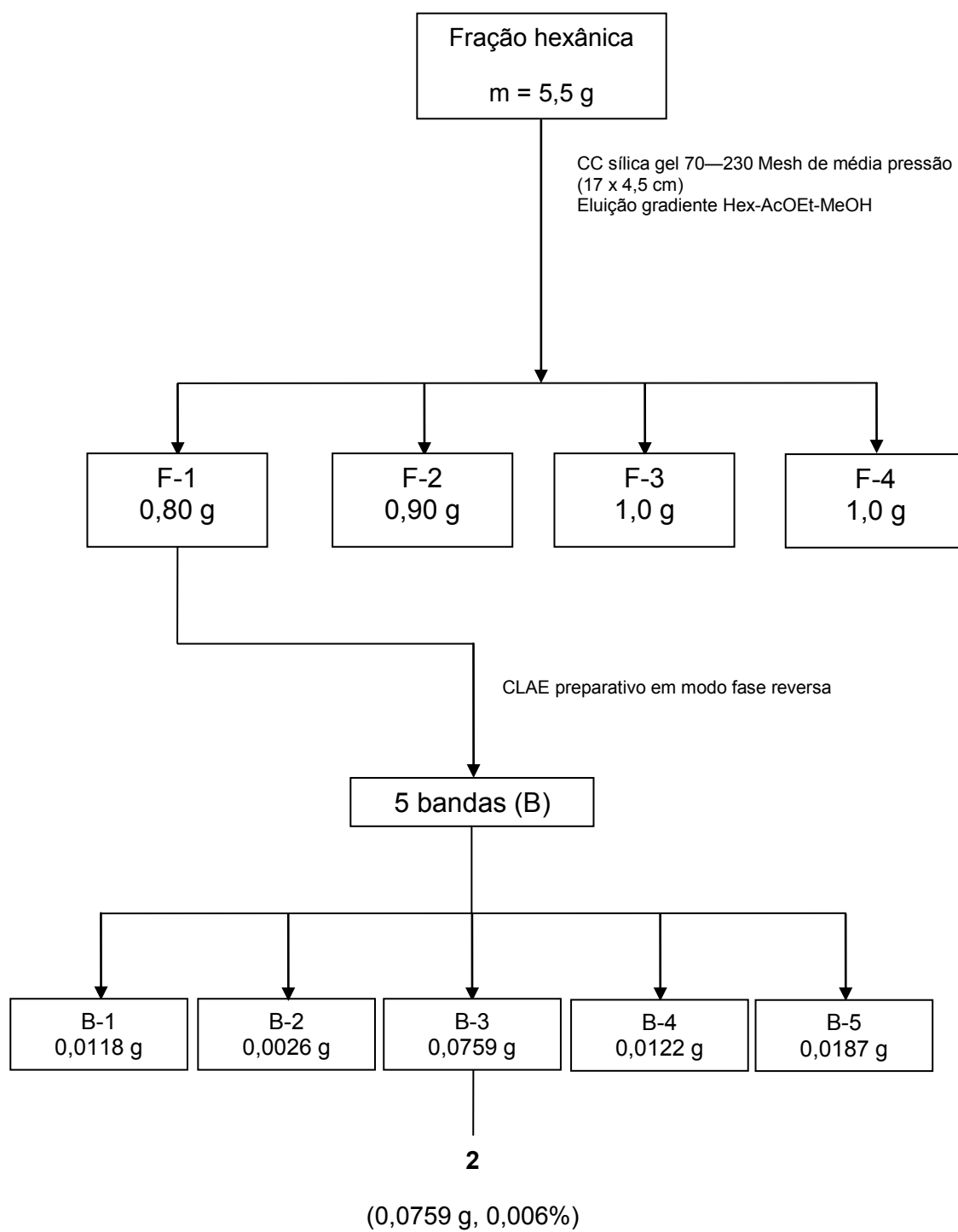
4.1.2 Partição líquido-líquido do extrato bruto AcOEt de *Piper aduncum*

O extrato bruto AcOEt de *Piper aduncum* (88 g) foi resuspendido em 300 mL MeOH:H₂O 4:1 (v.v⁻¹) e submetido ao processo de partição líquido-líquido com Hex (100 mL x 3), sendo os solventes evaporados posteriormente em rotaevaporador a pressão reduzida (Figura 8, pág. 49).

Figura 8 - Partição líquido-líquido do extrato AcOEt de *Piper aduncum*



A fração hexânica (5,5 g) foi submetida à CC a pressão reduzida (17 x 4,5 cm) (média pressão), utilizando sílica-gel como fase estacionária em modo de eluição gradiente, empregando como fase móvel Hex:AcOEt (95:05) até 100% de MeOH. As frações coletadas foram comparadas por CCDC, originando-se assim um total de quatro subfrações. A subfração 1 (F-1, 0,8 g, 0,07%) foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência em modo preparativo conforme a condição 4 descrita no item 3.6.4 (pág. 45) e empregando a coluna semi-preparativa (item 3.6.3, pág. 44). Foram coletadas cinco bandas cromatográficas, das quais a terceira banda (B-3) resultou no cromeno **2** (0,0759 g, 0,006%). A figura 9 (pág. 50) resume o fracionamento cromatográfico realizado com a fração hexânica.

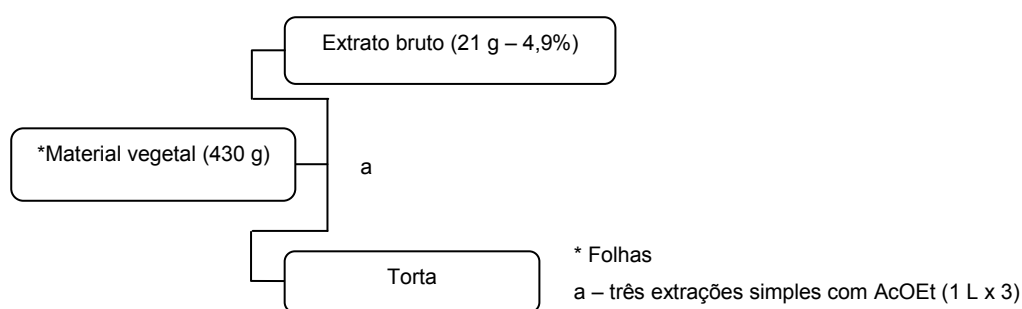
Figura 9 - Fracionamento cromatográfico da fração hexânica de folhas de *Piper aduncum*

4.2 Isolamento do cromano 4 de *Peperomia obtusifolia*

4.2.1 Obtenção do extrato vegetal

Folhas de *Peperomia obtusifolia* foram coletadas na casa de vegetação do Instituto de Química de Araraquara e secas em estufa de ar circulante a 40° C por cinco dias. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas tipo *Willey* e submetidas à extração por maceração (1 L x 3, com intervalo de quatro dias) com AcOEt a temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi concentrado a pressão reduzida (Figura 10, pág 51).

Figura 10 - Preparação do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*

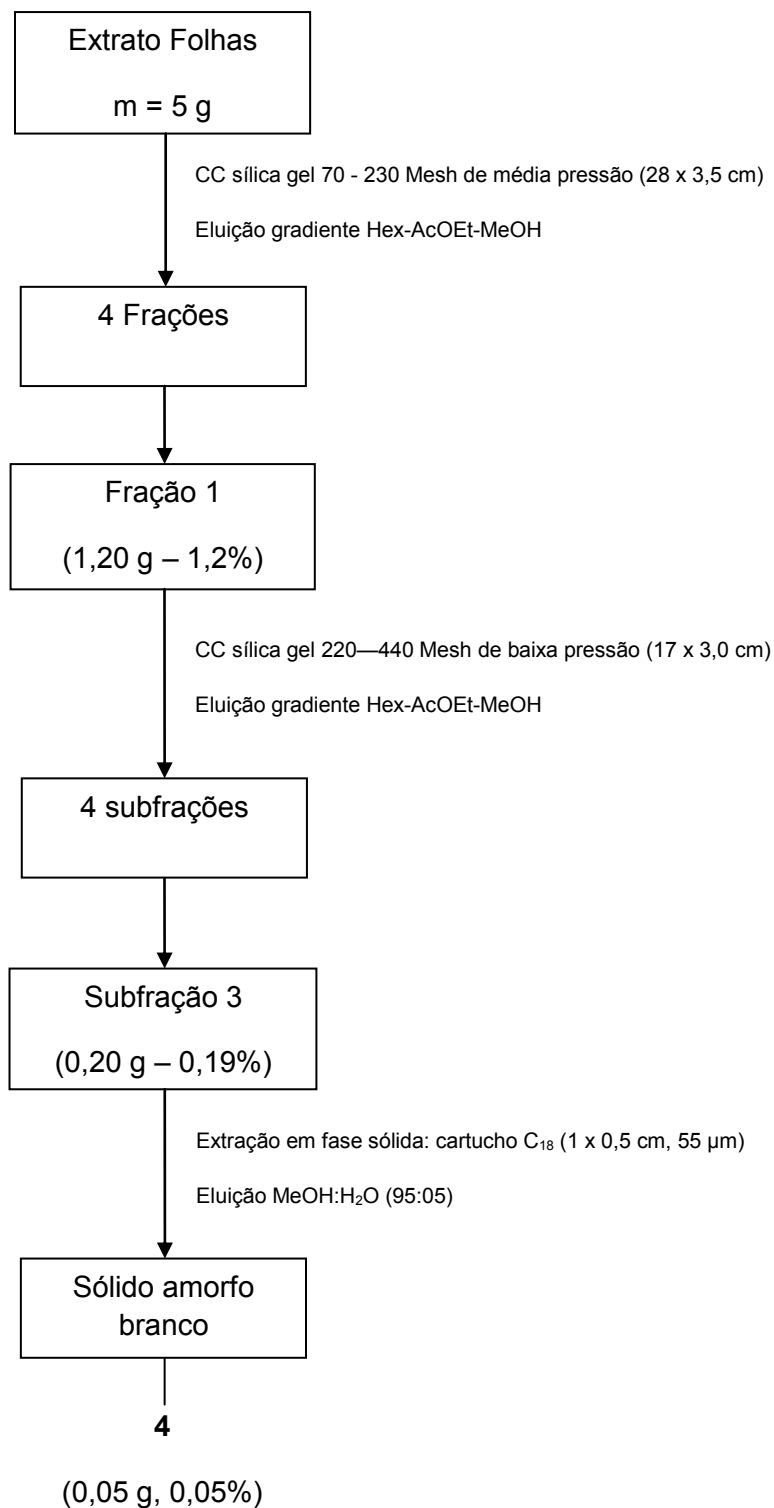


4.2.2 Processo cromatográfico

O extrato bruto AcOEt de *Peperomia obtusifolia* (5 g) foi submetido à cromatografia em coluna à pressão reduzida (28 x 3,5 cm) (média pressão), utilizando sílica-gel como fase estacionária, em modo de eluição gradiente, empregando como fase móvel Hex:AcOEt (95:05) até 100% de MeOH. As frações foram comparadas por CCDC, o que originou um total de quatro frações (Figura 11, pág. 52). A fração 1 (1,20 g, 1,2%) foi submetida a uma segunda CC (17 x 3,0 cm), a pressão reduzida, utilizando sílica-gel como fase estacionária, em modo de eluição gradiente, empregando como fase móvel Hex:AcOEt (95:05) até 100% de MeOH. Para cada subfração foram coletados 20 mL. As subfrações que corresponderam a mistura de solventes entre 80 a 70% de Hex:AcOEt, após análise por CCDC, foram reunidas (0,20 g, 0,19%) e submetidas à extração em fase sólida utilizando fase móvel MeOH:H₂O (95:05). Este último procedimento resultou no isolamento do

cromano **4** (0,5 g, 0,05%). A figura 11 (pág. 52), resume o fracionamento cromatográfico realizado com o extrato AcOEt das folhas de *Peperomia obtusifolia*.

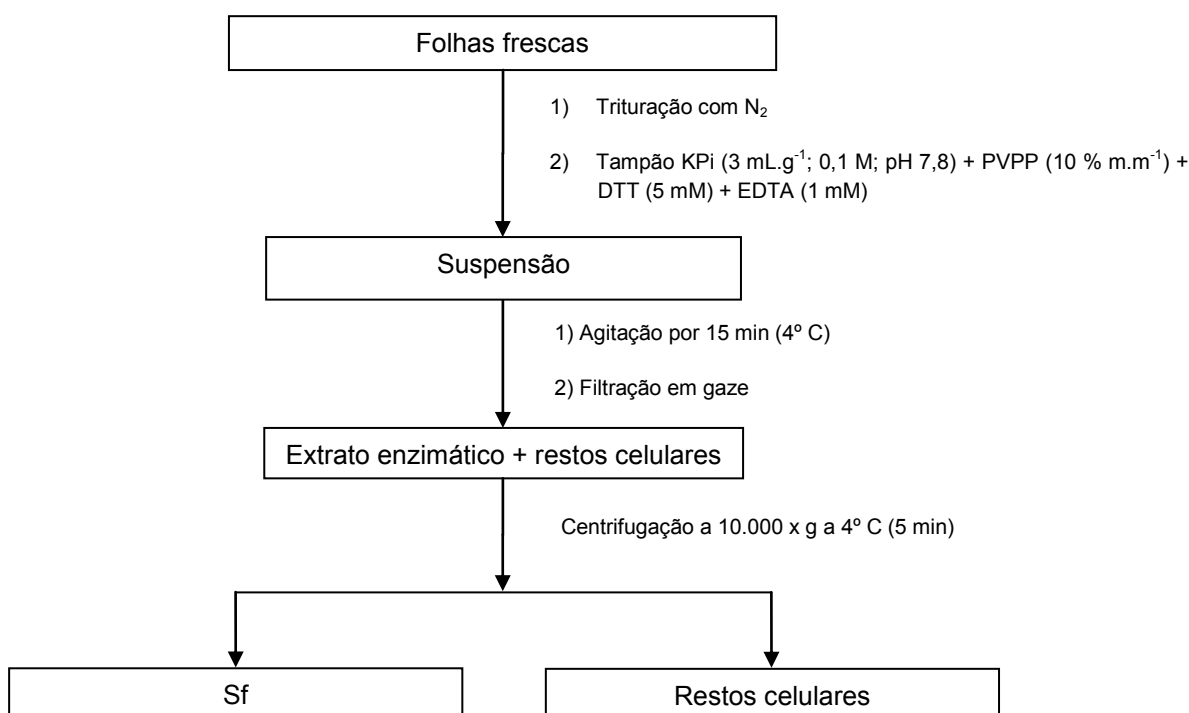
Figura 11 - Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de *Peperomia obtusifolia*



4.3 Extração enzimática das folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*

A extração enzimática com vista a determinar o perfil proteico foi realizada utilizando-se folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*. Folhas frescas de *Piper aduncum* (10 g) foram trituradas em nitrogênio líquido (N_2), utilizando gral e pistilo. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de solução tampão KPi (3 mL.g^{-1} ; 0,1 M; pH 7,8). A solução tampão continha PVPP ($10\% \text{ m.m}^{-1}$), DTT (5 mM) e EDTA (1 mM). A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 min em banho de gelo. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze, transferido para tubo de centrifuga mantido a 4°C e centrifugado a $10.000 \times g$ por 5 min (4°C). O sobrenadante resultante (Sf) foi congelado a -20°C e reservado para os ensaios de dosagem proteica e eletroforese (Figura 12, pág. 53). O mesmo procedimento foi realizado com as folhas de *Peperomia obtusifolia* (10 g).

Figura 12 – Extração enzimática das folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*



4.4 Determinação da concentração proteica dos extratos enzimáticos

A determinação da concentração de proteína total nas amostras foi realizada utilizando-se o método de Bradford com algumas modificações (STOSCHECK, 1990).

O reagente foi preparado utilizando 500 mL de HCl ($0,6 \text{ mol.L}^{-1}$) ao qual foi adicionado *Coomassie Brilliant Blue* G-250 suficiente para atingir valores de 1,3 - 1,5 unidades de absorvância, medidas a 465 nm.

Uma curva analítica foi construída a partir de uma solução padrão de albumina bovina (BSA, na concentração 1 mg.mL^{-1}). Foram utilizados volumes de 5 a 50 μL da solução de BSA, os quais foram colocados em uma cubeta de poliestireno e incubados com 1000 μL de água e 1000 μL do reagente de Bradford. Após homogeneização e mais 5 min de incubação a temperatura ambiente, os valores de absorvância foram determinados a 595 nm. A calibração do valor 0 foi realizada com uma solução contendo apenas uma mistura do reagente e H_2O . O teste foi realizado utilizando-se 10 μL dos extratos enzimáticos, 1000 μL de água e 1000 μL do reagente de Bradford. A solução foi agitada e transferida para uma cubeta de poliestireno. Após 5 min a leitura das absorvâncias foi realizada a 595 nm. Cada valor de absorvância foi determinado em duplicata. A partir da equação de regressão linear obtida na curva analítica de BSA e com base nas absorvâncias das amostras estimou-se a concentração proteica do extrato enzimático.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

4.5.1 Preparo das soluções

· Tampão de separação (pH 8,8)

TRIS	1,5 M
SDS	0,4% p.v ⁻¹

· Tampão de concentração (pH 6,8)

TRIS	0,5 M
SDS	0,4% p.v ⁻¹

· Solução acrilamida-bisacrilamida

acrilamida	30% p.v ⁻¹
bisacrilamida	0,8% p.v ⁻¹

· Solução bisacrilamida

bisacrilamida	2% p.v ⁻¹
---------------	----------------------

· Solução tampão (*loading buffer*) *

TRIS-HCl 1,5 M (pH 6,8)	0,83 mL
glicerol	4,0 mL
SDS (20%)	4,0 mL
EDTA	37,22 mg
azul de bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	Completar para 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 DTT (0,5 M).

· **Solução tampão de corrida (pH 8,3) ****

TRIS	0,025 M
glicina	0,192 M
SDS	0,1%

** Esta solução foi armazenada a -20° C.

4.5.2 Preparo do gel de eletroforese

São necessários dois tipos de géis, o gel de separação e o gel de concentração. Estão indicadas abaixo as proporções dos reagentes que foram necessárias para preparar o gel de separação 12%.

· **Preparo do gel de separação 12%**

Reagente	Volume
Tampão de separação	1,25 mL
Solução acrilamida-bisacrilamida	2 mL
H ₂ O	1,72 mL
PSA (10% p.v ⁻¹)***	0,050 mL
TEMED	0,007 mL

*** Deve-se preparar no momento de ser utilizado.

· **Preparo do gel de concentração**

Reagente	Volume
Tampão de concentração	0,375 mL
Solução acrilamida-bisacrilamida	0,150 mL
H ₂ O	0,770 mL
Bisacrilamida 2%	0,100 mL
PSA (10% p.v ⁻¹)****	0,015 mL
TEMED	0,0025 mL

**** Deve-se preparar no momento de ser utilizad

4.5.3 Preparo e aplicação dos extratos enzimáticos de folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* e do padrão no gel de eletroforese

Após a determinação da concentração proteica dos extratos enzimáticos, estes foram submetidos à análise por meio de 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 de cada fração proteica com 10 μL de solução tampão (*loading buffer*, item 4.5.1, pág. 55) e aquecidas em banho a 100°C , durante 5 min. Estas soluções foram então centrifugadas a $9000 \times g$ por 30 segundos e posteriormente aplicadas no gel. Removeu-se cuidadosamente o pente do gel e adicionou-se solução tampão até preencher todos os espaços. Aplicaram-se as amostras ao gel (10 μL), de forma que cada uma foi colocada em uma janela do gel. A solução padrão também foi adicionada na primeira janela do gel. Como padrão foi utilizado 5 μL de uma solução que continha as enzimas descritas na tabela 1, pág. 57. A esta solução foram adicionados 25 μL de H_2O deionizada e 10 μL de tampão (*loading buffer*, item 4.5.1, pág. 55). Os mesmos procedimentos de aquecimento e centrifugação descritos para as amostras foram realizados com a solução padrão. Foram aplicados 10 μL da solução padrão na primeira e última janela do gel.

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

Enzima	Massa molecular (kDa)
fosforilase b	97,4
albumina sérica	66,2
ovoalbumina	45,0
anidrase carbônica	31,0
inibidora de tripsina	21,5
α -lactalbumina	14,4

4.5.4 Desenvolvimento e revelação do gel de eletroforese

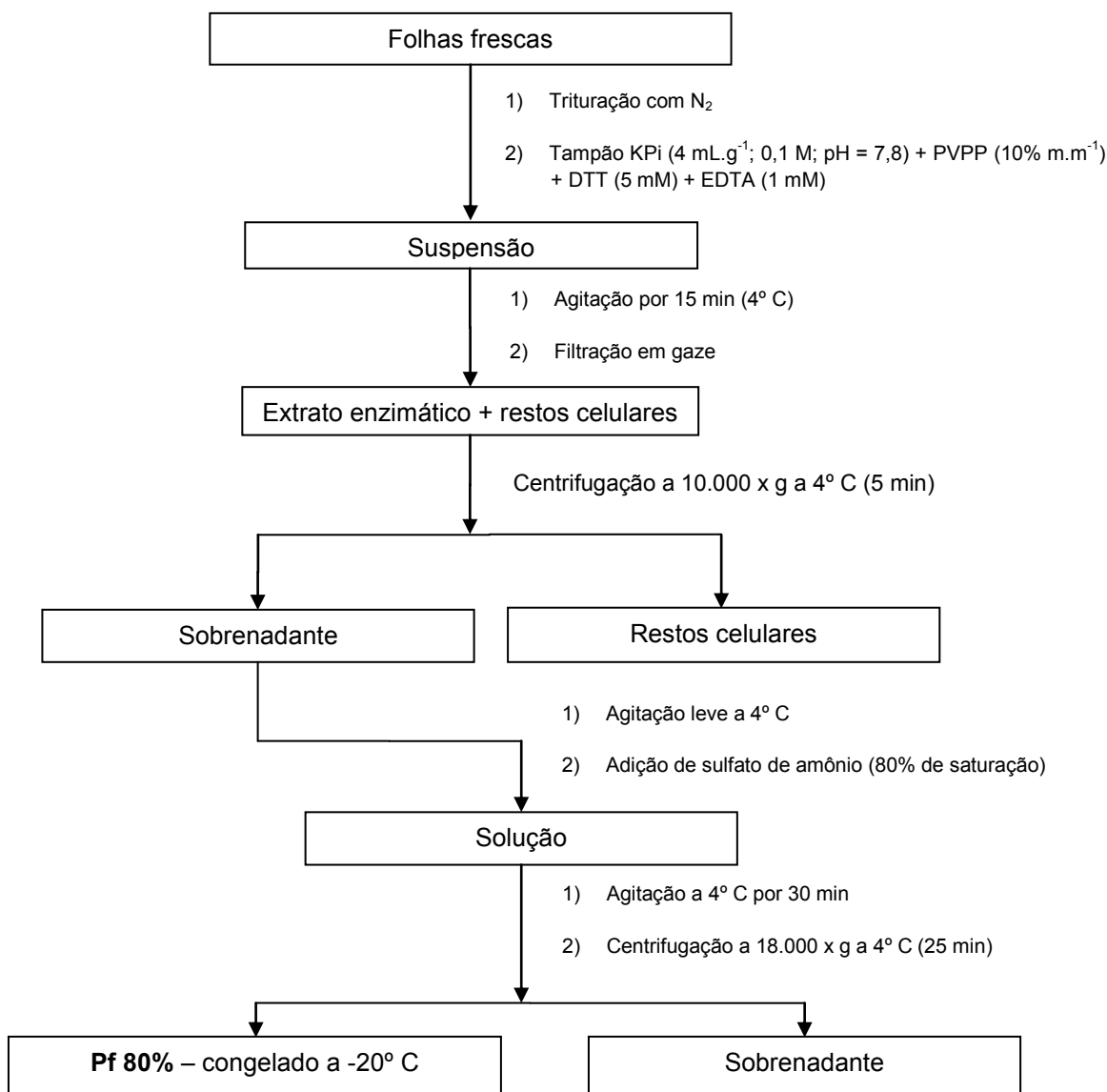
Para o desenvolvimento da eletroforese SDS-PAGE o gel foi homogeneizado sobre o suporte, o volume da solução tampão de corrida (item 4.5.1, pág. 55) completado, e então, ao gel foi aplicado uma corrente constante de 20 mA (120 V). Quando o tampão de corrida atingiu o final do gel, a fonte de corrente foi desligada (cerca de 60 min). Ao término, o gel foi retirado do suporte e iniciou-se o processo de revelação. O reagente utilizado para revelação foi o nitrato de prata (AgNO_3). Ao gel foi adicionada uma solução 10% de ácido tricloroacético e submetido à agitação por 60 min. Esta solução foi então descartada e adicionou-se água destilada. O gel foi submetido à agitação em água destilada por 30 min. A solução foi então descartada e adicionou-se uma solução de DTT ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) com posterior agitação, por mais 20 min. Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionou-se uma solução de 0,1% de AgNO_3 , a qual foi devidamente descartada após 30 min. Em seguida foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 3%, que continha 0,085% de formaldeído. Após 1 min esta solução foi descartada, adicionando-se outra vez a solução de carbonato de sódio e formaldeído. Após o aparecimento das bandas relativas às proteínas, a reação foi finalizada adicionando-se uma solução de HOAc 5% até não se observar mais o desprendimento de CO_2 . Ao término, esta solução foi descartada, e o gel foi lavado com água destilada por três vezes. O procedimento empregado na revelação com AgNO_3 está descrito na tabela 2, pág. 58. Foi preparado o volume de 100 mL das respectivas soluções.

Tabela 2 - Etapas envolvidas na revelação do gel de eletroforese utilizando AgNO_3 (0,1%) como agente revelador

Etapas	Nome	Tempo (Agitação)
1 - solução 10% de $\text{C}_2\text{HO}_2\text{Cl}_3$	Fixação	60'
2 - H_2O deionizada	Lavagem	30'
3 - solução de DTT ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)	Redução	20'
4 - solução 0,1% de AgNO_3	Reação com Ag^+	30'
5 - solução de Na_2CO_3 3% + 0,085% de CH_2O	Revelação	1'
6 - solução de Na_2CO_3 3% + 0,085% de CH_2O	Revelação	-
7 - HOAc 5% (etapa de interrupção)	Interrupção	-
8 - H_2O deionizada	Lavagem	5'

4.6 Extração enzimática para ensaio da enzima preniltransferase

A extração direcionada ao ensaio da enzima preniltransferase envolvida na etapa de biossíntese dos cromenos foi realizada utilizando-se folhas de *Piper aduncum*. Folhas frescas de *Piper aduncum* (25 g) foram trituradas em N₂ utilizando gral e pistilo. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de solução tampão KPi (4 mL.g⁻¹ folhas; 0,1 M; pH = 7,8). A solução tampão continha PVPP (10% m.m⁻¹), DTT (5 mM) e EDTA (1 mM). A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 min em banho de gelo. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze, transferido para tubo de centrifuga mantido a 4° C e centrifugado a 10.000 x g por 5 min (4° C). Após obtenção da solução enzimática, foi realizada uma precipitação fracionada. Inicialmente foi adicionado sulfato de amônio ao sobrenadante resultante (Sf) para atingir a saturação de 80% (474 g.L⁻¹ de sulfato de amônio). Após todo o sal ter sido adicionado, a solução foi mantida sob agitação por 30 min a 4° C e centrifugada a 18.000 x g por 25 min (4° C). O precipitado resultante (Pf) foi congelado a -20° C e reservado para os ensaios enzimáticos (Figura 13, pág. 60).

Figura 13 – Extração enzimática de folhas de *Piper aduncum*

4.6.1 Dessalinização

Para o processo de dessalinização, após etapa de precipitação salina foi empregada coluna PD-10, a qual foi inicialmente equilibrada com 25 mL de solução tampão KPi 0,1 M (pH = 7,8). Assim, o Pf obtido como indicado no item 4.6 pág. 59, foi resuspendido em 3 mL de solução tampão KPi (0,1 M, pH = 7,8) e uma alíquota de 2,5 mL desta solução foi aplicada na coluna PD-10 e esta descartada. A eluição da fração de interesse foi feita com aplicação de uma segunda alíquota de 3,5 mL de solução tampão, a qual foi reservada para os ensaios enzimáticos.

4.6.2 Ensaio enzimático

Para o ensaio enzimático foram adicionados em um tubo de eppendorf 100 μL de tampão KPi 0,1 M (pH 7,8), 35 μL de solução enzimática e 100 μL de cofator. Este meio reacional foi mantido em banho a 38° C, por 5 min. A reação foi então iniciada com a adição de 15 μL do ácido *para*-hidroxibenzóico e 15 μL de DMAPP e incubada a 38° C sob agitação. Também foram preparados dois tipos de brancos para controle da análise, os quais foram submetidos aos mesmos tratamentos das reações completas: sendo um contendo o substrato e não apresentando a enzima, e o segundo branco o inverso do anterior. Os brancos foram submetidos as mesmas condições reacionais das amostras. Transcorridos o tempo de incubação (60 min), a reação foi finalizada e os produtos extraídos com a adição de 500 μL de AcOEt. Posteriormente, as amostras foram mantidas sob agitação por 10 segundos, e então, centrifugada a 9.000 x g por 5 min e 450 μL da fase orgânica foram coletados (o processo de extração foi realizado três vezes). Após, evaporação do solvente, as amostras foram resuspendidas em 200 μL de MeOH e analisadas por CLAE-UV, empregando-se a condição 2 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna 2 (item 3.6.3, pág. 44) com $\lambda = 254 \text{ nm}$. A tabela 3 pág. 61, descreve os experimentos da reação enzimática.

Tabela 3 - Ensaio enzimático em *Piper aduncum*

Tipo	Tampão KPi (0,1M; pH = 7,8)	Substrato	DMAPP	MgCl₂	Extrato proteico (folhas)
Branco enzima (BE)	100 μl	-	15 μl	100 μl	35 μl
Branco substrato (BP)	100 μl	15 μl	15 μl	100 μl	-
1° reação	100 μl	15 μl	15 μl	100 μl	35 μl
2° reação	100 μl	15 μl	15 μl	100 μl	35 μl
3° reação	100 μl	15 μl	15 μl	100 μl	35 μl

Substrato: 0,15 mg.mL⁻¹; DMAPP: 10 mM; MgCl₂: 10 mM

4.7 Experimentos de incorporação *in vivo* do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio em *Peperomia obtusifolia*

Para a incorporação de acetato-[2-¹³C] de sódio, os pecíolos com folhas foram excisados de plantas jovens e mergulhados em 200 µL de uma solução aquosa de acetato-[2-¹³C] de sódio 0,1% m/v (Figura 14, pág. 62). Quando toda a solução foi absorvida, foram adicionados mais 200 µL de água e iniciou-se a contagem do tempo. Para avaliar o período de metabolização do precursor na planta foram realizados experimentos de incubação nos períodos de: 8, 12, 16, 24, 48 e 72 h; todos realizados em duplicata (n = 2), a 25° C e sob as mesmas condições. Para garantir que os pecíolos se mantivessem vivos durante a incubação, os experimentos foram monitorados frequentemente, adicionando-se água quando necessário.

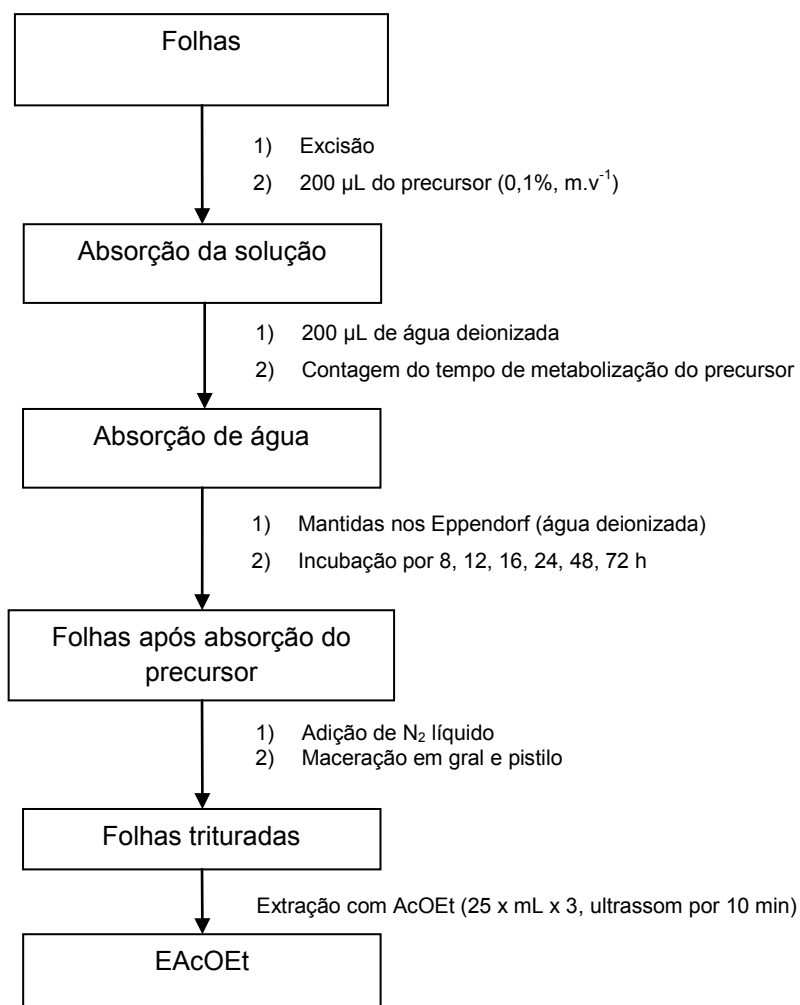
Ao término de cada período de incubação avaliado, os pecíolos foram retirados da água, pesados, imersos em nitrogênio líquido e macerados até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Após, adicionou-se 25 mL de AcOEt ao material vegetal, o qual foi mantido em banho de ultrassom por 15 min. Em seguida, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para cada amostra foram realizadas três extrações com intervalos de quatro dias cada (Figura 15, pág. 63).

Figura 14 - Foto ilustrativa dos experimentos de incorporação de acetato-[2-¹³C] de sódio em pecíolos com folhas de *Peperomia obtusifolia*



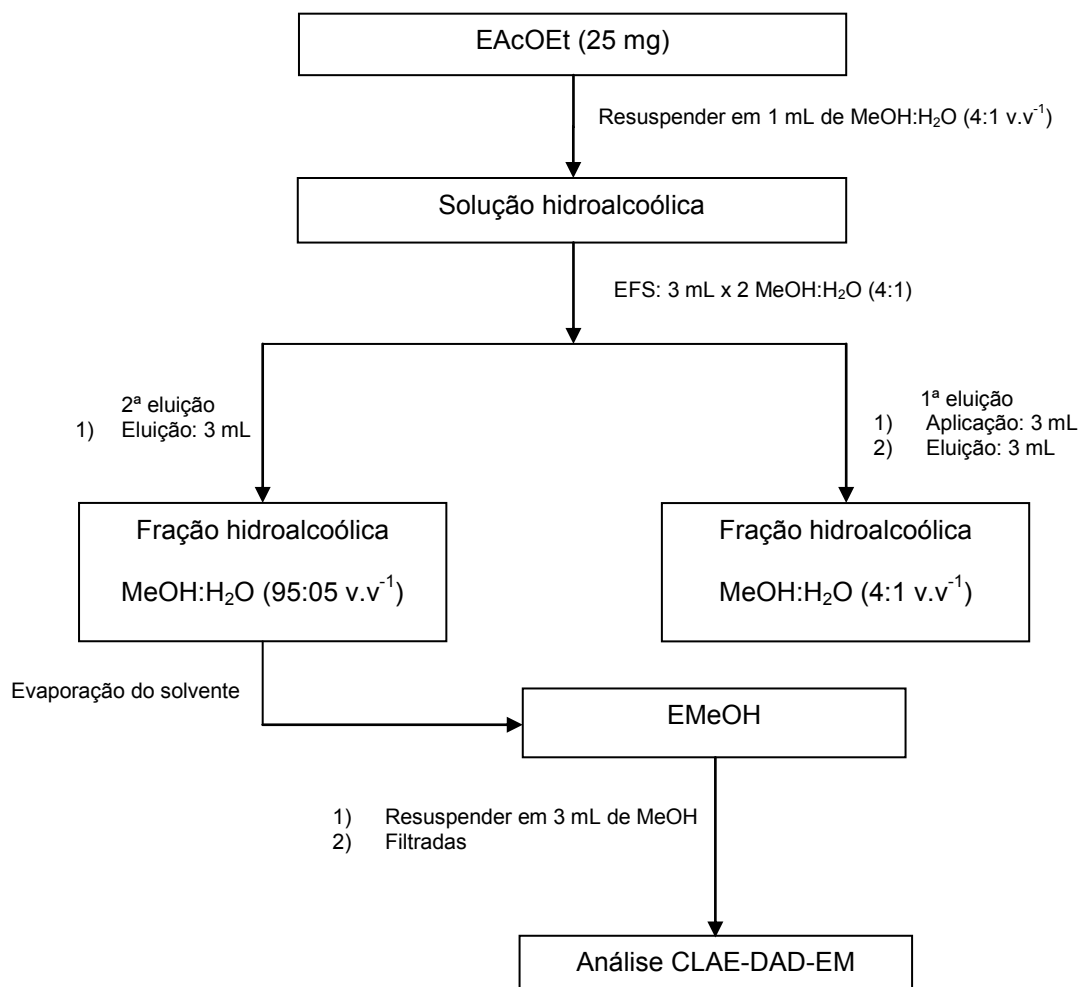
Fonte: Fotografado por Amauri Alves de Souza Júnior, 2012

Figura 15 - Incorporação do precursor acetato-[2- ^{13}C] de sódio em pecíolos com folhas de *Peperomia obtusifolia*



4.7.1 Preparo das amostras para análise por CLAE-DAD-EM/AR

Após etapa de extração, as amostras foram submetidas ao processo de EFS, a pressão reduzida, utilizando cartuchos com fase estacionária sílica gel C_{18} , previamente ativados com MeOH e condicionados com MeOH:H $_2$ O (4:1 v.v $^{-1}$). 25,0 mg de extrato foi dissolvido em 1,0 mL da mistura MeOH:H $_2$ O (4:1 v.v $^{-1}$). Esta solução foi aplicada ao cartucho de EFS e eluída com 3,0 mL de MeOH:H $_2$ O (4:1 v.v $^{-1}$), posteriormente, mais 3,0 mL de MeOH:H $_2$ O (95:05 v.v $^{-1}$) foi aplicada no cartucho de EFS, apenas a segunda fração foi monitorada por CLAE-DAD-EM. Após a secagem, as amostras foram resuspendidas em MeOH e filtradas em microfiltro de poros de 0,22 μm (Figura 16, pág. 64). Nessas análises foram empregadas a condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44).

Figura 16 - Fluxograma do processo de EFS dos EAcOEt

4.7.2 Experimentos de incorporação *in vivo* do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio em *Peperomia obtusifolia* – estudo de biossíntese “de novo” do cromano 4

Com intuito de melhor avaliar a metabolização de acetato-[2-¹³C] de sódio nos estudos de biossíntese do cromano **4** em folhas de *Peperomia obtusifolia*, o experimento de incorporação *in vivo* com acetato de sódio enriquecido com ¹³C foi realizado novamente. Nesta fase, a planta com folhas, caules e raízes foi retirada do solo e mantida em água, em frasco âmbar, para diminuir a incidência direta de luz nas raízes. Após o desenvolvimento das raízes, cerca de sete dias, a solução de acetato-[2-¹³C] de sódio (200 µL, 0,1%) foi aplicada sequencialmente nos quatro dias de metabolização, em intervalos de 24 h, no que se denominou de biossíntese de

novo. Ao término do período de incubação, os órgãos vegetais foram separados, pesados, imersos em N₂ e macerados com auxílio de gral e pistilo. As folhas trituradas foram submetidas à secagem em liofilizador e então, iniciou-se o processo de extração com AcOEt a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em banho de ultrassom por 15 min (três extrações com intervalos de quatro dias). Este procedimento está exemplificado através da figura 17, pág. 66. Posteriormente, 5 mg de extrato AcOEt foram submetidos ao processo de EFS (Figura 17, pág. 66) para análise por CLAE-UV empregando a condição 3 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 2 (item 3.6.3, pág. 44). Após esta análise, 500,0 mg do extrato foram submetidos ao processo cromatográfico para isolar o cromano **4** (Figura 18, pág. 67). Paralelamente ao experimento de incorporação *in vivo*, foi conduzido um controle sob as mesmas condições, simulando o ambiente de estresse ao qual a planta foi mantida durante o período de incubação.

Figura 17 - Incorporação do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio em *Peperomia obtusifolia*

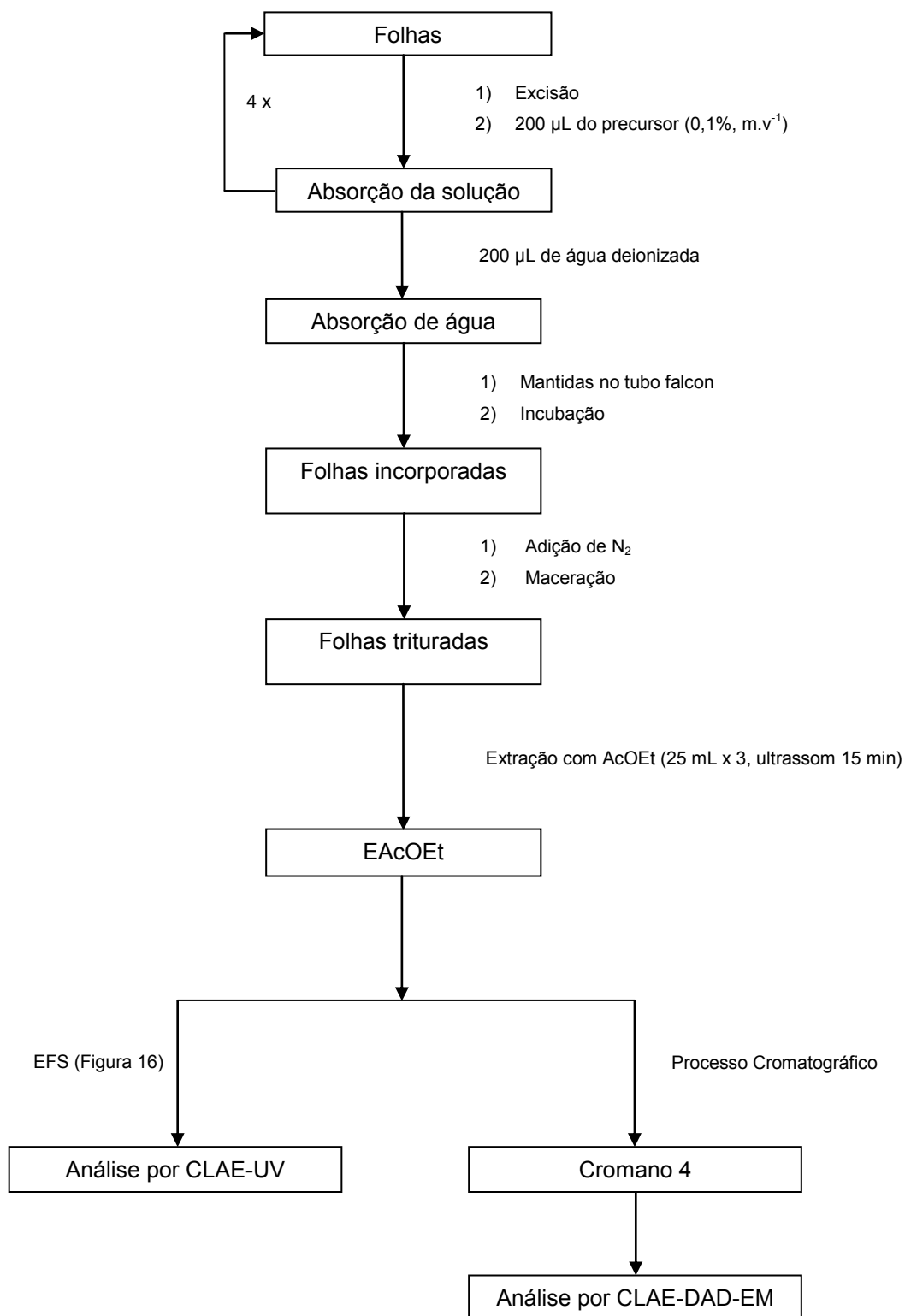
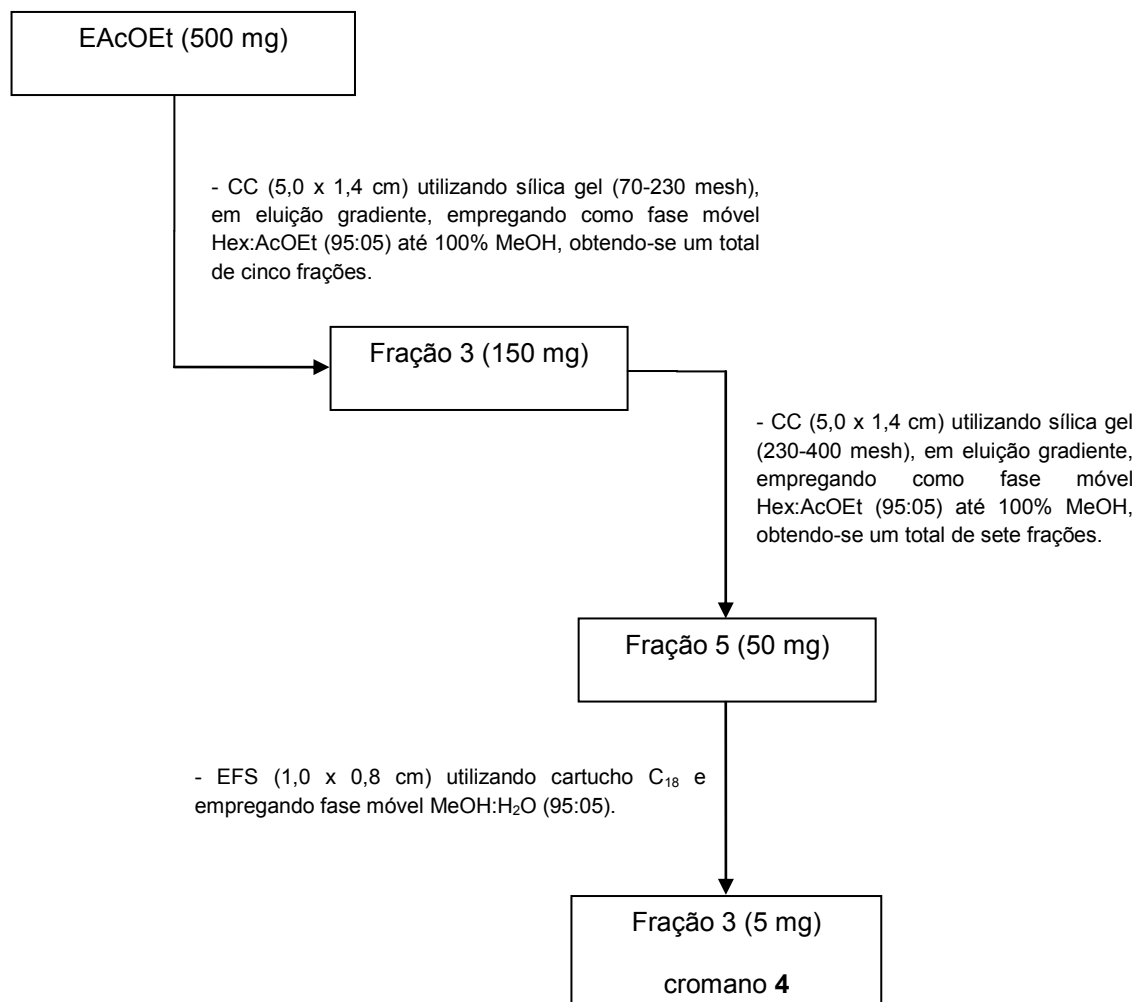


Figura 18 - Processo cromatográfico para purificação do cromano **4** de *Peperomia obtusifolia* após incorporação *in vivo*



4.8 Análise da variabilidade circadiana do cromano 4 em folhas de *Peperomia obtusifolia*

Para realizar o estudo de variabilidade circadiana em *Peperomia obtusifolia*, foi monitorada a produção do cromano em folhas de um espécime jovem mantido na casa de vegetação no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil. Assim, folhas foram coletadas durante 48 h, no intervalo de 3 h, totalizando 16 horários. Durante a coleta as folhas foram imediatamente imersas em N₂ e, posteriormente, mantidas em *freezer* a temperatura de -80° C. Ao término, as amostras foram liofilizadas, moídas em moinho de facas, distribuídas em peneiras granulométricas e mantidas novamente em conservação sob a temperatura de -80° C até o processo de extração.

As análises do padrão (cromano **4** - isolado de folhas de *Peperomia obtusifolia*) e extratos obtidos das folhas de *Peperomia obtusifolia* foram realizadas por CLAE-UV visando verificar a diferença no teor do cromano durante o período de 48 h. Para estas análises foram empregadas a condição 5 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 2 (item 3.6.3, pág. 44).

4.8.1 Construção da curva analítica

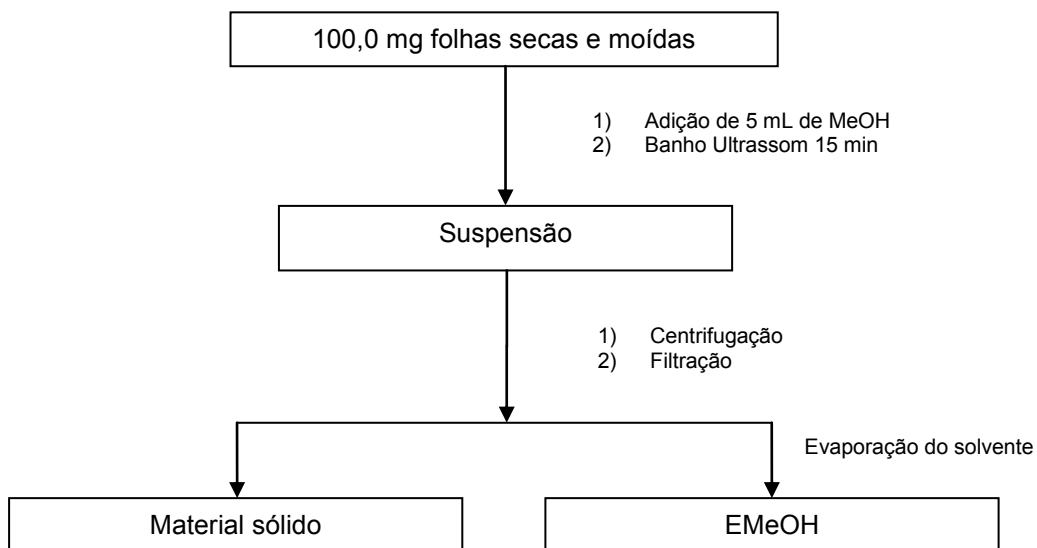
A curva analítica foi construída a partir da solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹ do cromano **4** (padrão isolado das folhas de *Peperomia obtusifolia*). Alíquotas foram retiradas da solução estoque com micropipetas de alta precisão e diluídas em balões volumétricos de 5 mL. Os volumes retirados foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µL para as concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 e 200 µg.mL⁻¹. Para o preparo da solução com concentração de 0,5 µg.mL⁻¹, alíquota de 25 µL foi retirada da solução de 100 µg.mL⁻¹ e diluída em balão volumétrico de 5 mL. Cada uma das soluções de 0,5 a 100 µg.mL⁻¹ foi filtrada em microfiltro de polipropileno (0,22 µm; 25,0 mm) e injetadas em triplicatas no cromatógrafo. As áreas foram obtidas a partir da integração dos picos no cromatograma a 270 nm.

4.8.2 Preparo das amostras

4.8.2.1 Extrato metanólico (EMeOH)

Para preparação dos extratos das folhas de *Peperomia obtusifolia* foram pesadas para as 16 amostras, exatamente 100,0 mg do material vegetal homogeneizado. Posteriormente, foi extraído em MeOH (5 mL), em banho de ultrassom durante 15 min, centrifugado, pipetado 3 mL da solução hidroalcoólica e seco em capela, o qual originou o extrato metanólico (EMeOH, figura 19, pág. 69).

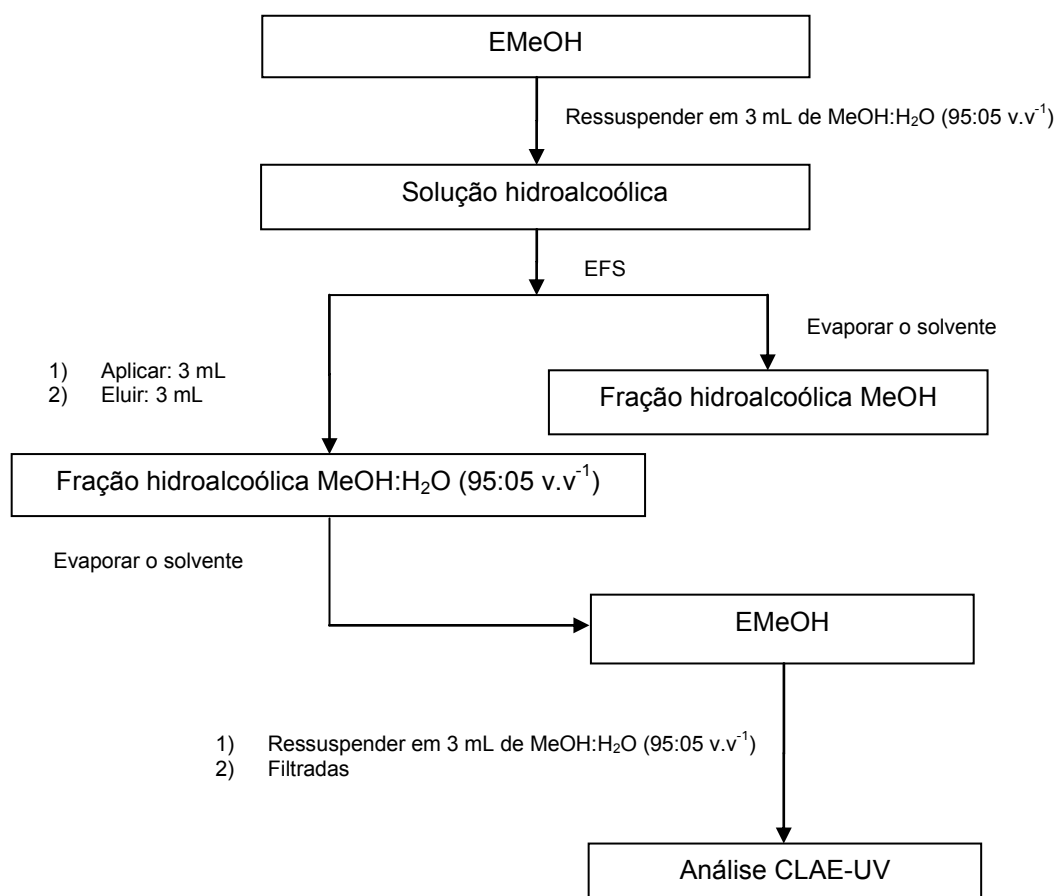
Figura 19 - Fluxograma de preparação dos EMeOH das folhas de *Peperomia obtusifolia*



4.8.2.2 Extração em fase sólida (EFS)

Para a remoção de interferentes foi realizado *clean-up* por meio da técnica de EFS utilizando-se cartuchos de C_{18} , previamente ativados com 5 mL de MeOH e condicionados com 5 mL de MeOH:H₂O (95:05 v.v⁻¹). As frações de cada EMeOH foram resuspendidos em 3,0 mL da solução MeOH:H₂O (95:05, v.v⁻¹) e aplicados no cartucho de C_{18} . Para garantir a eluição completa dos constituintes de interesse foram aplicados uma segunda alíquota de 3 mL de MeOH:H₂O (95:05, v.v⁻¹). Após, as amostras foram secas, resuspendidas em 3 mL da solução MeOH:H₂O (95:05, v.v⁻¹) e filtradas em microfiltro de polipropileno. Alíquotas de 20 µL provenientes de cada amostra foram analisadas em triplicata por meio de CLAE-UV (Figura 20, pág. 70) empregando a condição 5 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 3 (item 3.6.3, pág. 44).

Figura 20 - Fluxograma do processo de EFS do EMeOH



4.8.2.3 Identificação e quantificação

A identificação do cromano **4** no EMeOH foi feita por comparação do tempo de retenção (t_R) e espectro no UV nos 16 períodos avaliados com aqueles obtidos para o cromano 4 (padrão) previamente isolado de folhas de *Peperomia obtusifolia*. Para a quantificação dos analitos empregou-se o método de calibração externa: na qual a quantidade dos analitos em cada amostra foi determinada a partir da integração das áreas dos picos no cromatograma no comprimento de onda de 270 nm. Através da equação de regressão linear obtida para as soluções de referência do cromano **4** determinou-se a concentração relativa do cromano **4** nos extratos.

4.9 Avaliação da presença de cromanos e/ou cromenos em extratos de fungos endofíticos isolados de folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Silvia Noelí López, na Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas da Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

4.9.1 Coleta do material vegetal

A espécie *Peperomia obtusifolia* foi coletada em Rosario, Santa Fe, Argentina (exsicata Specimen Gattuso (901) 2032, UNR).

4.9.2 Isolamento dos fungos endofíticos

O isolamento dos fungos foi realizado pela aluna de doutorado Nathalie Ruiz Mostacero e a estagiária Melisa Barolo sob a supervisão da Prof^a Dr^a Silvia Noelí López.

Foram empregados neste estudo tanto folhas quanto caules de *Peperomia obtusifolia*. Inicialmente, o material vegetal (folhas e caules) foi excisado da planta e submetido ao procedimento de lavagem empregando sabão neutro e água corrente. Após, o material vegetal foi desinfetado superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% v.v⁻¹) durante 5 min, em condições de esterilidade. Posteriormente, foi imerso em etanol 70% durante 1 min. Em seguida, foram realizados três enxagues com água esterilizada. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água do último enxágue foi reservada para posterior controle.

O material vegetal esterilizado foi fragmentado com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis. As folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 0,5 cm e, então, transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura de BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Já para os caules, primeiramente, removeram-se as partes das superfícies, a partir dos quais foram empregados cortes longitudinal e transversal. Os fragmentos obtidos foram também transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura de BDA.

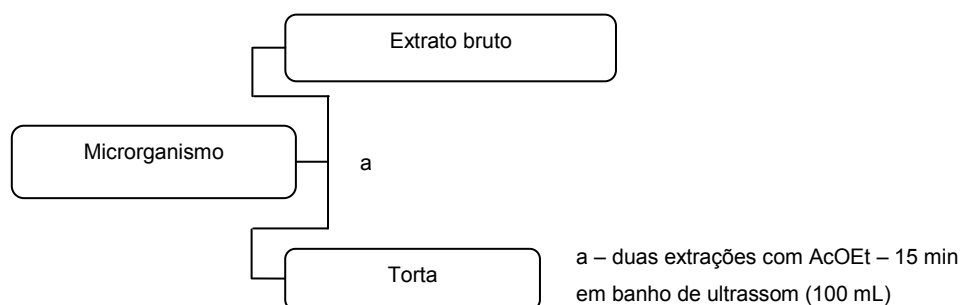
As placas de Petri, contendo os inóculos, foram mantidas em estufa com temperatura entre 28 e 30° C durante 40 dias, os quais foram inspecionados diariamente.

Após isolar, os fungos foram mantidos em placas de Petri contendo meio de BDA a temperatura ambiente, em modo estático. Aos sinais de crescimento fúngico, os mesmos foram submetidos ao processo de extração com AcOEt.

4.9.3 Obtenção dos extratos AcOEt de fungos endofíticos de *Peperomia obtusifolia*

Para o processo de extração os fungos endofíticos foram imersos em N₂ e submetidos ao processo de extração por maceração empregando AcOEt, a temperatura ambiente. Visando a obtenção do extrato bruto, foram realizadas duas extrações consecutivas em banho de ultrassom por 15 min, as quais foram concentradas a pressão reduzida (Figura 21, pág. 73).

Figura 21 - Preparo dos extratos



4.9.4 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de fungos endofíticos de *Peperomia obtusifolia* por CCDC

Os extratos obtidos foram resuspendidos, analisados e comparados por CCDC a 254 e 365 nm, bem como a partir da revelação com nebulização de *para*-anisaldeído. Foram empregadas dois sistemas de fase móvel. O primeiro constou de uma mistura de Hex:AcOEt (7:3) e o segundo MeOH:H₂O:AcOEt (1,3:1:10), denominados de FM1 e FM2, respectivamente.

4.9.5 Análise dos extratos de fungos endofíticos de *Peperomia obtusifolia* por espectrometria de massas

Após secagem, as amostras foram resuspendidas em MeOH, filtradas em microfiltro de poros de 0,22 µm e submetidas a análise por espectrometria de massas. As análises foram feitas empregando as condições descritas no item 3.7.2, pág. 46.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural do cromeno **2** isolado de *Piper aduncum*

A identificação estrutural de **2** (Figura 22, pág. 75) foi realizada pela análise do espectro de RMN ^1H , o qual permitiu identificar 11 sinais no espectro (Figura 23, pág. 76). O padrão de substituição do anel aromático da substância **2** foi determinado a partir dos sinais de RMN ^1H em δ 7,62 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e δ 7,47 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), com constantes de acoplamento características de relação *meta* entre os hidrogênios H-7 e H-5, respectivamente. Os substituintes do anel aromático foram caracterizados como um éster metílico pelo sinal dos hidrogênios do grupo metoxílico em δ 3,80 (3H, *s*) e um grupo isopentenila caracterizado pelos sinais em δ 3,22 (2H, *d*, $J = 7,4$ Hz) referente aos hidrogênios H-1', 5,20 (1H, *m*) referente ao hidrogênio H-2'. Além disso, o sinal em δ 1,67 (6H, *s*) foi atribuído aos hidrogênios metílicos, H-4' e H-5' do grupo isopentenila. Os sinais em δ 5,57 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e δ 6,27 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos, H-3 e H-4, respectivamente. Em δ 1,38, encontram-se os hidrogênios metílicos (6H, *s*) correspondente a H-9 e H-10. A comparação dos dados de RMN ^1H (Tabela 4, pág. 77) com aqueles descritos na literatura (MORANDIM, 2004) possibilitou confirmar a estrutura química proposta, como sendo 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxilato de metila (**2**).

Figura 22: Estrutura química do cromeno **2** isolado de *Piper aduncum*

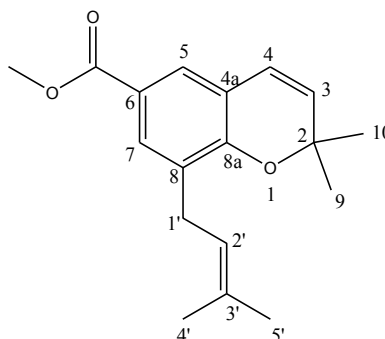


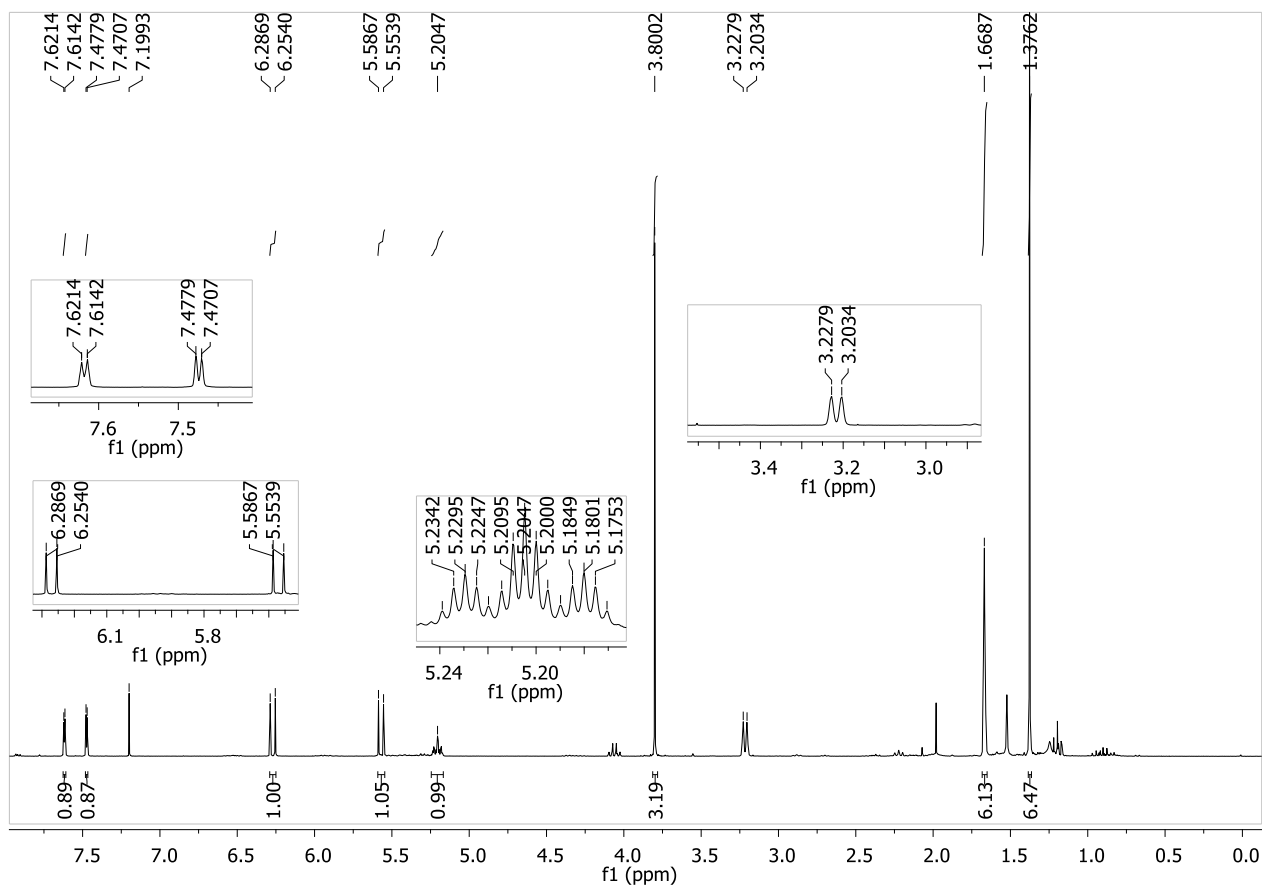
Figura 23: Espectro de RMN ^1H do cromeno **2** (300 MHz, CDCl_3)

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H do cromeno **2** (11,7 T, CDCl_3)

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, (m^{b} , J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, (m^{b} , J^{c}) (Morandim, 2004)
2	-	-
3	5,57, (<i>d</i> , 9,9)	5,57, (<i>d</i> , 9,5)
4	6,27, (<i>d</i> , 9,9)	6,27, (<i>d</i> , 9,5)
4a	-	-
5	7,47, (<i>d</i> , 2,2)	7,47, (<i>d</i> , 2,5)
6	-	-
7	7,62, (<i>d</i> , 2,2)	7,62, (<i>d</i> , 2,5)
8	-	-
8a	-	-
9	1,38, (<i>s</i>)	1,39, (<i>s</i>)
10	1,38, (<i>s</i>)	1,39, (<i>s</i>)
1'	3,22, (<i>d</i> , 7,4)	3,22, (<i>d</i> , 7,5)
2'	5,20, (<i>m</i>)	5,19 (<i>m</i>)
3'	-	-
4'	1,67, (<i>s</i>)	1,67 (<i>s</i>)
5'	1,67, (<i>s</i>)	1,67, (<i>s</i>)
OCH₃	3,80, (<i>s</i>)	3,80, (<i>s</i>)

^a deslocamentos químicos (δ) em ppm; ^b m = multiplicidade; ^c constantes de acoplamento (*J*) expressas em Hz

5.2 Identificação estrutural do cromano 4 isolado de *Peperomia obtusifolia*

A substância **4** (Figura 24, pág. 79) foi obtida como um sólido amorfo branco e foi submetida a análise por espectrometria de massas (EM) em alta resolução utilizando ionização por electrospray, e operando em modo negativo. A estrutura foi proposta a partir da análise do EM em alta resolução, onde foi observado um pico correspondente a molécula desprotonada em m/z 369,2069 $[M-H]^-$, calculado para $C_{23}H_{29}O_4$, com erro de 0,5 ppm (Figura 25, pág. 79 e Figura 27a, pág. 80). Portanto, foi possível estabelecer a fórmula molecular $C_{23}H_{30}O_4$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove. A molécula desprotonada (m/z 369,2069) foi submetida à análise por IES-EM/EM, com variação de energia de 5 a 40 eV. Com o aumento de energia sobre a molécula desprotonada (m/z 369) a intensidade deste íon diminuiu, enquanto o fragmento em m/z 247 aumentou (Figura 26, pág. 79). Além disso, observa-se a formação de íons com m/z 351 e 325. Com base nestes dados, foi proposta a fragmentação do cromano **4** (Figura 27b, pág. 80), que segue um mecanismo de fragmentação do tipo retro Diels-Alder no anel pirano fundido ao sistema aromático, resultando em um fragmento $[M-H-122]^-$, m/z 247. A formação do íon m/z 351 corresponde à perda neutra de H_2O , resultando em um fragmento $[M-H-18]^-$, e o íon m/z 325 corresponde à perda neutra de CO_2 , resultando em um fragmento $[M-H-44]^-$.

A análise do espectro de RMN 1H do cromano **4** (Figura 28, pág. 81), permitiu inferir a presença de um anel aromático totalmente substituído, e identificar os principais sinais: com a presença de uma metila em δ 2,46 (3H, s, H-10), caracterizando o padrão de substituição no anel aromático de substâncias derivadas do ácido orselínico, que encontra-se em posição meta a hidroxila. Um grupo isopentenílico foi caracterizado pelos sinais em δ_{Ha} 3,40 (1H, *dd*, $J = 6,6$ e $15,1$ Hz), δ_{Hb} 3,26 (1H, *dd*, $J = 6,6$ e $15,1$ Hz) referentes à H-1'' e δ 5,02 (1H, *m*) referente à H-2''. Além dos sinais em δ 1,72 (3H, s) e δ 1,61 (3H, s) atribuídos aos grupos metílicos H-4'' e H-5'', respectivamente. Foram ainda identificados sinais relacionados a um grupo metílico em δ 1,39 (3H, s) atribuído a H-6' e uma unidade isopentadienilica caracterizada pelos sinais em δ 5,48 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz), δ 6,23 (1H, *dd*, $J = 10,8$ e $15,3$ Hz) e δ 5,70 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz) referentes à H-1', H-2', H-3', respectivamente. Os grupos metílicos dessa unidade foram atribuídos com base nos sinais em δ 1,68 (3H, s) e δ 1,60 (3H, s), atribuídos a H-5' e H-7',

respectivamente. Além dos sinais em δ 2,65 e 2,44 atribuídos Ha e Hb, ligados ao C-4 e os sinais em δ 1,88 e 1,72 que foram atribuídos aos hidrogênios Ha e Hb ligados ao C-3. Os dados de RMN ^1H estão de acordo com aqueles descritos na literatura e são apresentados na tabela 5, pág. 82. Portanto, foi possível identificar **4** como sendo 3,4-diidro-5-hidróxi-2,7-dimetil-8-(-3-metil-2-butenil)-2-(4-metil-1,3-pentadienil)-2H-1-benzopirano carboxílico (BURKE et al., 2003).

Figura 24 - Estrutura química do cromano **4** isolado de *Peperomia obtusifolia*

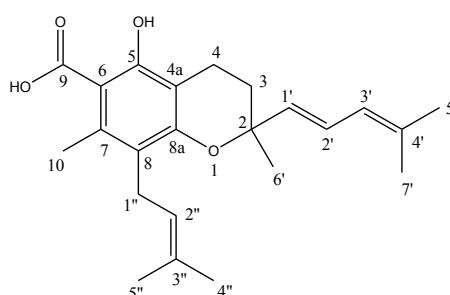


Figura 25 - IES-EM em alta resolução do cromano **4**, operando em modo negativo

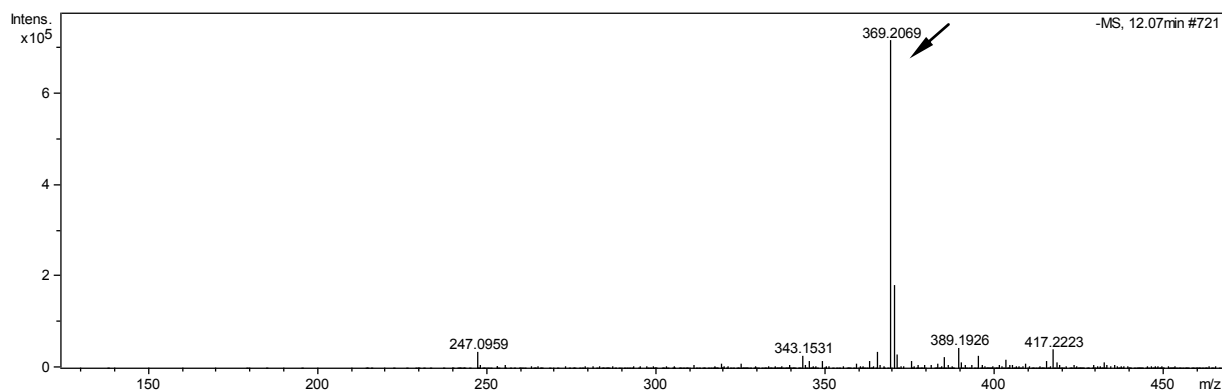


Figura 26 - IES-EM/EM do pico m/z 369, operando em modo negativo (40 eV)

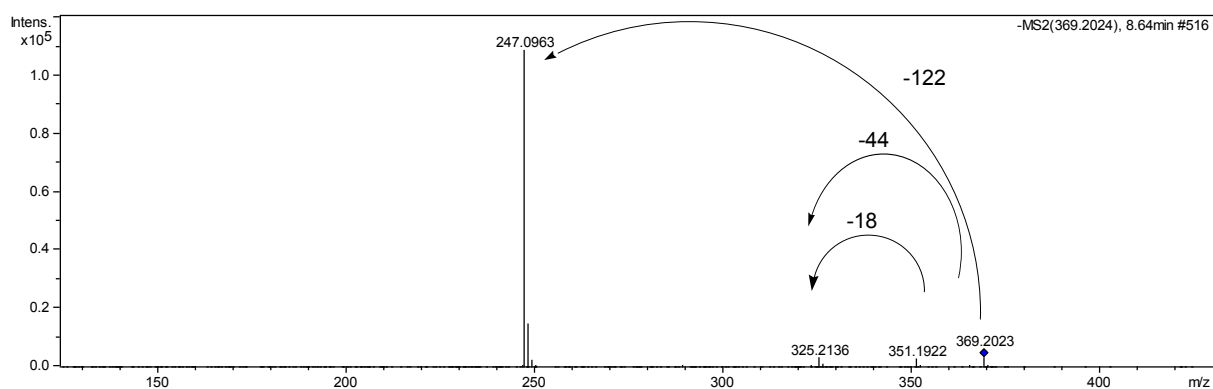


Figura 27 - Proposta de fragmentação do cromano **4** de *Peperomia obtusifolia*: **a** – formação da molécula desprotonada m/z 369; **b** – proposta de fragmentação da molécula desprotonada m/z 369: formação do íons m/z 351, 325 e 247

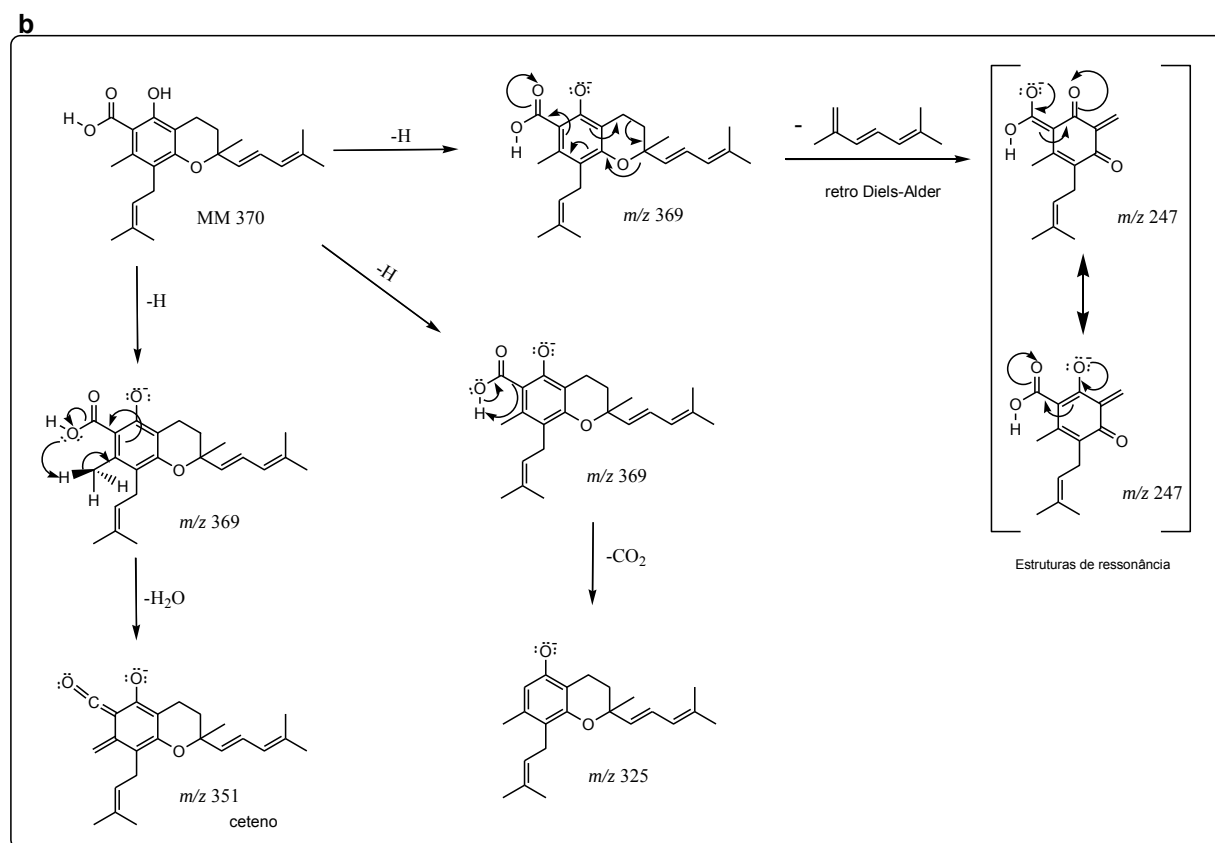
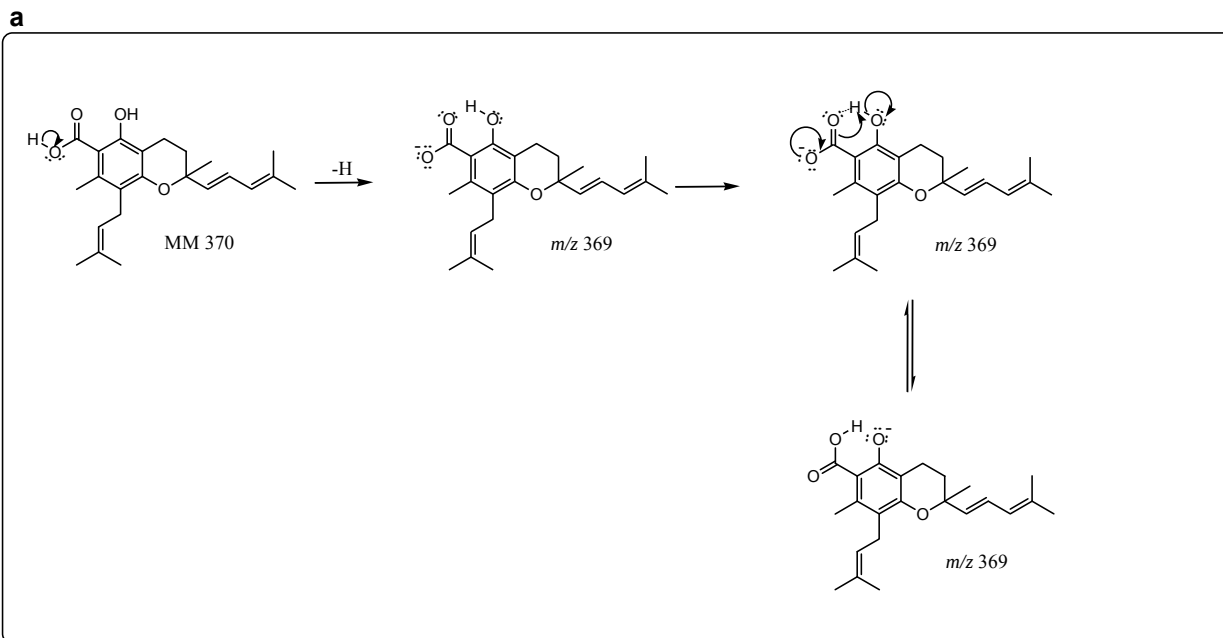


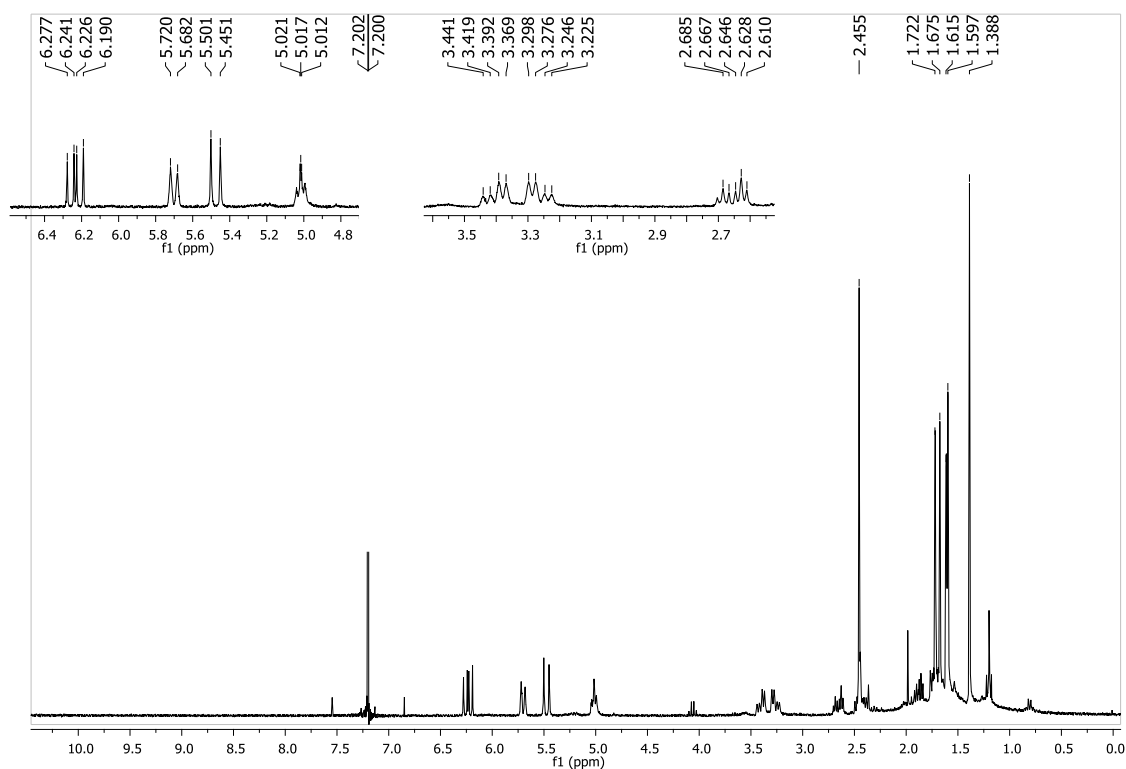
Figura 28 - Espectro de RMN ^1H do cromano **4** (300 MHz, CDCl_3)

Tabela 5 - Dados de RMN ^1H do cromano **4** (11,7 T, CDCl_3)

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, (m^{b} , J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, (m^{b} , J^{c}) (BURKE et al., 2003)
2	-	-
3	a 1,88, (<i>m</i>) b 1,72, (<i>m</i>)	a 1,94, (<i>m</i>) b 1,78, (<i>m</i>)
4	a 2,65, (<i>m</i>) b 2,44, (<i>m</i>)	a 2,72, (<i>m</i>) b 2,50, (<i>m</i>)
4a	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
8a	-	-
9	-	-
10	2,46, (<i>s</i>)	2,53, (<i>s</i>)
1'	5,48, (<i>d</i> , 15,3)	5,53, (<i>d</i> , 15,3)
2'	6,23, (<i>dd</i> , 15,3, 10,8)	6,29, (<i>dd</i> , 15,3, 10,9)
3'	5,70, (<i>d</i> , 10,8)	5,76, (<i>d</i> , 10,9)
4'	-	-
5'	1,68, (<i>s</i>)	1,73, (<i>s</i>)
6'	1,39, (<i>s</i>)	1,45, (<i>s</i>)
7'	1,60, (<i>s</i>)	1,66, (<i>s</i>)
1''	a 3,40, (<i>dd</i> , 15,1, 6,6) b 3,26, (<i>dd</i> , 15,1, 6,6)	3,47, (<i>dd</i> , 15,1, 7,1) 3,33, (<i>dd</i> , 15,1, 6,6)
2''	5,02, (<i>m</i>)	5,08, (<i>m</i>)
3''	-	-
4''	1,72, (<i>s</i>)	1,78, (<i>s</i>)
5''	1,62, (<i>s</i>)	1,68, (<i>s</i>)

^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm; ^b m = multiplicidade; ^c constantes de acoplamento (*J*) expressas em Hz

5.3 Extração enzimática das folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*

De acordo com a biogênese proposta para a formação de cromenos (Figura 4, pág. 37) e cromanos (Figuras 5 e 6, págs. 40 e 41), as prenilttransferases estão envolvidas nas reações de C-alquilação no anel aromático utilizando as unidades isoprênicas (IPP, DMAPP) como substratos. Após a etapa de prenilação na unidade aromática, as enzimas responsáveis pela ciclização (ciclases) atuam na via biossintética para a formação do anel oxibenzílico, dando origem aos cromenos e cromanos. Com base nessa proposta biossintética, foram realizados experimentos para determinar a atividade das enzimas chave, prenilttransferases e ciclases, nas folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*, visto que os cromenos e cromanos mostram acúmulo neste órgão vegetal. As prenilttransferases geralmente são enzimas localizadas nas membranas, microssomais e são insolúveis. No entanto, como já relatado no estudo de prenilação do cromeno **1** de *Piper aduncum* para produção do cromeno **2** (prenilado) (Figura 30, pág. 88), a prenilttransferase foi determinada na fração solúvel das folhas de *P. aduncum*. Esse estudo demonstrou que a prenilttransferase envolvida na etapa de prenilação tem seu máximo de atividade quando extraída com tampão fosfato de potássio, pH 8,0. Para melhor preservação da atividade enzimática, os experimentos foram realizados a baixa temperatura (4° C).

Com intuito de inibir os processos de oxidação aos quais as amostras estão suscetíveis foi adicionado DTT. É importante salientar que o DTT foi selecionado pois apresenta menor toxicidade em relação ao mercaptoetanol, outro agente oxidante comumente utilizado. Além disso, são necessários apenas 5% da concentração de mercaptoetanol para se obter o mesmo efeito empregando DTT. A complexação dos compostos fenólicos foi suprimida pela presença de PVPP e de DTT na solução tampão extratora, uma vez que um agente oxidante forte contribui para inibir a ação das fenóis oxidases. A complexação dos metais foi realizada empregando EDTA, agente complexante universal para íons.

Inicialmente, foi determinada a concentração de proteína total dos extratos brutos das espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* pelo método de Bradford com poucas modificações. Optou-se por trabalhar com esse método, no qual o reagente é preparado com ácido clorídrico, ao contrário do método tradicional que é utilizado ácido fosfórico. Neste método a impregnação do corante nas cubetas

é menor do que no método tradicional, o que aumenta o tempo de vida útil das mesmas. A curva padrão foi obtida utilizando uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg.mL^{-1} . Os cálculos feitos para a quantificação das proteínas nas amostras estão na tabela 6, pág. 84 e demonstraram que a espécie *Peperomia obtusifolia* apresenta uma menor concentração proteica quando comparada a *Piper aduncum*.

Tabela 6 - Cálculo das concentrações de proteína estimada pelo método de Bradford; **Equação:**

$$[\text{proteína}] = (\text{Abs}_{595} - 0,011)/0,878$$

Espécie	Massa (g)	Abs ₁	Abs ₂	Média	[proteína] (µg)	Conc (mg.mL ⁻¹)*
<i>Piper aduncum</i>	10	0,269	0,279	0,274	0,299	1,50
<i>Peperomia obtusifolia</i>	10	0,088	0,099	0,093	0,093	0,47

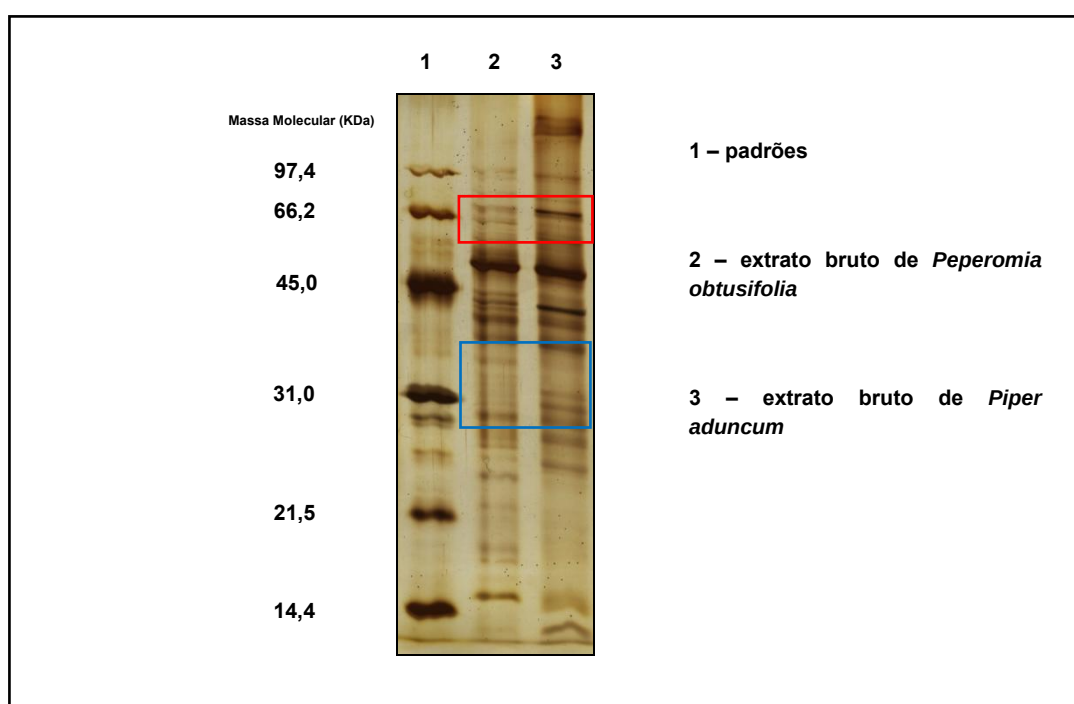
*cálculo: conc. = ([proteína] x 50 / volume da amostra adicionada)

5.4 Análise dos extratos enzimáticos obtidos de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* por eletroforese monodimensional

Com o intuito de avaliar os perfis proteicos das espécies estudadas, foi realizada análise utilizando eletroforese monodimensional, SDS-PAGE, para os respectivos extratos enzimáticos obtidos das folhas de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*. O gel foi revelado com nitrato de prata e apresentou resolução adequada (Figura 29, pág. 86). A análise do gel, aliado a comparação com uma mistura de padrões de proteínas com diferentes massas moleculares demonstrou que na região entre 45,0 e 66,2 KDa característica das prenilttransferases observa-se a presença de bandas. A análise ainda permite destacar que a região característica das prenilttransferases se encontra mais concentrada nos extratos enzimáticos de *P. aduncum* (Figura 29, pág. 86). Esses resultados corroboram com aqueles anteriormente demonstrados pela dosagem proteica no qual a concentração determinada para os extratos de *P. aduncum* é superior ao encontrado para *P. obtusifolia*. Como descrito anteriormente, a etapa de prenilação envolvida na biossíntese do cromoeno **2** em *P. aduncum*, assim como sua dinâmica metabólica já foi descrita (MORANDIM, 2004; MORANDIM et al., 2005). Porém as etapas de prenilação para a formação dos cromanos em *P. obtusifolia* ainda estão sendo estudados e continuam um problema biossintético importante, uma vez que os cromanos que mostram acúmulo nessa espécie vegetal descrevem uma rota biossintética única e envolvem precursores aparentemente distintos daqueles envolvidos na biossíntese dos cromenos de *P. aduncum* (Figura 6, pág. 41). É importante destacar que os cromanos de *P. obtusifolia* são geranilados e, em estudos anteriores geranilttransferases mostraram massa molecular em torno de 33,2 KDa (LOPES, 2008). A análise do gel de eletroforese (Figura 29, pág. 86) dos extratos enzimáticos de *P. obtusifolia* não mostrou bandas relativas a essa classe de enzima. Com isso, os resultados das dosagens proteicas, aliado a análise dos géis de eletroforese monodimensional realizado para as duas espécies apontam para uma dicotomia quanto à presença e ausência das prenilttransferases nas frações enzimáticas de *P. aduncum* e *P. obtusifolia*, respectivamente, indicando que as prenilttransferases de *P. obtusifolia* podem ser oriundas de uma fonte heteróloga. Como já determinado para *P. aduncum*, a dinâmica metabólica é um fator preponderante para as etapas de prenilação dos cromenos presentes nesta espécie

e neste sentido (Figura 30, pág. 88) (MORANDIM et al., 2005), experimentos foram realizados para a determinação do mesmo parâmetro em *Peperomia obtusifolia*. Para tanto, os extratos enzimáticos das folhas da espécie foram obtidos e a dinâmica metabólica das prenilttransferases envolvidas na biossíntese dos cromanos da espécie foi determinada como descrito no próximo item.

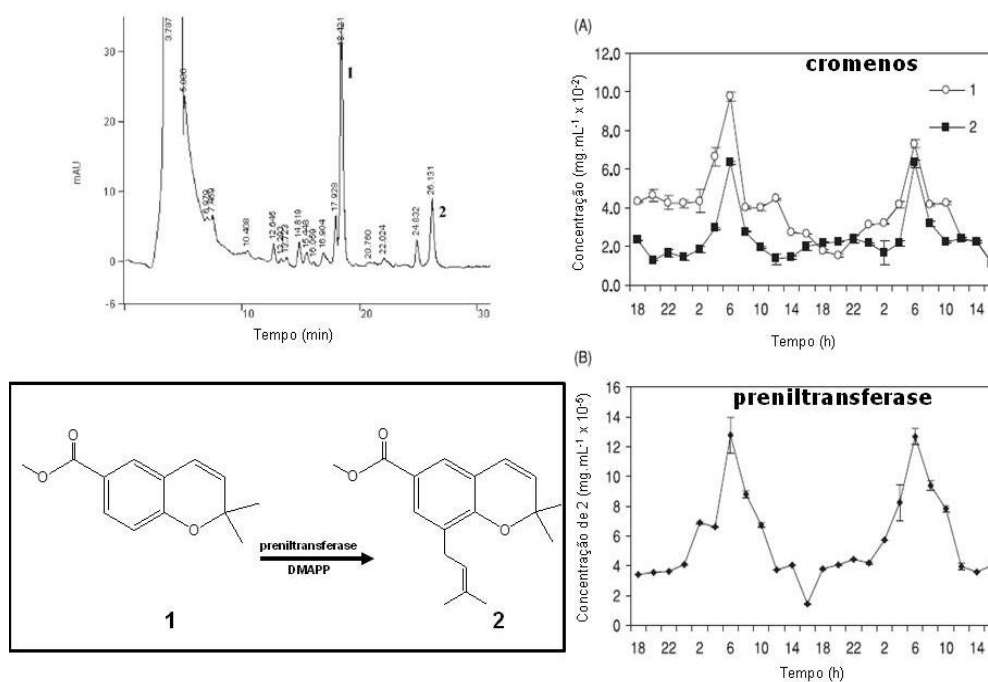
Figura 29 - Gel de poliacrilamida obtido das frações provenientes do extrato bruto de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*, revelado com nitrato de prata



5.5 Determinação da dinâmica metabólica das etapas de prenilação dos cromenos isolados de *Piper aduncum* (MORANDIM, 2004; MORANDIM et al., 2005)

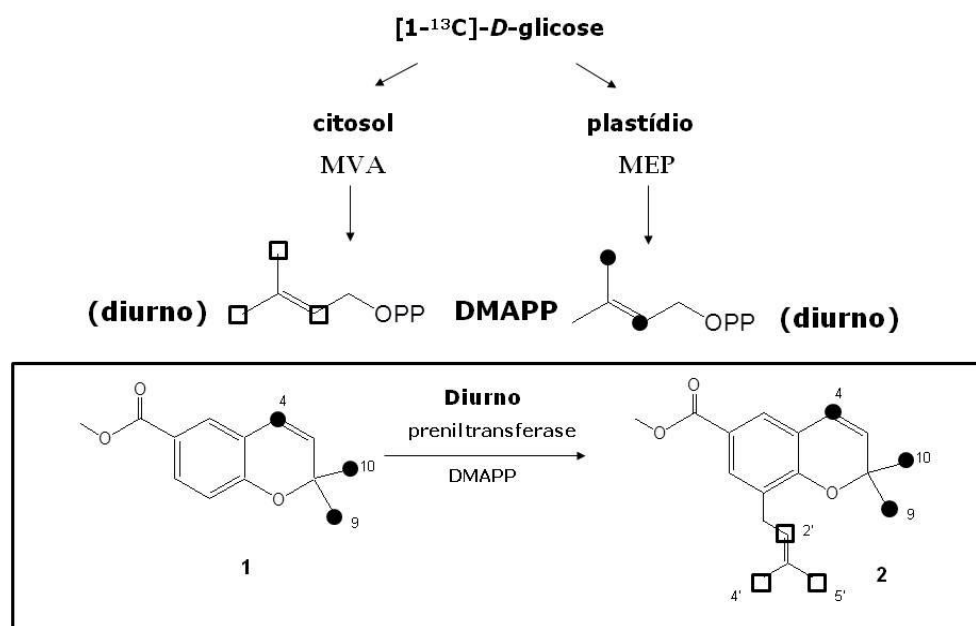
Para tentar compreender a biossíntese dos cromenos em folhas de *Piper aduncum*, estudos biossintéticos foram conduzidos de acordo com a biogênese proposta (Figura 4, pág. 37). Os resultados obtidos demonstraram que a etapa de prenilação do ácido 4-hidroxibenzóico descreve um ritmo circadiano diurno. Estudos posteriores demonstraram também a origem biossintética das unidades isoprênicas envolvidas na biossíntese dos cromenos de *P. aduncum*. Os estudos de incorporação de glicose-[1-¹³C] em folhas de *P. aduncum* descritos por LEITE et al., 2007, demonstraram que as unidades isoprênicas IPP/DMAAPP envolvidas na biossíntese dos cromenos **1** e **2** (Figura 31, pág. 88), demonstraram que a prenilação inicial no anel aromático do ácido *para*-hidroxibenzóico é originária da via do MEP e que a prenilação posterior, que dará origem ao cromeno **2** é resultante da via do MVA. Como o cromeno **1** apresenta seu máximo de produção às 6:00 h propõe-se também que as ciclasas também descrevem ritmo metabólico diurno (Figura 30, pág. 88). Com base nestes resultados, experimentos foram planejados para a determinação da via metabólica das unidades isoprênicas (IPP e/ou DMAAPP) envolvidas nas etapas de prenilação dos cromenos de *Peperomia obtusifolia* com o intuito de avaliar se as preniltransferases também descreveriam dinâmica metabólica similar àquelas encontradas em *P. aduncum*.

Figura 30 – Ritmo circadiano do cromeno prenilado de *Piper aduncum*



Fonte: MORANDIM et al., 2005

Figura 31 – Biossíntese das unidades isoprênicas (IPP/DMAPP) em *Piper aduncum*

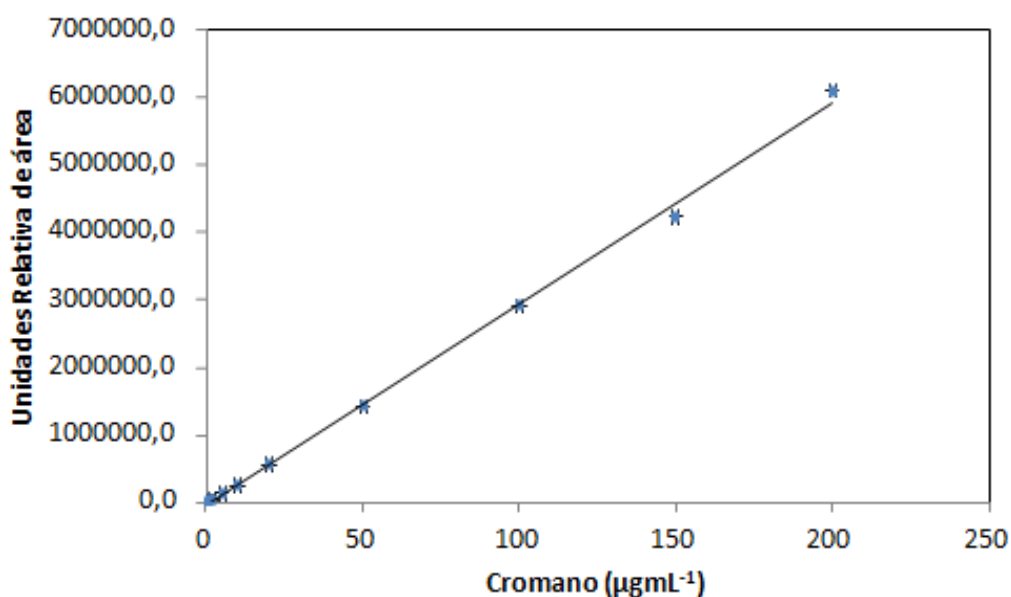


Fonte: LEITE et al., 2007

5.6 Determinação da dinâmica metabólica das etapas de prenilação do cromano **4** em *Peperomia obtusifolia*

Estudos visando à determinação do mesmo ritmo circadiano das preniltransferases em *Peperomia obtusifolia* foram planejados, uma vez a determinação do ritmo circadiano de formação de um determinado metabólito é essencial para avaliação de sua biossíntese como demonstrado na biossíntese dos cromenos de *Piper aduncum* (MORANDIM et al., 2005). É importante destacar que ritmos metabólicos indicam muitas vezes que a produção de um determinado metabólito pode estar relacionada a uma rede de sinalização que otimiza a resposta da planta ao meio ambiente. A incidência ou não de um ritmo metabólico na biossíntese de um determinado produto natural pode configurar em uma importante informação sobre o metaboloma e o proteoma da espécie vegetal em estudo.

Assim, a análise da presença e/ou ausência do cromano **4** e seu possível ritmo circadiano (Figura 3 pág. 35) foram descritos pela análise e quantificação relativa realizados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Inicialmente, foi construída uma curva analítica do cromano **4** isolado da espécie de *P. obtusifolia* por meio de CLAE-UV no comprimento de onda de 270 nm. A curva apresentou coeficiente de correlação (R^2) de 0,998 para o cromano **4** (Figura 32 e tabela 7, pág. 90). Esses valores indicam boa relação linear da área do pico com a concentração, cujo valor mínimo recomendado pela ANVISA para análises de princípios ativos em matéria-prima vegetal é de 0,99 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A partir dos parâmetros extraídos da curva analítica foi possível determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema por CLAE-UV, bem como a determinação da equação de regressão linear envolvida na quantificação do cromano **4** (Tabela 7, pág. 90).

Figura 32 – Curva analítica do cromano **4****Tabela 7** – Parâmetros da curva analítica do cromano **4**

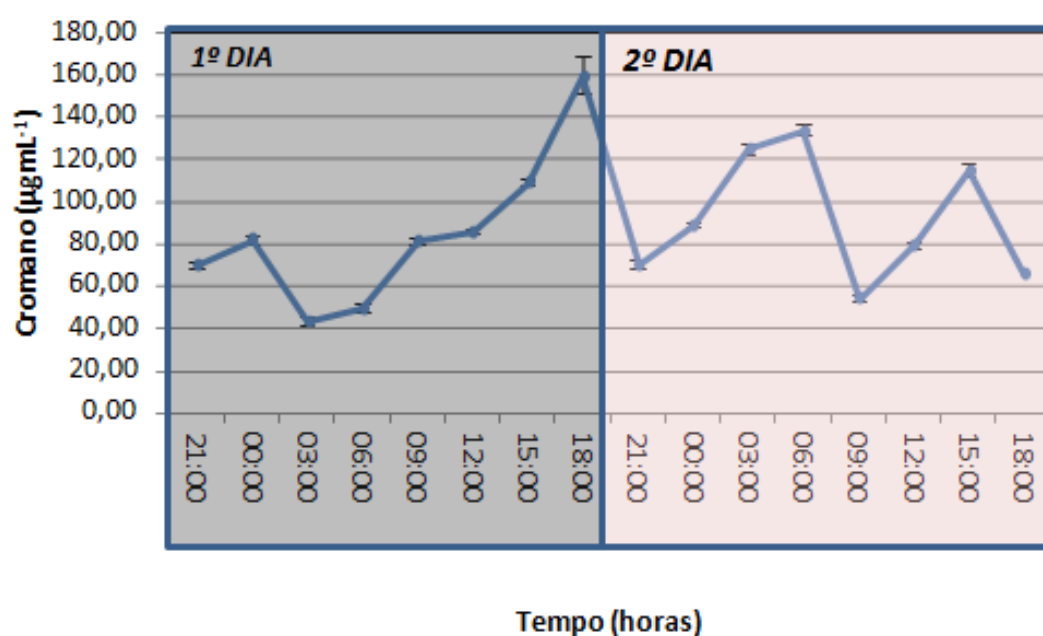
Desvio padrão	98684,2
Limite de detecção	0,5
Limite de quantificação	33,1
R ²	0,99812
Y = 29782,9 (±457,5) X + (-31765,1) (±39758,7)	

Após, estabelecidos os parâmetros envolvidos na detecção e quantificação do cromano por CLAE-UV, foi determinado o teor do cromano **4** nos extratos de folhas de *Peperomia obtusifolia* durante 48 h, em intervalos de 3 h.

A análise dos resultados, apesar da ocorrência de uma oscilação em alguns horários durante as 48 h avaliadas, permitiu observar que a biossíntese do cromano **4** nas folhas de *P. obtusifolia* (Figura 33, pág. 91) não descreve uma dinâmica circadiana, mas há um maior teor de **4** no período compreendido entre 15h:00min e 18h:00min, ou seja, no final da tarde. É importante destacar que este período contrasta com o período observado para a formação dos cromenos **1** e **2** nas folhas de *Piper aduncum*, os quais apresentaram um maior teor no período entre

01h:00min e 06h:00min da manhã (Figura 30, pág. 88) que coincide com o período de maior expressão da enzima prenilttransferase envolvida na prenilação dos cromanos **1** e **2** (Figura 30, pág. 88). De toda forma, a dinâmica metabólica do cromano **4** em *P. obtusifolia* não demonstrou um ritmo circadiano uniforme do tipo sigmoidal, mas sim bastante aleatório. Estes dados experimentais mostram diferenças metabólicas importantes na biossíntese dos cromanos que são acumulados em *P. obtusifolia*, quando comparado aos cromenos de *P. aduncum*.

Figura 33 – Produção do cromano **4** durante 48 h em folhas de *Peperomia obtusifolia*



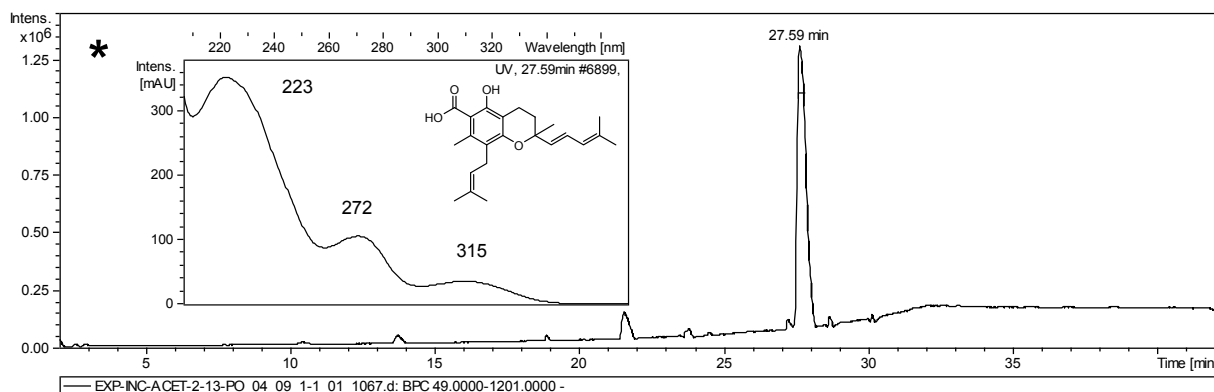
5.7 Determinação da origem biossintética dos cromanos de *Peperomia obtusifolia*: experimentos de incorporação *in vivo* do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio

Com base nos resultados da análise circadiana do cromano **4** nas folhas de *Peperomia obtusifolia* que indicam a possibilidade de ritmo aleatório e, consequentemente, biossíntese distinta dos cromenos em *Piper*, foram planejados experimentos de incorporação do primeiro precursor da via do acetato marcado com isótopo estável, o acetato-[2-¹³C] de sódio, supostamente envolvido na biossíntese dos cromanos de *P. obtusifolia*. As frações obtidas após incorporação do precursor (item 4.7, pág. 62) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em alta resolução (CLAE-DAD-EM) e os tempos de retenção observados foram comparados com aquele observado para o cromano **4**. O tempo de retenção de **4** (t_R) foi de 27,59 min na condição de análise empregada (Figura 34, pág. 93). As principais bandas de absorção no espectro na região do UV são 223, 272 e 315 nm (Figura 34, pág. 93). O espectro de massas em alta resolução do cromano **4** (padrão), modo negativo, forneceu o pico com m/z 369,2070 com erro de 0,5 ppm, correspondente ao pico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ para $C_{23}H_{29}O_4$ (Figura 35, pág. 93). A análise do espectro de massas ampliado de **4** (Figura 35, pág. 80) mostra picos $[M-H]^-$ (m/z 369,2070), $[M+1-H]^-$ (m/z 370,2095), $[M+2-H]^-$ (m/z 371,2123) e $[M+3-H]^-$ (m/z 372,2153), com abundância isotópica de 100,00, 24,80, 3,90 e 0,51%, respectivamente (Tabela 8, pág. 102).

Posteriormente, foi realizada a análise dos extratos obtidos após incorporação e metabolização do precursor nos tempos 8, 12, 16, 24, 48 e 72 h (item 4.7, pág. 62, todos em duplicatas) utilizando CLAE-DAD-EM em alta resolução. O perfil cromatográfico do extrato de folhas de *P. obtusifolia* após o experimento de incorporação de acetato-[2-¹³C] de sódio no período de oito horas está ilustrado na figura 36, pág. 94. Apesar da complexidade do perfil cromatográfico da amostra, é possível reconhecer o pico referente ao cromano **4**, nos dois experimentos, com t_R = 27,64 (Figura 36 a, pág. 94) e 27,57 min (Figura 36 b, pág. 94). Além disso, observa-se a similaridade nas bandas de absorção entre os espectros na região do UV de **4** (padrão, Figura 34, pág. 93) com aquele referente ao cromano **4** presente no extrato (t_R = 27,64 min, Figura 37, pág. 94), bem como os respectivos espectros de massas

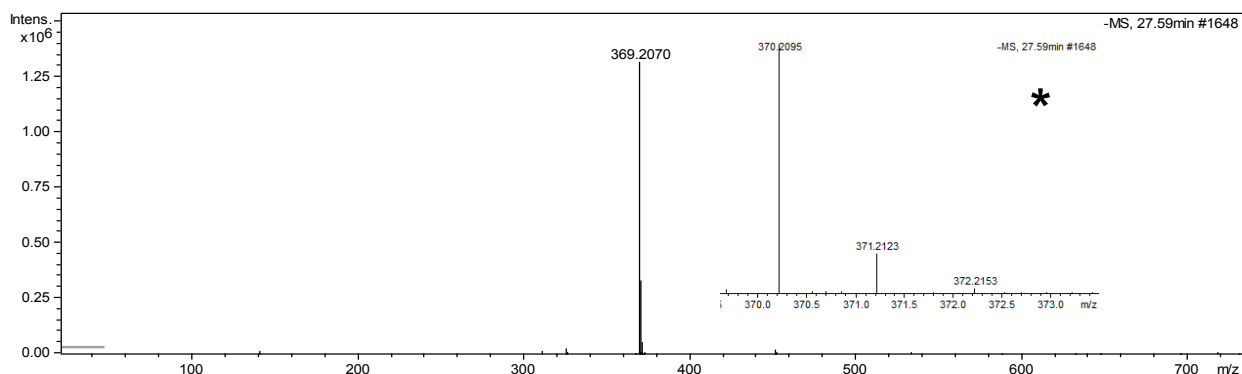
em alta resolução para $[M-H]^-$ de m/z 369,2090 ($t_R = 27,64$) e 369,2078 ($t_R = 27,57$), respectivamente, o que permite estabelecer com clareza a identidade da substância (Figura 38, pág. 95).

Figura 34 - TIC do cromano 4



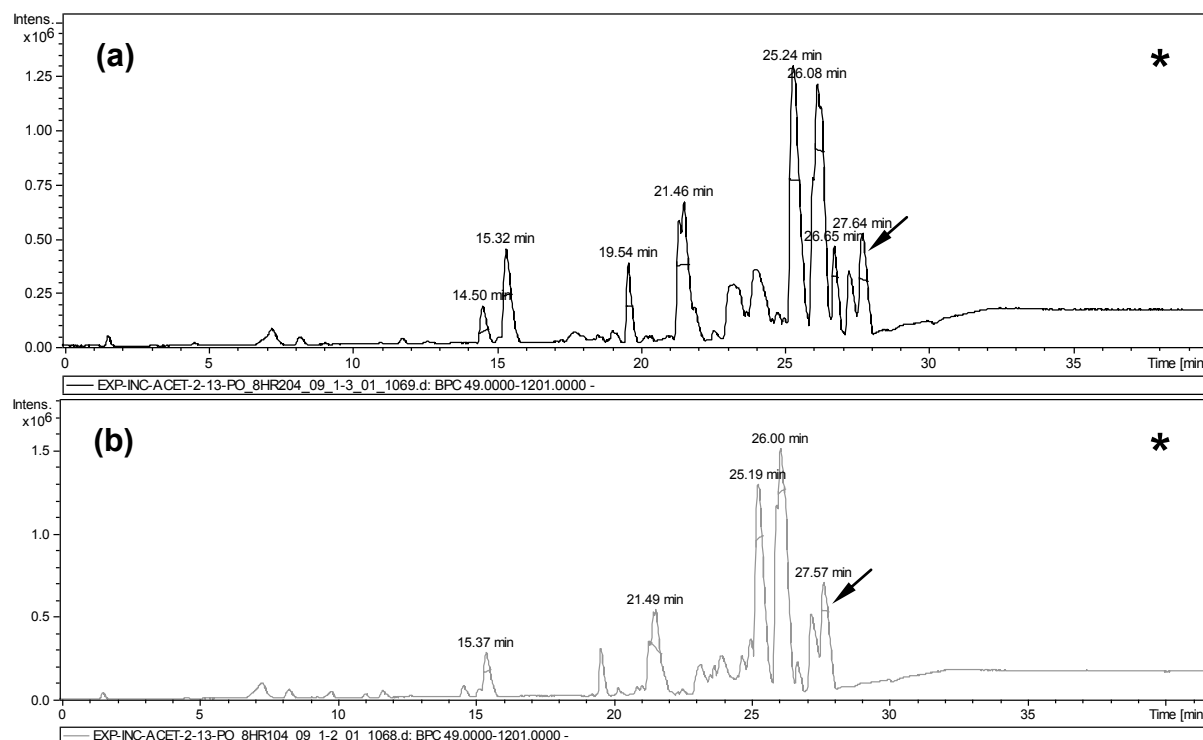
* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44); Espectro na região do UV do cromano 4

Figura 35 - IES-EM em alta resolução do cromano 4 ($t_R = 27,59$ min), operando em modo negativo



*Ampliação do espectro de massas $t_R = 27,59$ min

Figura 36 - TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 8 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 37 - Espectro na região do UV do pico com $t_R = 27,64$ min (a). Extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 8 h

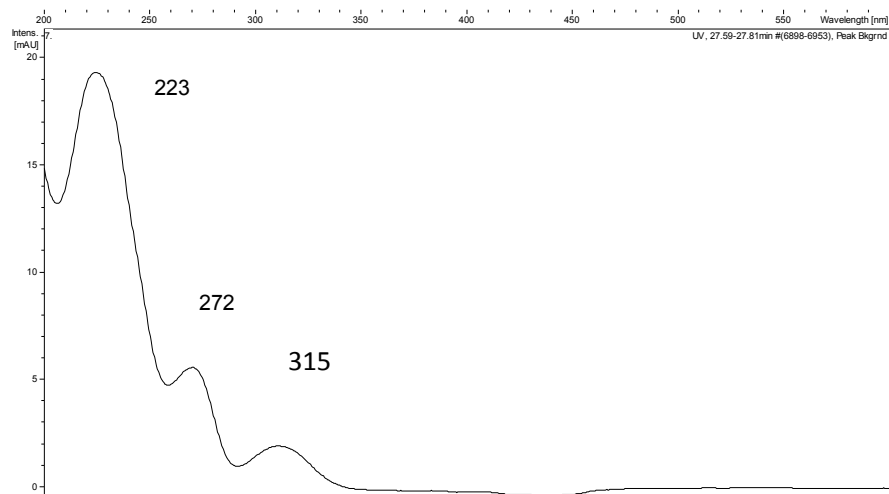
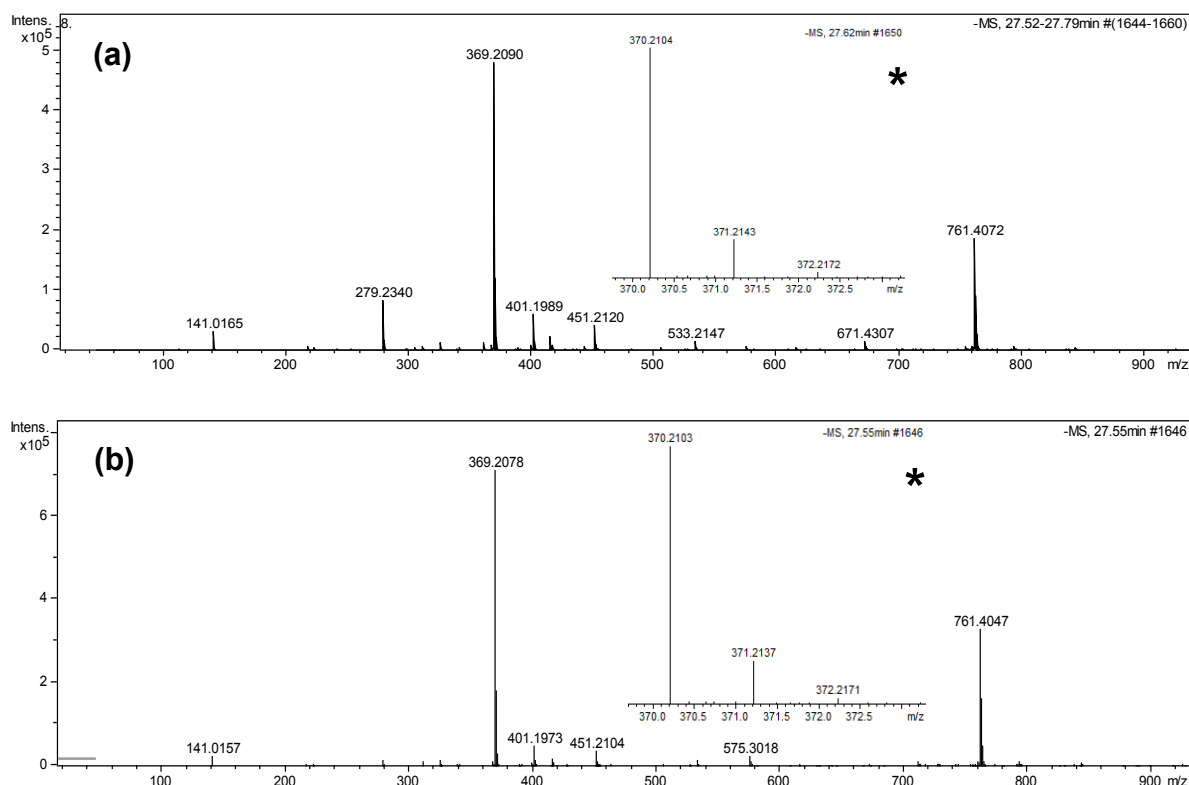


Figura 38 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 8 h; **(a)** experimento 1 e **(b)** experimento 2, operando em modo negativo

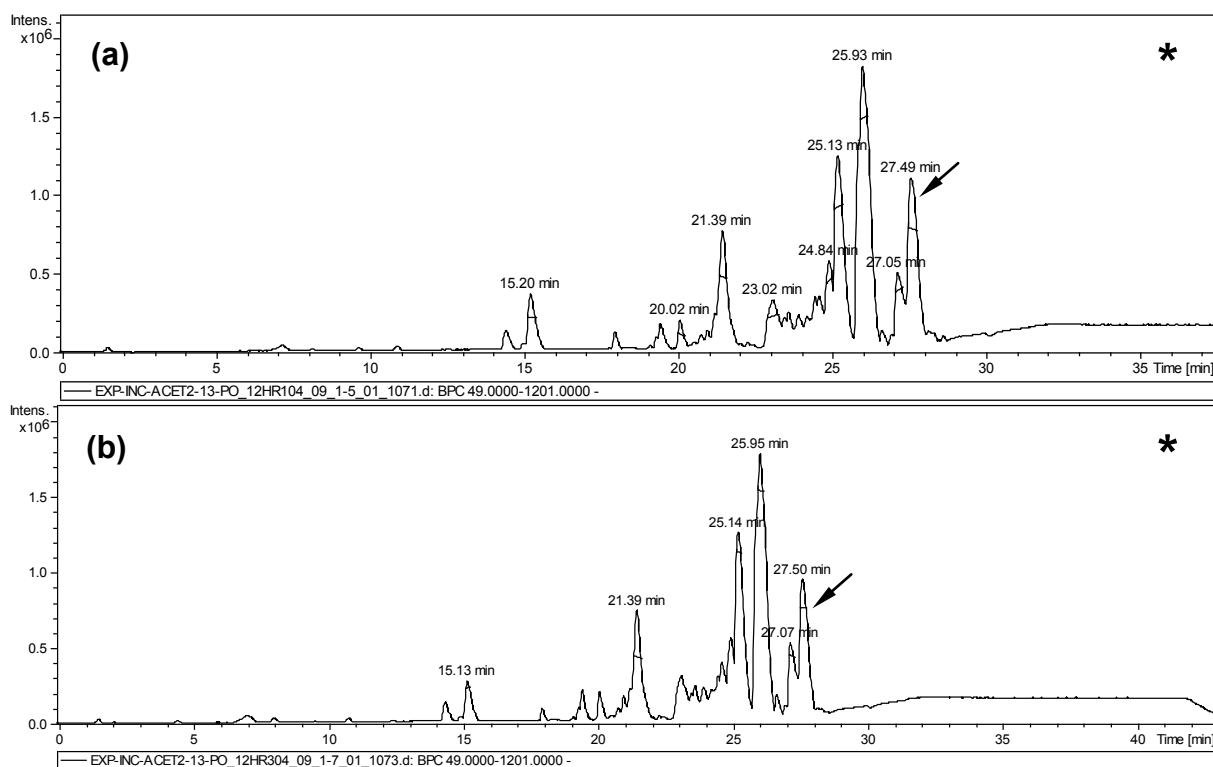


*Ampliação do espectro de massas $t_R = 27,62$ e $27,55$ min para **(a)** e **(b)**, respectivamente

A mesma análise realizada para o experimento relativo ao intervalo de oito horas foi aplicada para os demais períodos de incubação. O perfil metabólico quando a presença ou ausência do cromano **4** nos intervalos de 12, 16, 24, 48 e 72 h, foi o mesmo, e o cromano **4** foi detectado nos cromatogramas com tempos de retenção de 27,49, 27,52, 27,52, 27,52, 27,54 min, respectivamente para os experimentos da primeira replicata (Figuras 39a – 43a, págs. 96 - 98), e 27,50, 27,54, 27,59, 27,54, 27,51 min, respectivamente para os experimentos da segunda replicata (Figuras 39b – 43b, págs. 96 - 98). Assim, as condições experimentais juntamente com as condições de análises empregadas foram reproduzíveis. As bandas de absorção na região do ultravioleta para os extratos também apresentaram o mesmo padrão (dados não apresentados) observado para o cromano **4**. Somado a esses dados, os espectros de massas em alta resolução referentes aos tempos de retenção do cromano **4**, nos cromatogramas dos extratos,

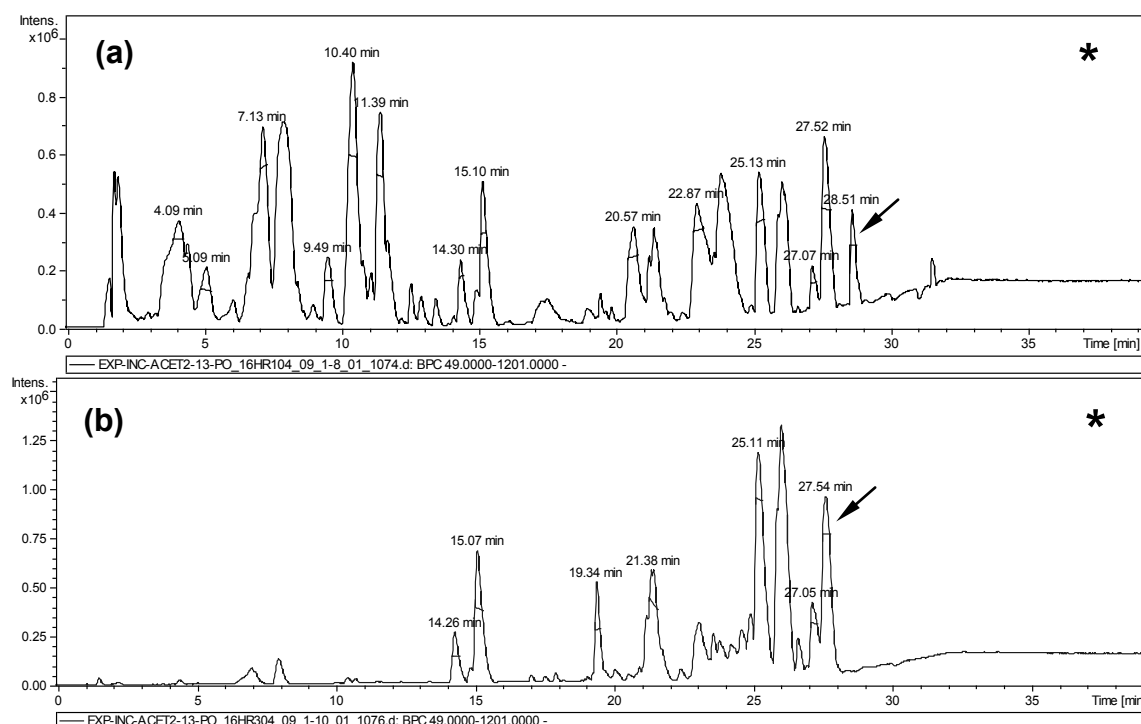
forneceu subsídios para confirmar a identidade do mesmo. As respectivas razões de m/z de $[M-H]^-$ correspondentes aos tempos de incubação de 12, 16, 24, 48 e 72 h foram de m/z 369,2081, 369,2096, 369,2097, 369,2100 e 369,2118 para a primeira replicata (Figuras 44a – 48a, págs. 99 - 101) e 369,2075, 369,2074, 369,2098, 369,2093, 369,2098 para a segunda replicata (Figuras 44b – 48b, págs. 99 - 101). Como existe uma abundância natural dos isótopos $M+1$ e $M+2$, já era esperado um aumento na intensidade relativa dos mesmos. A tabela 8, pág. 102, apresenta as abundâncias relativas dos isótopos $[M-H]^-$, $[M+1-H]^-$, $[M+2-H]^-$ e $[M+3-H]^-$ do cromano **4** (padrão) e dos respectivos intervalos de metabolização avaliados. A análise geral dos resultados dos diferentes intervalos de incorporação do precursor mostraram que não houve variação significativa da intensidade dos sinais quando comparados aos do padrão, indicando que não houve incorporação do acetato no cromano **4** (Tabela 8, pág. 102).

Figura 39 - TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 12 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



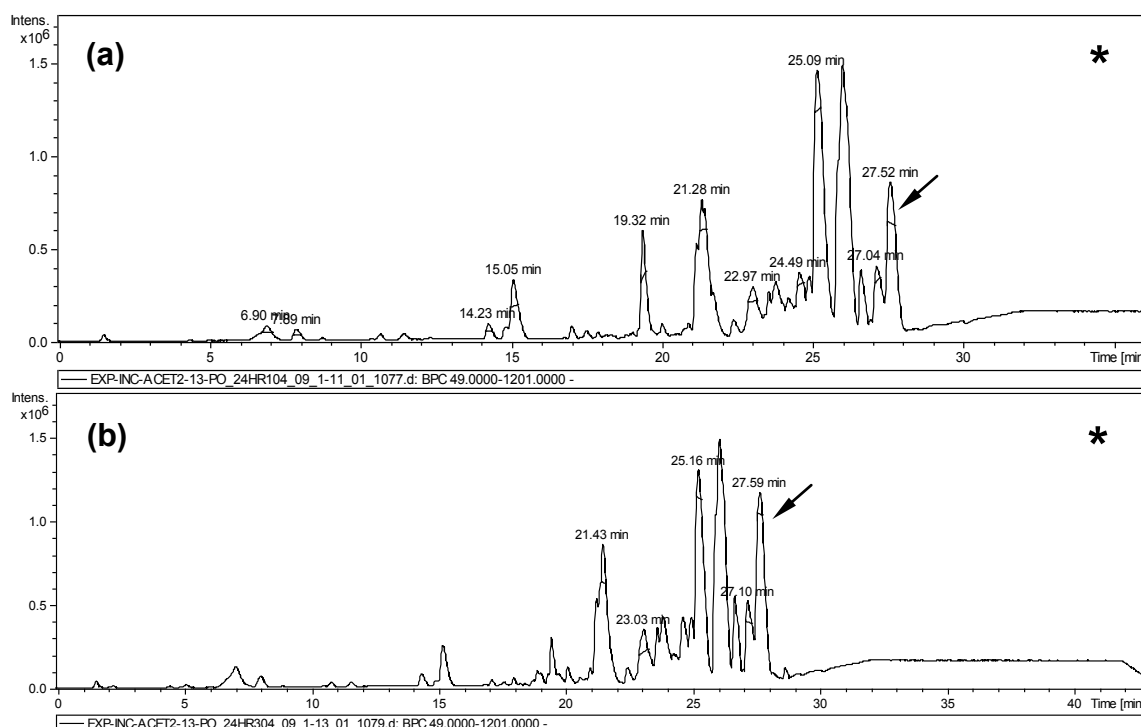
* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 40 - TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 16 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



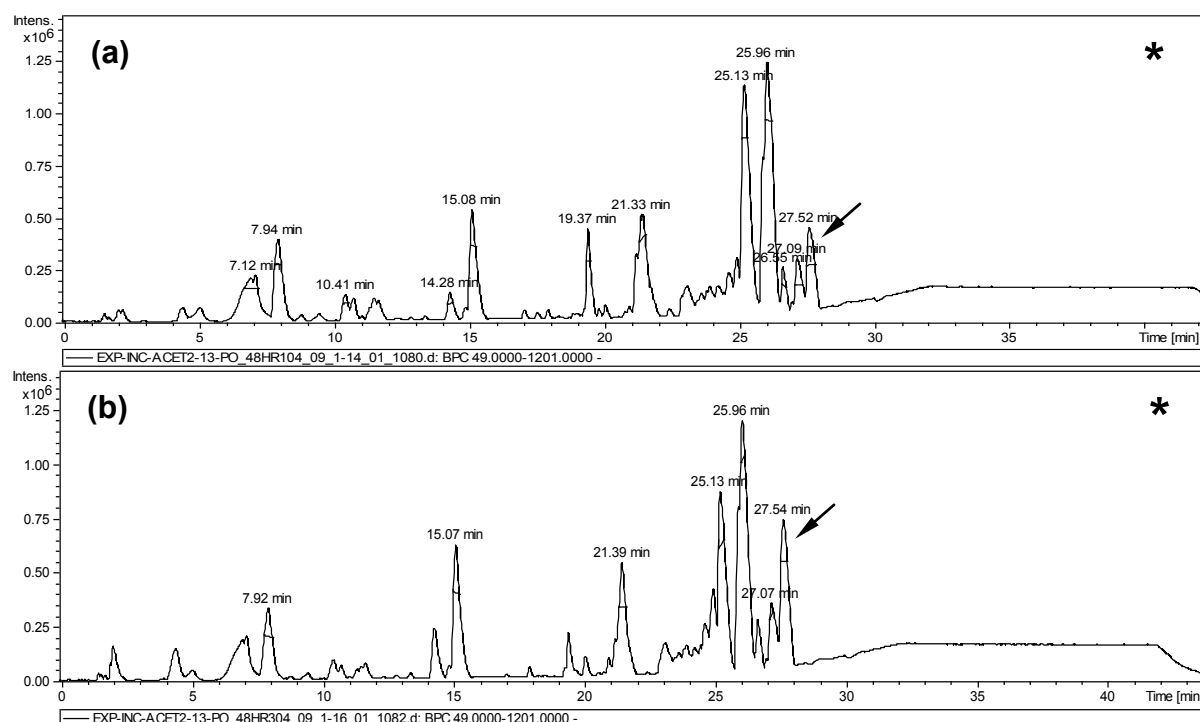
* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 41 - TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 24 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



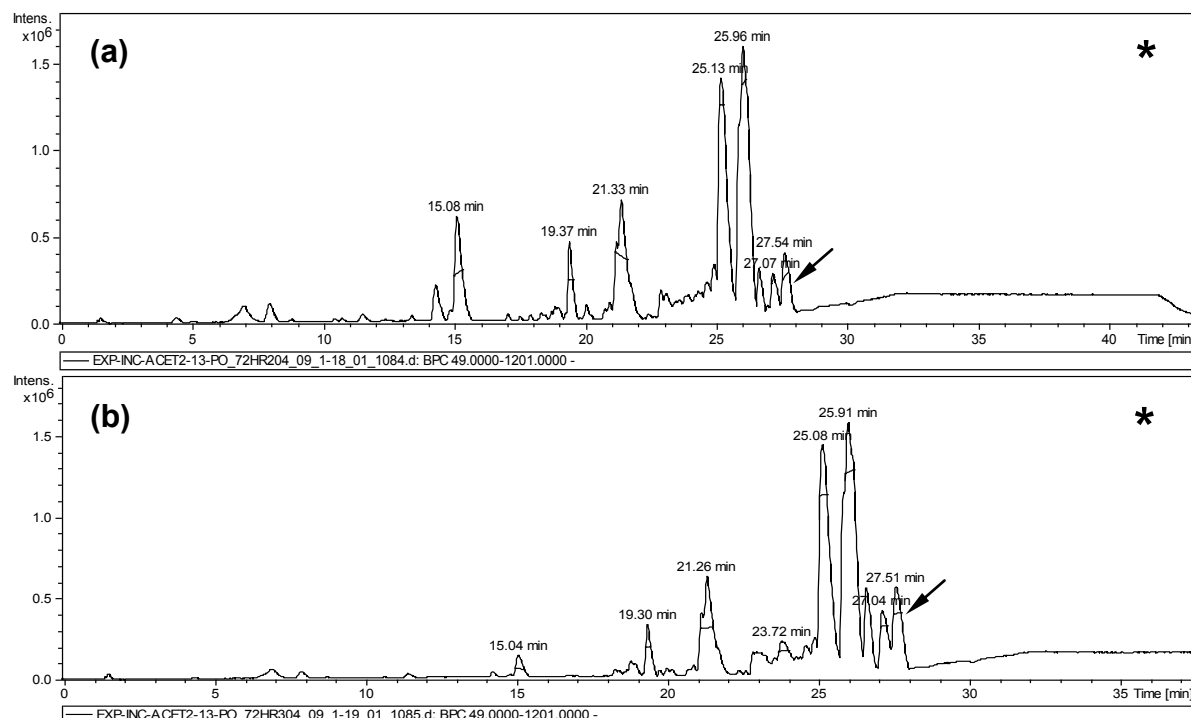
* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 42- TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 48 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 43 - TIC do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 72 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2



* Condição 1 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 1 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 44 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 12 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo

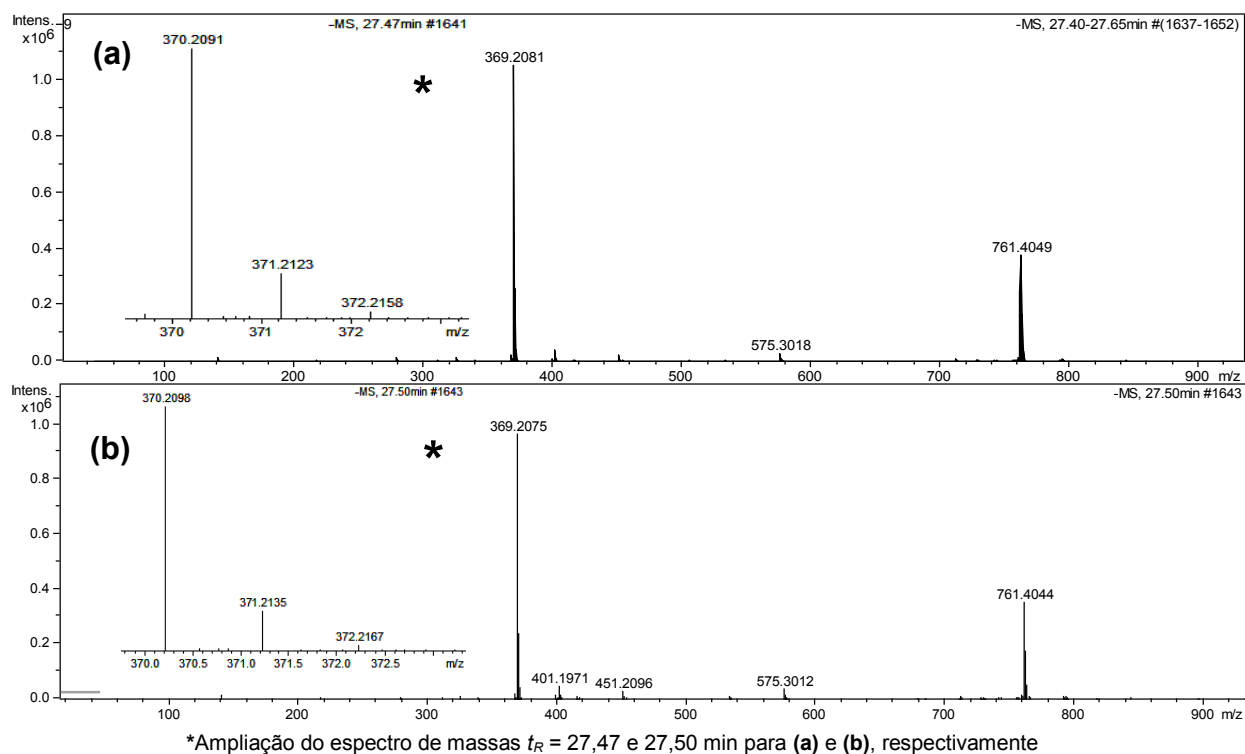


Figura 45 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 16 h; (a) experimento 1 e (b) experimento 2, operando em modo negativo

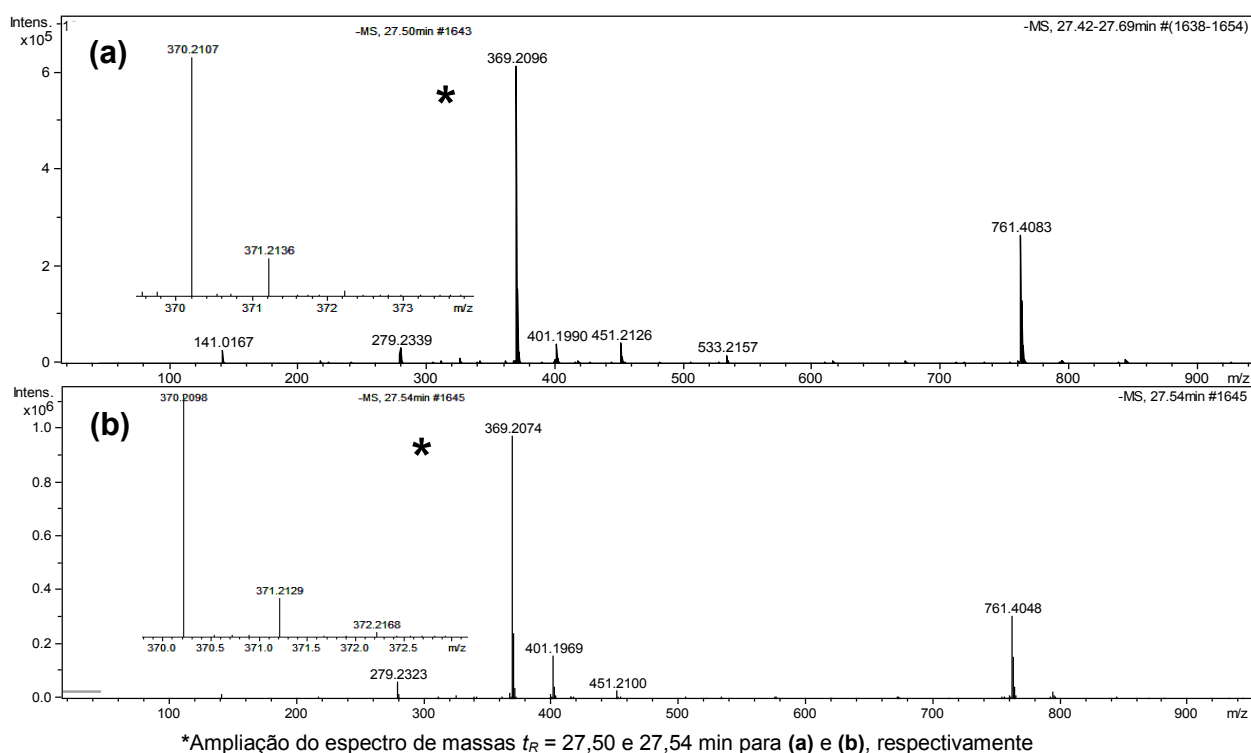
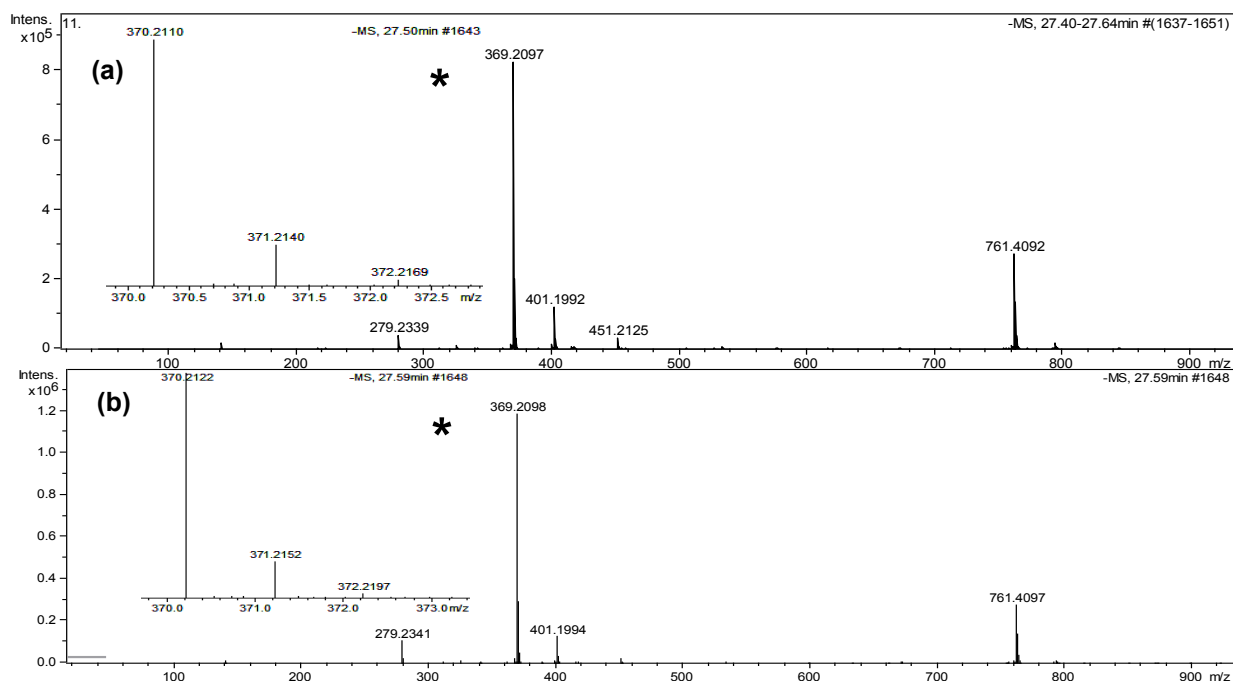
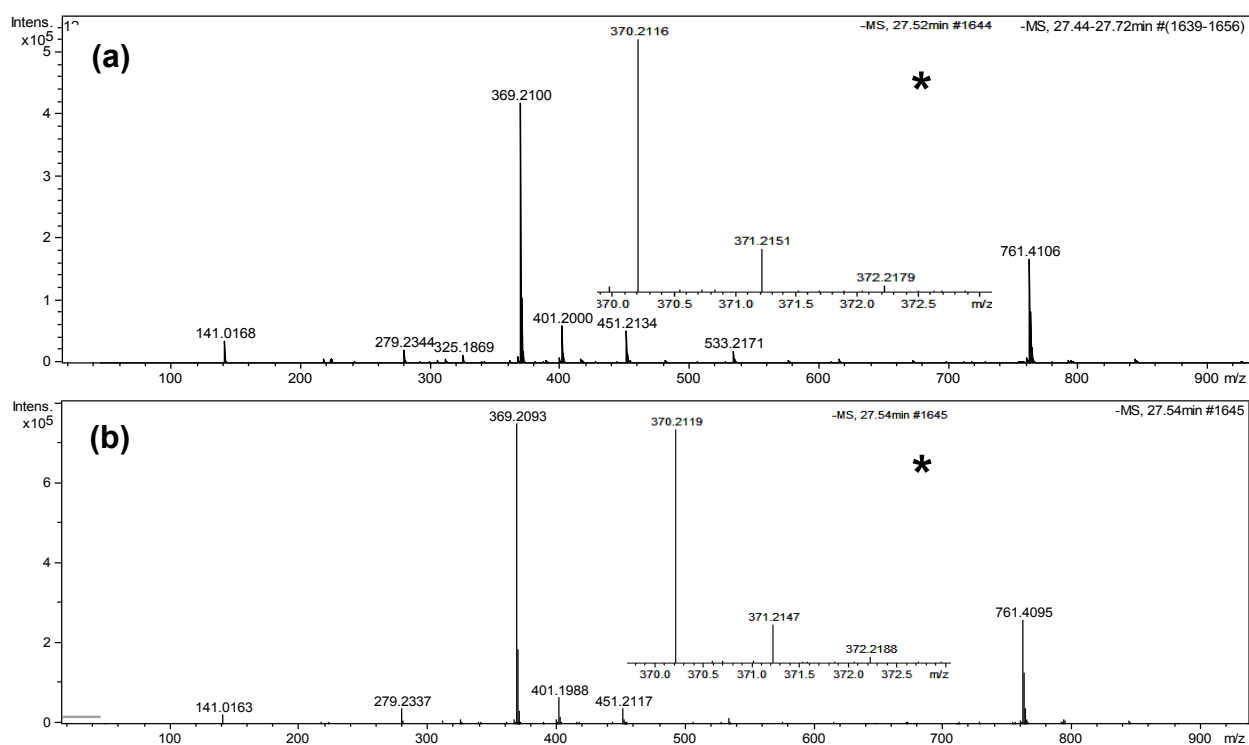


Figura 46 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 24 h **(a)** experimento 1 e **(b)** experimento 2, operando no modo negativo



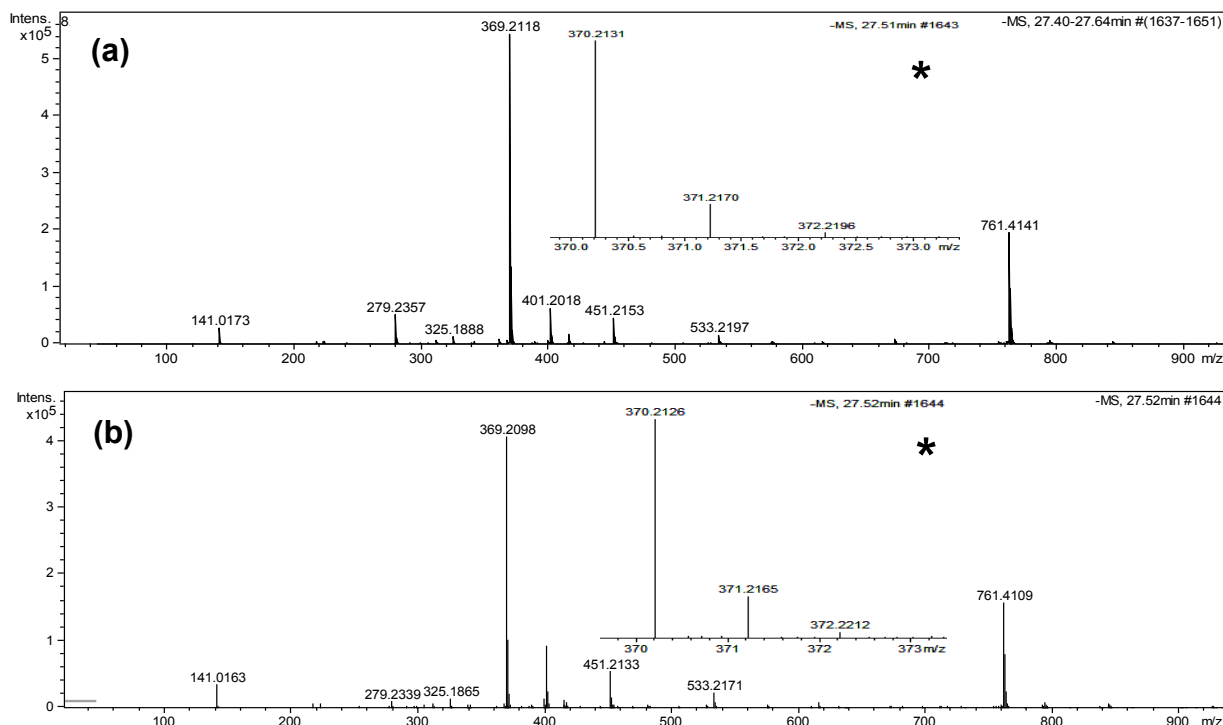
*Ampliação do espectro de massas $t_R = 27,50$ e $27,59$ min para **(a)** e **(b)**, respectivamente

Figura 47 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 48 h; **(a)** experimento 1 e **(b)** experimento 2, operando no modo negativo



*Ampliação do espectro de massas $t_R = 27,52$ e $27,54$ min para **(a)** e **(b)**, respectivamente

Figura 48 - IES-EM do extrato de folhas de *Peperomia obtusifolia*: tempo de incubação de 72 h; **(a)** experimento 1 e **(b)** experimento 2, operando no modo negativo



*Ampliação do espectro de massas $t_R = 27,51$ e $27,52$ min para **(a)** e **(b)**, respectivamente

Baseado nos resultados negativos relacionados aos estudos de incorporação *in vitro* do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio desenvolvidos para a determinação da biossíntese da unidade aromática do cromano **4**, foi planejado um experimento biossintético denominado “de novo”, no qual quantidades do precursor (acetato-[2-¹³C] de sódio) são adicionados a reação enzimática para que haja disponibilidade constante do precursor. A adição de alta concentração do precursor pode gerar um estresse metabólico que irá induzir a utilização do mesmo em processos biocatalíticos (LÓPEZ et al., 2010). Os resultados obtidos nesses experimentos estão demonstrados no item 5.8, pág. 103.

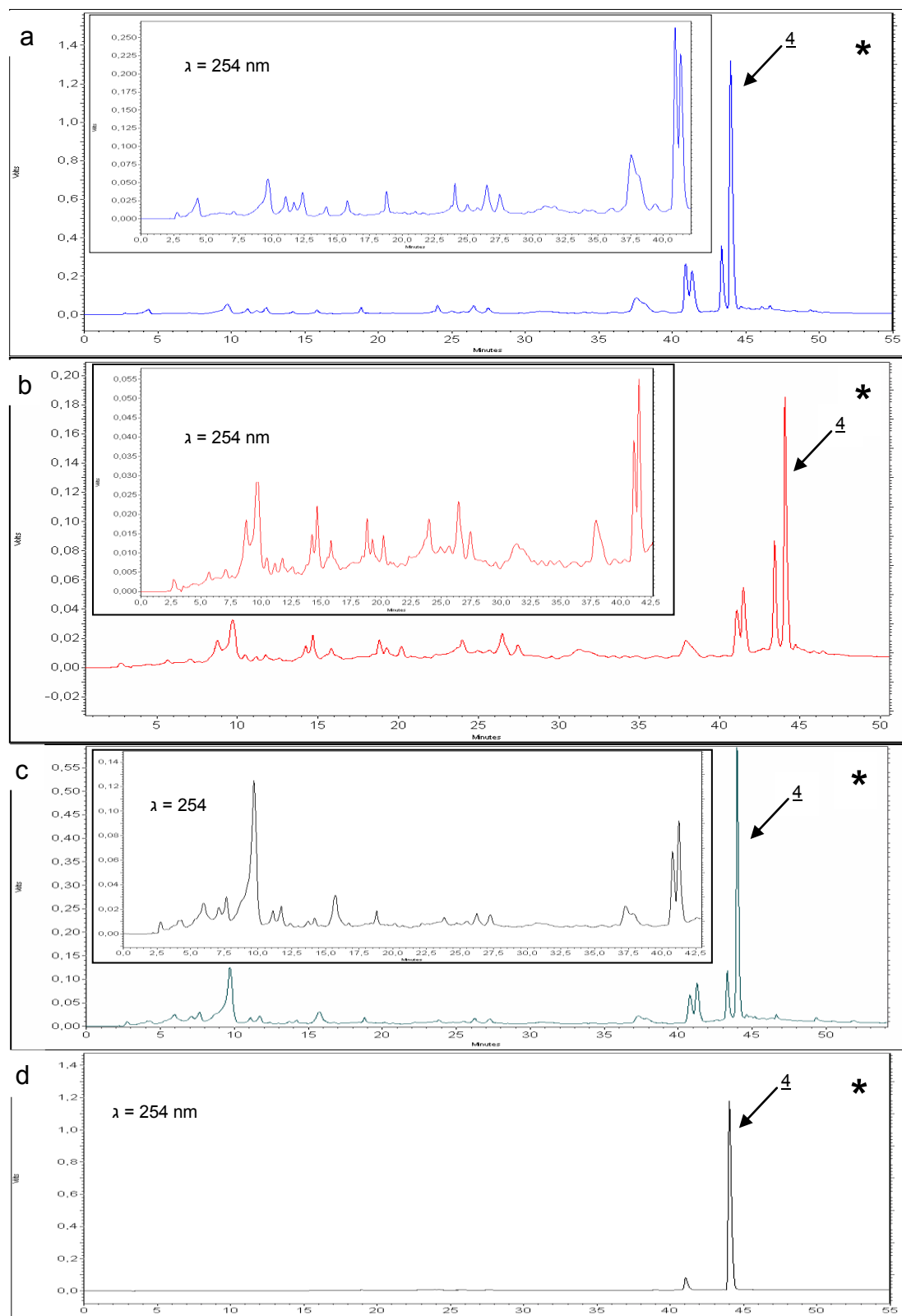
Tabela 8 - Abundâncias isotópicas do cromano **4** (padrão) e dos extratos de folhas após administração de acetato-[2-¹³C] de sódio a partir das análises por CLAE-DAD-EM em alta resolução

Padrão (cromano 4)			Experimento de incorporação			
	<i>m/z</i>	%	Tempo de metabolização (h)	Tempo de retenção (min)	<i>m/z</i>	%
[M - H] ⁻	369,2070	100,00	8	27,62	369,2077	100,00
[M+1 - H] ⁻	370,2095	24,80			370,2142	25,16
[M+2 - H] ⁻	371,2123	3,90			371,2143	4,15
[M+3 - H] ⁻	372,2153	0,51			372,2172	0,61
			8	27,55	369,2078	100,00
[M - H] ⁻					370,2103	25,18
[M+1 - H] ⁻					371,2137	4,15
[M+2 - H] ⁻					372,2171	0,56
			12	27,47	369,2066	100,00
[M - H] ⁻					370,2091	24,37
[M+1 - H] ⁻					371,2123	4,03
[M+2 - H] ⁻					372,2158	0,57
			12	27,50	369,2075	100,00
[M - H] ⁻					370,2098	24,70
[M+1 - H] ⁻					371,2135	4,04
[M+2 - H] ⁻					372,2167	0,56
			16	27,50	369,2082	100,00
[M - H] ⁻					370,2107	24,65
[M+1 - H] ⁻					371,2136	3,87
[M+2 - H] ⁻					372,2170	0,51
			16	27,54	369,2074	100,00
[M - H] ⁻					370,2098	24,50
[M+1 - H] ⁻					371,2129	3,92
[M+2 - H] ⁻					372,2168	0,51
			24	27,50	369,2083	100,00
[M - H] ⁻					370,2110	24,55
[M+1 - H] ⁻					371,2140	4,03
[M+2 - H] ⁻					372,2169	0,55
			24	27,59	369,2098	100,00
[M - H] ⁻					370,2122	24,66
[M+1 - H] ⁻					371,2152	3,96
[M+2 - H] ⁻					372,2197	0,51
			48	27,52	369,2087	100,00
[M - H] ⁻					370,2116	25,00
[M+1 - H] ⁻					371,2151	4,17
[M+2 - H] ⁻					372,2119	0,64
			48	27,54	369,2093	100,00
[M - H] ⁻					370,2119	24,53
[M+1 - H] ⁻					371,2147	3,96
[M+2 - H] ⁻					372,2188	0,59
			72	27,51	369,2118	100,00
[M - H] ⁻					370,2131	25,39
[M+1 - H] ⁻					371,2170	4,24
[M+2 - H] ⁻					372,2196	0,63
			72	27,52	369,2098	100,00
[M - H] ⁻					370,2126	24,91
[M+1 - H] ⁻					371,2165	4,68
[M+2 - H] ⁻					372,2212	0,67

5.8 Experimentos de incorporação *in vivo* do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio em *Peperomia obtusifolia* – estudo de biossíntese “de novo” do cromano 4

Os experimentos de biossíntese “de novo” consistiram em reinvestigar a atuação do precursor acetato-[2-¹³C] de sódio na biossíntese do cromano de *Peperomia obtusifolia* pela administração constante de uma solução do precursor enriquecido com ¹³C nas plântulas, durante o período previamente estabelecido de 96 horas. Após o processo de extração em fase sólida (Figura 16, pág. 64), os extratos obtidos após a administração *in vivo* empregando acetato-[2-¹³C] de sódio e controle, foram analisados por CLAE-UV e comparados com o perfil cromatográfico do extrato obtido das folhas coletadas da planta *in natura*. Em todas as análises o cromano **4**, previamente isolado das folhas de *P. obtusifolia* foi utilizado como padrão (Figura 49, pág. 104). É importante destacar que o perfil metabólico para os três extratos obtidos após administração do precursor, incluindo aquele obtido após o experimento sem adição constante do precursor para gerar um estresse metabólico (controle), aquele do controle *in natura* (controle) e o obtido após o experimento de adição constante do precursor foram semelhantes na região próxima ao tempo de retenção do cromano **4** (Figuras 49a, 49b e 49c, respectivamente, pág. 104), e possibilitaram a identificação do cromano **4** no cromatograma, com t_R de 44,5 min (Figura 49d, pág. 104).

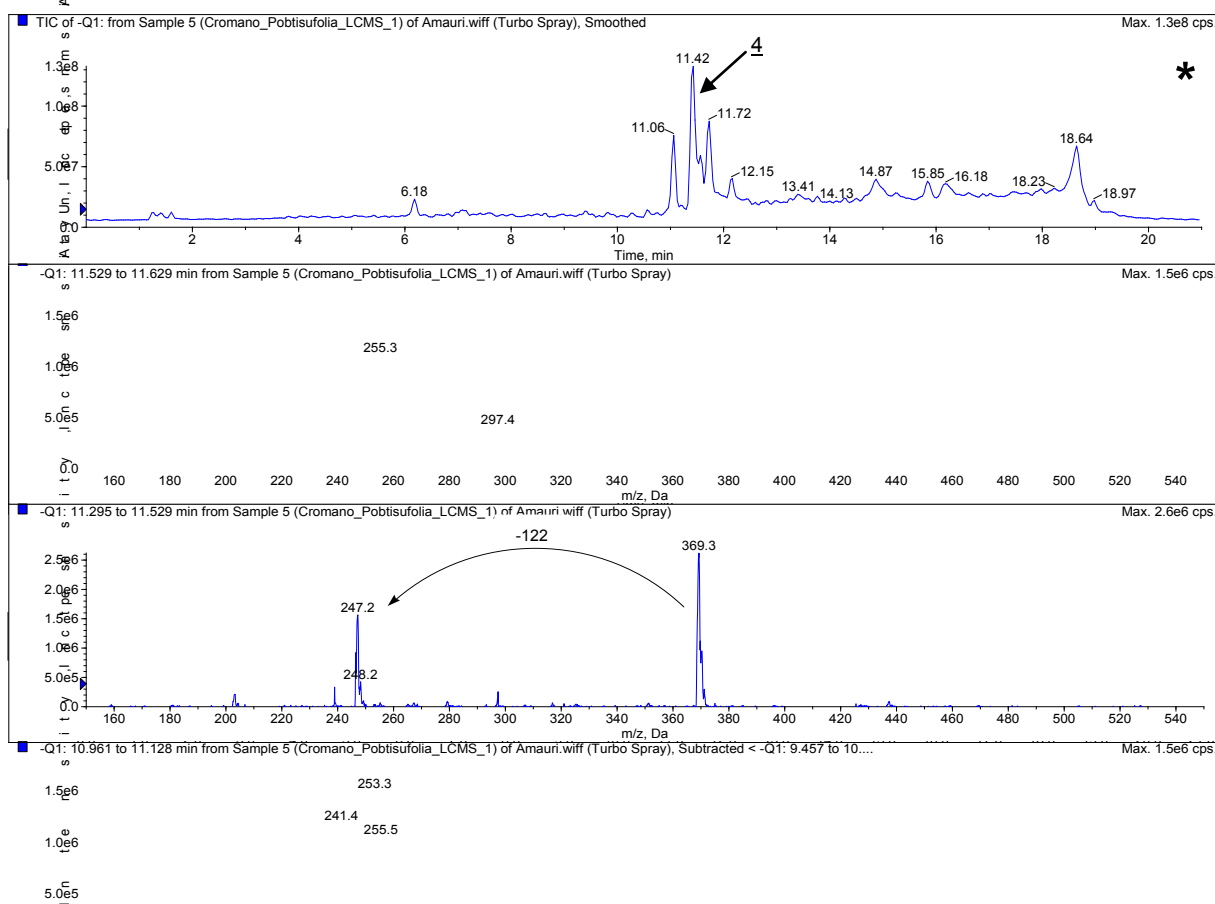
Figura 49 - a – Pefis cromatográficos por CLAE-UV: **a** - controle: planta submetida ao estresse na ausência de precursor; **b** – controle: planta não submetida ao estresse (*in natura*); **c** – planta submetida ao estresse e incubada com o precursor acetato-[2-¹³C] de sódio; **d** – padrão: cromano 4



* Condição 3 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 2 (item 3.6.3, pág. 44)

Após o isolamento do cromano **4** (Figura 18, pág. 67) do extrato proveniente do experimento de incorporação *in vivo*, a amostra foi submetida a análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, buscando avaliar o aumento na intensidade de isótopos $M-H+1$, $M-H+2$, $M-H+3$,..., $M-H+n$ em relação aos isótopos naturais. Inicialmente, o experimento consistiu em obter o perfil cromatográfico do cromano **4** isolado das folhas de *Peperomia obtusifolia in natura*, não submetida aos experimentos de incorporação do precursor. A figura 50, pág. 105, apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) obtido para o cromano oriundo de plantas não submetidas às etapas de incorporação do precursor. Apesar de detectar algumas bandas cromatográficas, as quais não foram detectadas na análise por CLAE-UV entre 11,0 e 12,0 min, as mesmas não influenciaram na detecção da banda cromatográfica referente ao cromano **4** em 11,42 min (Figura 50, pág. 105). Além disso, a identidade da substância foi confirmada pela análise do espectro de massas (Figura 51, pág. 105), visto que o fragmentograma da banda em 11,42 min mostra o pico com m/z 369, correspondente ao íon $[M-H]^-$ do cromano **4** (Figura 27, pág. 80), bem como o pico com m/z 247, referente ao fragmento $[M-H-122]^-$ formado através do mecanismo do tipo retro Diels-Alder do anel oxibenzílico do cromano (Figura 27, pág. 80).

Figura 50 - TIC do cromano **4 isolado de *Peperomia obtusifolia***



Após otimizar a condição de análise para o cromano **4** (padrão), a mesma foi utilizada na análise do cromano presente na fração obtida para os experimentos de alimentação com precursor acetato-[2-¹³C] de sódio *in vivo*. O perfil cromatográfico, com base no TIC é semelhante aquele apresentado para o não incorporado (Figura 52, pág. 106). Além disso, ambos os experimentos apresentaram similaridade quando comparados os espectros de massas do não incorporado (experimento controle, Figura 51, pág. 105) com aquele após alimentação *in vivo* (Figura 53, pág. 106), não mostrando evidências de metabolização do precursor para formação do metabólito em estudo, visto que não se observa uma correlação entre a formação de íons e/ou fragmentos diferentes em termos de *m/z* daquelas características do padrão. É importante destacar, que não houve aumento na intensidade de isótopos M-H+1 e M-H+2 que fossem distintos dos obtidos com abundância isotópica natural (Figura 53, pág. 106).

Figura 52 - TIC do cromano **4** isolado de folhas de *Peperomia obtusifolia* após incorporação com acetato-[2-¹³C] de sódio

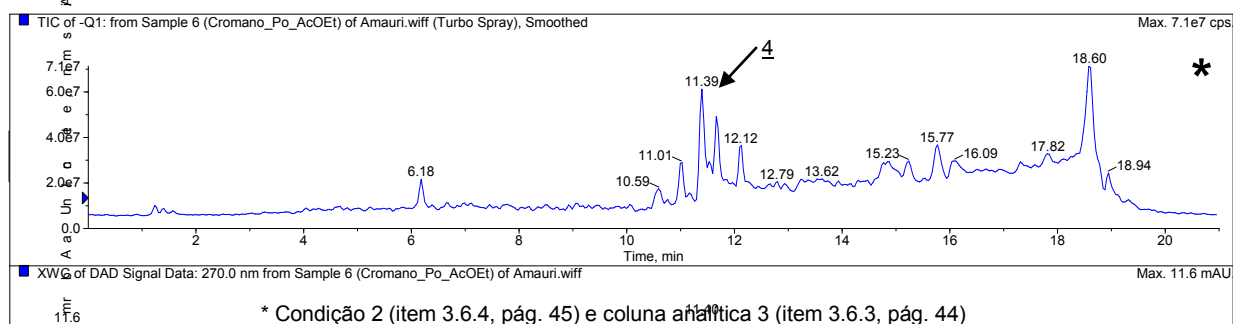
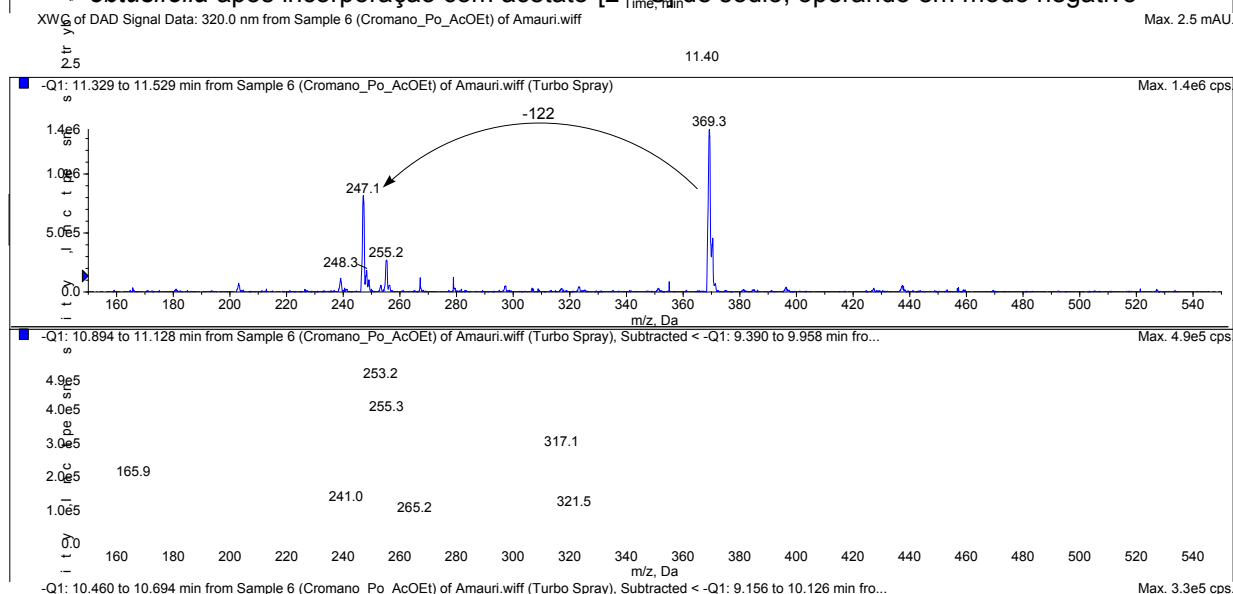


Figura 53 – IES-EM da banda entre 11,3 e 11,5 min referente ao cromano **4** isolado de *Peperomia obtusifolia* após incorporação com acetato-[2-¹³C] de sódio, operando em modo negativo



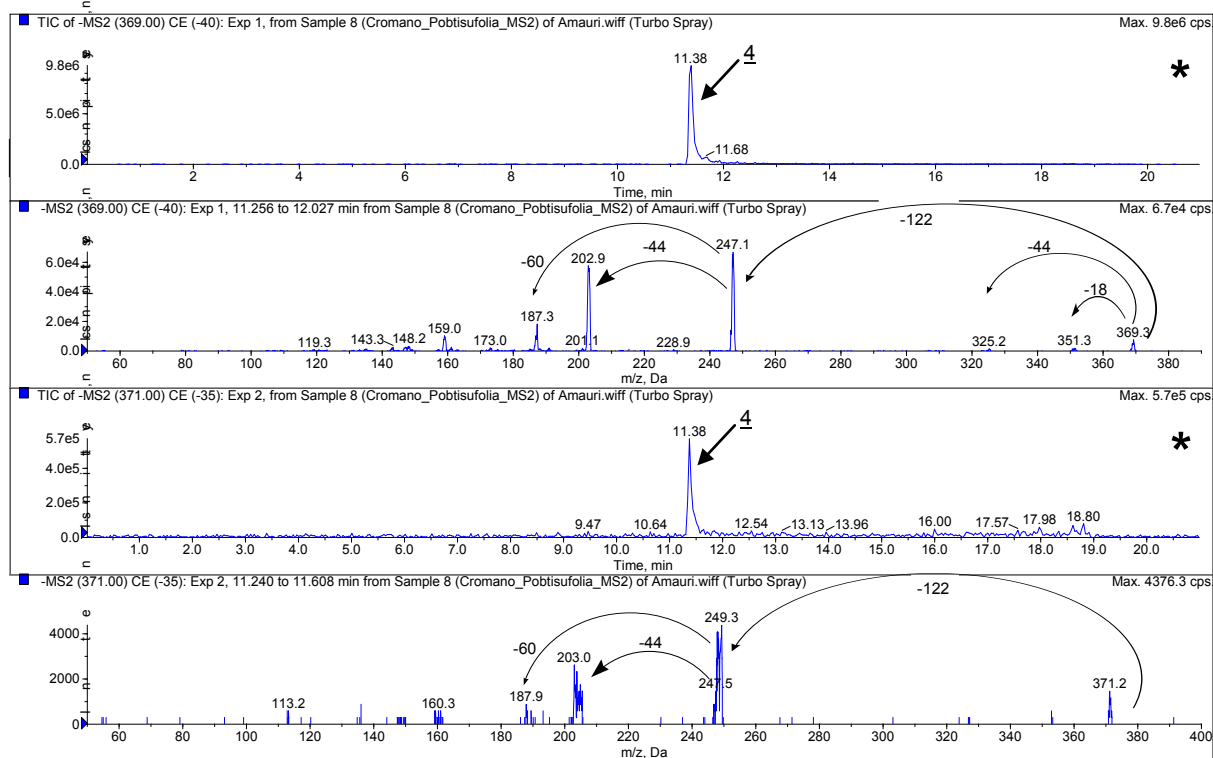
Para melhor avaliar o experimento de incorporação *in vivo* utilizando o acetato-[2-¹³C] de sódio em *Peperomia obtusifolia*, o cromano **4** (obtido da planta *in natura*, controle) e aquele derivado das folhas após alimentação com precursor foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiente acoplada a espectrometria de massas, empregando a técnica de fragmentação sequencial (EM/EM).

Nestes experimentos, os íons m/z 369 e 371 foram selecionados para estudos de fragmentação. O perfil de fragmentação apresentado pela molécula desprotonada com m/z de 369 $[M-H]^-$ (isótopo natural) tem como íons principais: m/z 351, 325, 247, 203 e 187 (Figura 54, pág. 108), dos quais as propostas de fragmentação envolvida nos íons m/z 351, 325 e 247 já foram discutidos na figura 27 (pág. 80), caracterísca de perda neutra de água, eliminação neutra de CO₂ e perda de 122 u.m.a através do rearranjo do tipo retro Diels-Alder no Anel oxibenzílico do cromano **4**.

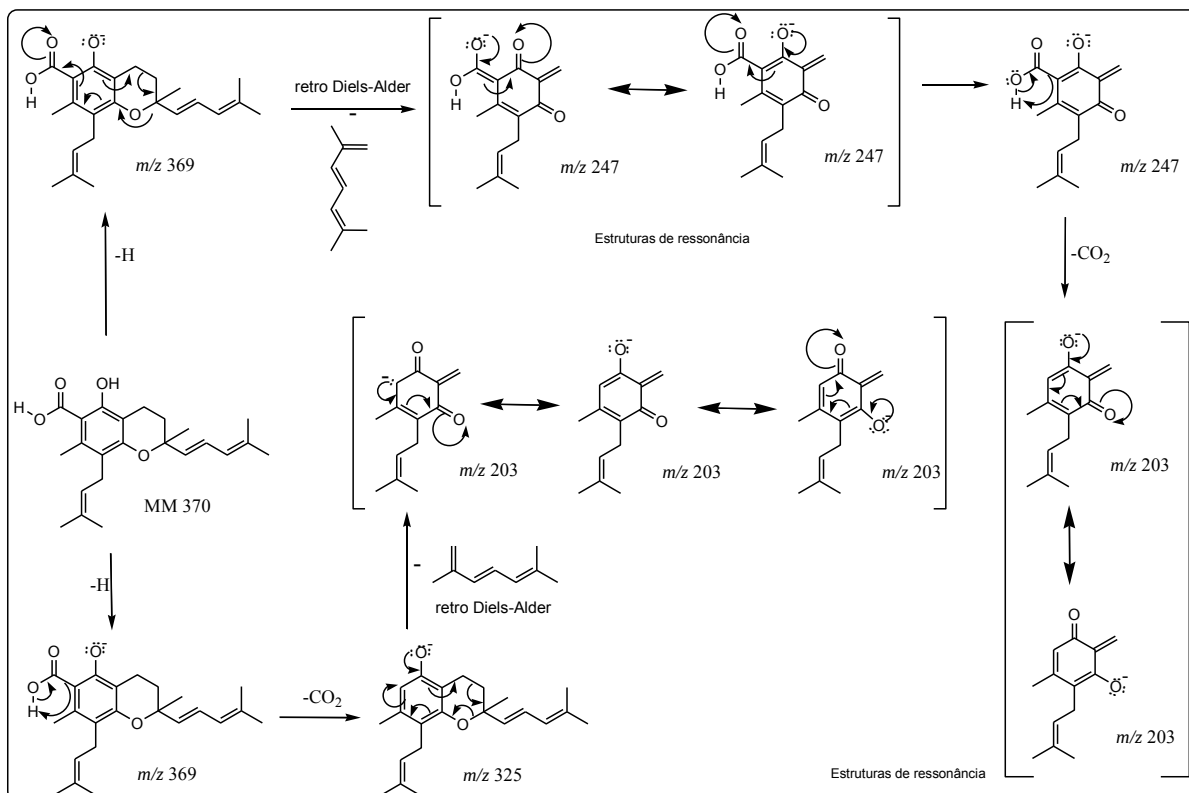
A partir destes dados de fragmentação da molécula desprotonada, foram propostas dois mecanismos que corroboram a formação do íon com m/z 203 (Figura 55, pág. 109). A primeira proposta esta baseada através da formação do íon m/z 247 (mecanismo retro Diels-Alder) seguida de eliminação neutra de CO₂, resultando no fragmento $[M-H-122-44]^-$. A segunda proposta para a formação do íon m/z 203 é baseada, primeriamente, na eliminação neutra de CO₂, seguida pelo rearranjo do tipo retro Diels-Alder no anel oxibenzílico do cromano o qual por sua vez resulta no íon $[M-H-122-44]^-$ (Figura 55, pág. 109). Como pode ser observado na figura 55 as duas propostas de fragmentações sugerem a formação de híbridos de ressonância os quais são responsáveis por estabilizar as espécies formadas.

De maneira análoga, o perfil de fragmentação apresentado para o isótopo natural com m/z de 371 $[M-H+2]^-$ tem como íons principais: m/z 249, 203 e 188 também derivados da banda com tempo de retenção de 11,38 min os quais correspondem àqueles derivados do íon m/z 369 (Figura 54, pág. 108).

Figura 54 – IES-EM/EM dos picos com m/z 369 e 371, respectivamente, operando em modo negativo. Cromano **4** isolado de *Peperomia obtusifolia*

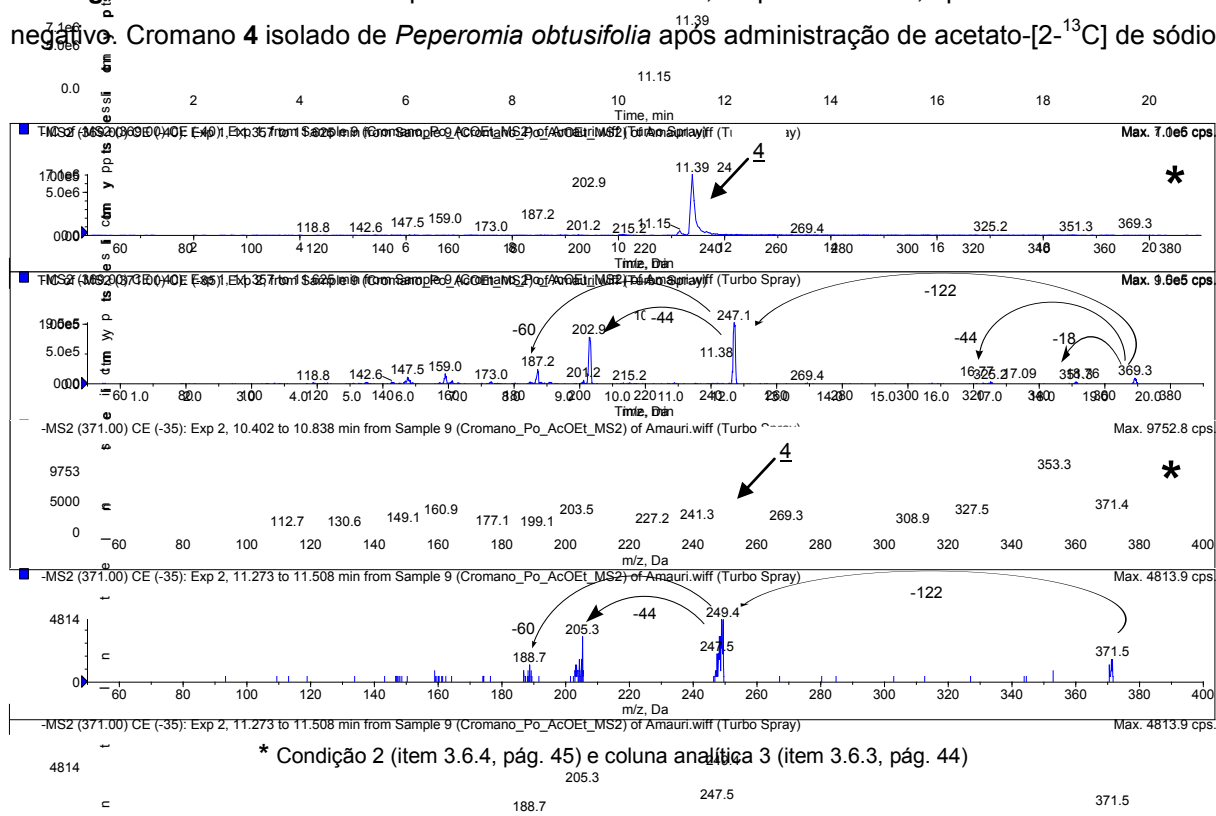


* Condição 2 (item 3.6.4, pág. 45) e coluna analítica 3 (item 3.6.3, pág. 44)

Figura 55 - Proposta de fragmentação do cromano **4**: mecanismo para formação do íon m/z 203

A comparação dos dados de espectrometria de massas obtidos para o cromano **4** derivado dos experimentos *in vivo* após administração constante do precursor com aqueles obtidos para o cromano **4** controle, não evidenciou uma variação da intensidade relativa dos sinais, bem como não houve a formação de íons fragmentos que fossem o suficiente para confirmar a incorporação do acetato na via metabólica do cromano (Figura 56, pág. 110). Além disso, a análise do perfil de fragmentação para as espécies com m/z 369 e 371 após o experimento de administração constante foi reprodutível quando comparados com aqueles obtidos para o controle, os quais também não permitiram detectar aumento na intensidade dos isótopos que fosse distinto daquele referente ao padrão, novamente não permitindo inferir sobre a incorporação do acetato na molécula do cromano **4** (Figura 56, pág. 110).

Figura 56 – IES-EM dos picos com m/z 369 e 371, respectivamente, operando em modo negativo. Cromano **4 isolado de *Peperomia obtusifolia* após administração de acetato-[2- 13 C] de sódio**



Os resultados biossintéticos realizados não mostraram a incorporação do precursor acetato-[2- 13 C] de sódio no cromano **4**. Associado a esses resultados foi realizado experimentos visando à extração enzimática das folhas de *Peperomia obtusifolia* e *Piper aduncum*, além de dosagem proteica e análise por gel de eletroforese monodimensional dos extratos enzimáticos obtidos, relacionada com a classe das enzimas prenilttransferases e da subclasse (geranilttransferases), envolvidas na biossíntese dos cromanos e cromenos. A dosagem proteica e análise por eletroforese mostraram maior concentração de proteínas em *Piper aduncum*, principalmente aquela associada à banda eletrofética correspondente à massa molecular que caracteriza as prenilttransferases, quando comparados aos mesmos parâmetros obtidos para *P. obtusifolia*. Associado aos dados previamente obtidos, experimentos visando determinar se haveria ou não uma dinâmica metabólica associada à formação dos cromanos de *P. obtusifolia* mostrou que os cromanos descrevem ritmo biossintético aparentemente aleatório e distinto dos cromenos isolados de espécies de *P. aduncum*. Com isso, uma nova hipótese foi proposta quanto à origem da biossíntese dos cromanos de *P. obtusifolia* e a possibilidade dos cromanos serem inicialmente biossintetizados por um sistema heterólogo foi investigada, incluindo fungos endofíticos que coabitam a espécie. Compreender se

há uma relação entre o metaboloma encontrado nos diferentes órgãos da planta e correlacionar com o metaboloma produzido pelos microrganismos associados à mesma é um desafio interessante do ponto de vista da química de produtos naturais moderna (SCHULZ et al., 2002; KUSARI, HERTWECK; SPITELLER, 2012). A possibilidade de transferência de genes que codificam enzimas envolvidas em rotas metabólicas distintas de um sistema heterólogo para plantas já é conhecida e pode influenciar na diversificação química de matrizes vegetais (SCHULZ et al., 2002; TENGURA; KHAN; QUERESHI, 2011; LIN, et al., 2013; LIU; BEGLEY, 2013). Com isso, fungos endofíticos presentes em folhas e caules de um espécime de *Peperomia obtusifolia*, proveniente da Argentina, foram isolados e desenvolvidos em meio de cultivo *in vitro*. As etapas de isolamento, indução e manutenção dos fungos foram realizadas no laboratório da Prof^a Dr^a Silvia Noelí López da Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas da Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. Os fungos endofíticos foram analisados quanto à presença de cromanos e/ou cromenos e os resultados estão descritos a seguir (item 5.9, pág. 112).

5.9 Análise dos extratos de fungos endofíticos isolados de folhas e caules de *Peperomia obtusifolia*

A análise dos extratos da população endofítica consistiu em avaliar a presença de metabólitos secundários que apresentam núcleos benzopiranos tais como os cromanos e/ou cromenos no metaboloma dos endófitos.

A identidade ou não das classes de metabólitos secundários nos diferentes órgãos vegetais de *P. obtusifolia* e/ou nos micro-organismos associados à mesma (fungos endofíticos) indicará se há diferenças ou não, principalmente quanto ao metaboloma e, conseqüentemente, ao proteoma envolvidos na formação dos metabólitos de interesse. Diante disso, a avaliação da presença de substâncias que contém o núcleo benzopirano desenvolvida neste trabalho busca abrir novas fronteiras para os estudos metabolômicos dos micro-organismos associados com a espécie de *P. obtusifolia*. Ainda é importante destacar que o trabalho de MOSTACERO et al. (2013) descreve o primeiro trabalho que reporta a atividade antibactericida de extratos de *P. obtusifolia* e da população endofítica da espécie, identificados como *Phomopsis* sp., corroborando a importância deste estudo multidisciplinar na consolidação de uma proposta inovadora e inédita.

Assim, a análise dos extratos foi realizada por CCDC empregando dois sistemas de fase móvel (item 4.9.4, pág. 73), e a revelação das cromatoplacas foi feita pela inspeção de luz nos comprimentos de onda a 254 e 365 nm, bem como por meio de nebulização de *para*-anisaldeído seguido de aquecimento em estufa. Como padrão foi empregado o cromano **4**, isolado previamente de folhas de *P. obtusifolia*. Além da comparação entre os tempos de retenção, também foi considerada a similaridade apresentada pelo grupo cromóforo presente nas substâncias contidas nos extratos dos endófitos com aquele característico de substâncias que contém o núcleo benzopirano, tais como os cromanos. Nesta primeira etapa foram obtidos 36 extratos de fungos endofíticos, os quais estão em fase de identificação, e há indícios de gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Colletotrichum*, além do gênero *Phomopsis* sp., o qual já foi identificado com base em ferramentas de biologia molecular.

As cromatoplacas dos 36 extratos obtidos dos endófitos encontram-se nas figuras 57 – 64 (págs. 115 – 122). De maneira geral, o perfil químico dos metabólitos apresentados pelos fungos endofíticos são de média a alta polaridade, o que justifica

o emprego de dois sistemas de fase móvel, o primeiro binário e o segundo ternário de alta polaridade. Os dois sistemas de fase móvel apresentaram boa separação para as substâncias presentes nos extratos e permitiram obter um primeiro parâmetro cromatográfico sobre o metaboloma dos micro-organismos associados com a espécie de *P. obtusifolia*. Foi possível verificar uma similaridade entre o perfil metabólico de alguns dos microrganismos estudados por meio de CCDC com inspeção de luz nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e através da revelação com *para*-anisaldéido (Tabela 9, pág. 113). É importante destacar que o perfil cromatográfico dos endófitos também foi comparado com o meio de cultivo empregado para o desenvolvimento dos fungos endofíticos (controle, Br) (Figuras 63 e 64, págs. 121 e 122).

A análise do perfil cromatográfico obtido por CCDC dos fungos endofíticos isolados de *P. obtusifolia*, não permitiu identificar com segurança a presença de substâncias que contém o núcleo benzopirano no metabolismo dos mesmos, devido à complexidade apresentada pelos extratos. Porém, a similaridade entre o grupo cromóforo apresentado pelo cromano **4** e algumas bandas presentes nos extratos podem sugerir que estes possam estar sendo produzidos também pelos micro-organismos associados a espécie.

Tabela 9 – Agrupamento dos endófitos que apresentaram similaridade quanto à constituição do perfil cromatográfico por CCDC

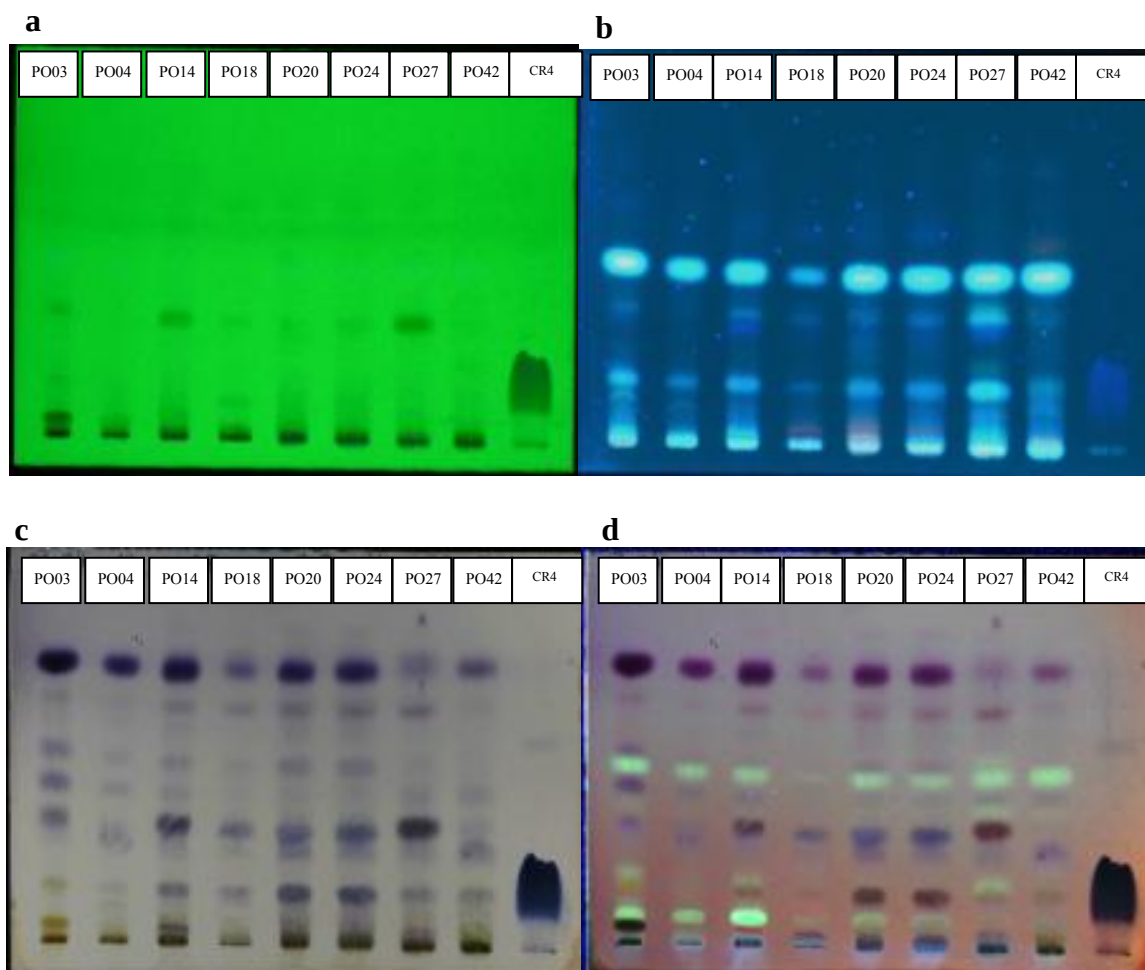
Fungos endofíticos	Figuras	Páginas
PO20 e PO24	57 e 58	115 e 116
PO17 e PO21	59 e 60	117 e 118
PO45, PO22 e PO38	59 e 60	117 e 118
PO57 e PO16	61 e 62	119 e 120
PO26, PO46 e PO51	63 e 64	121 e 122
PO42, PO13 e PO33	63 e 64	121 e 122

É importante ressaltar que entre os cromanos encontrados em espécies de *Peperomia*, como por exemplo, aqueles isolados de *P. obtusifolia*, o grupo cromóforo é o mesmo, tais como os cromanos **4**, **5**, **6**, **7** e **8** (Figura 3, pág. 35). Porém, como as estruturas químicas de **4**, **5**, **6**, **7** e **8** são distintas, consequentemente, há diferença na polaridade apresentada pelas mesmas, acompanhada de diferentes fatores de retenção (Rf) em CCDC, por exemplo. Entre os extratos de fungos endofíticos isolados de *P. obtusifolia*, a análise por CCDC permitiu verificar a presença de grupo cromóforo similar ao cromano **4**, tais como: os endófitos PO03, PO04, PO14, PO18, PO20, PO24, PO27, PO13, PO16, PO57, PO12, PO26, PO42, PO46, PO33 e PO51 (Tabela 10, pág. 114).

Tabela 10 – Agrupamento dos endófitos que apresentaram similaridade quanto ao grupo cromóforo do cromano **4**

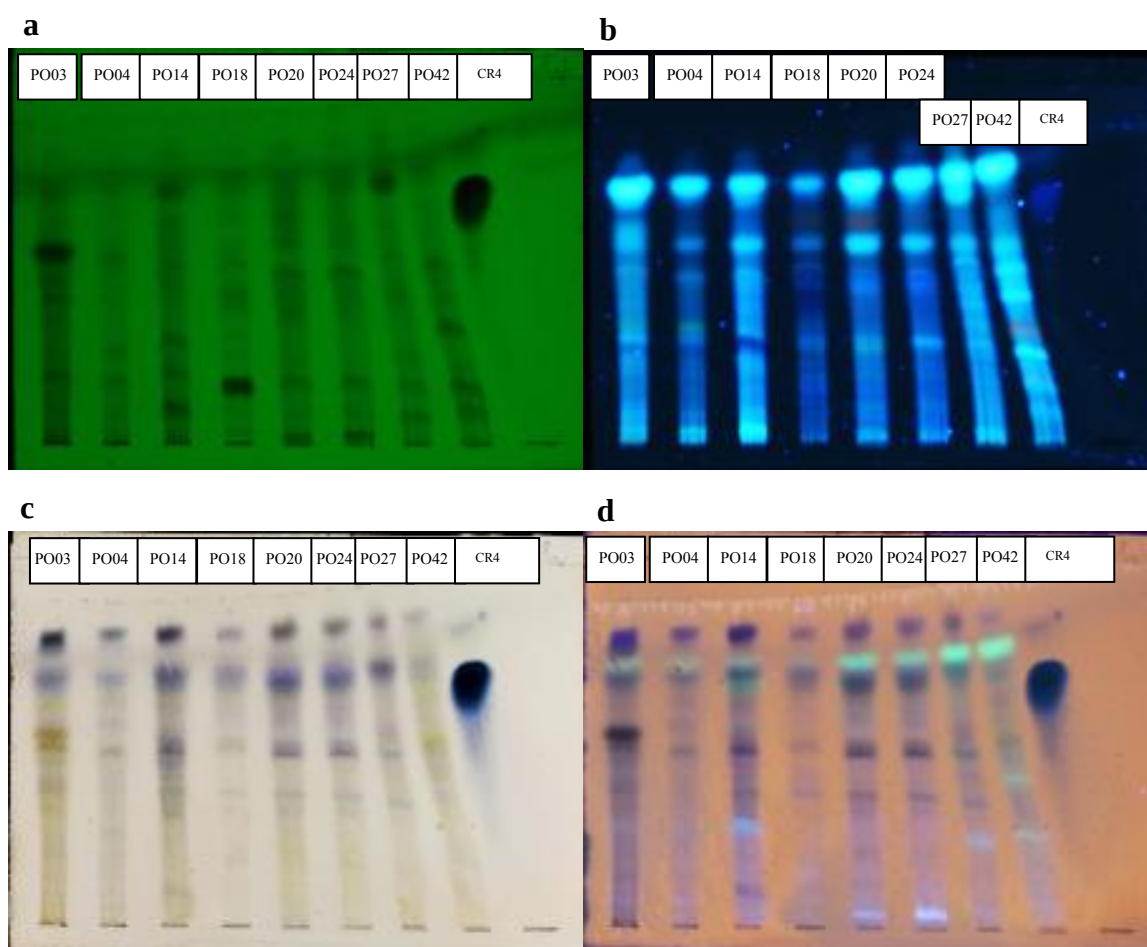
Fungo endofítico	Figura	Página
PO03, PO04, PO14, PO18, PO20, PO24 e PO27	57 e 58	114 e 115
PO13, PO16 e PO57	59 e 60	115 e 116
PO12, PO26, PO42, PO46, PO33 e PO51	60 e 61	116 e 117

Figura 57 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM1*



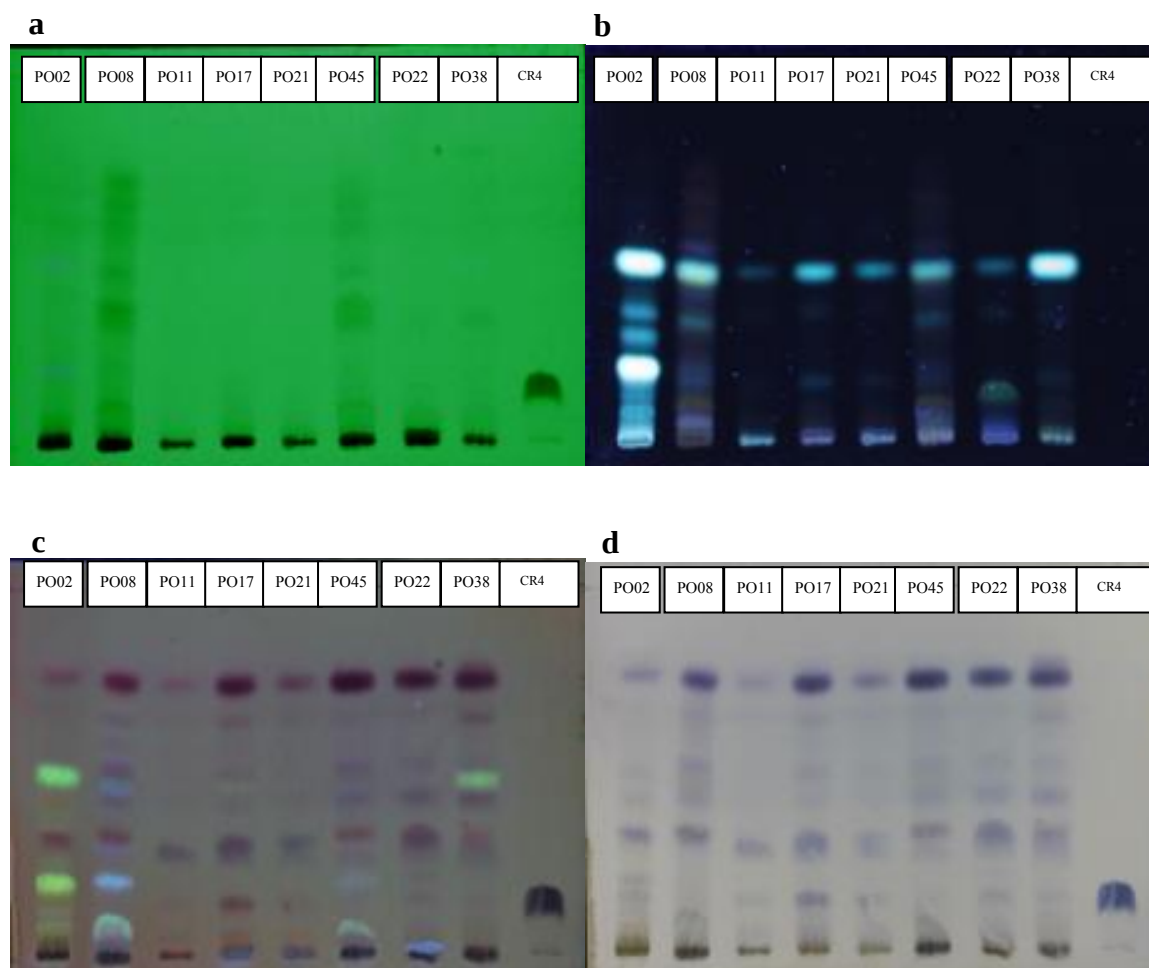
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 58 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM2*



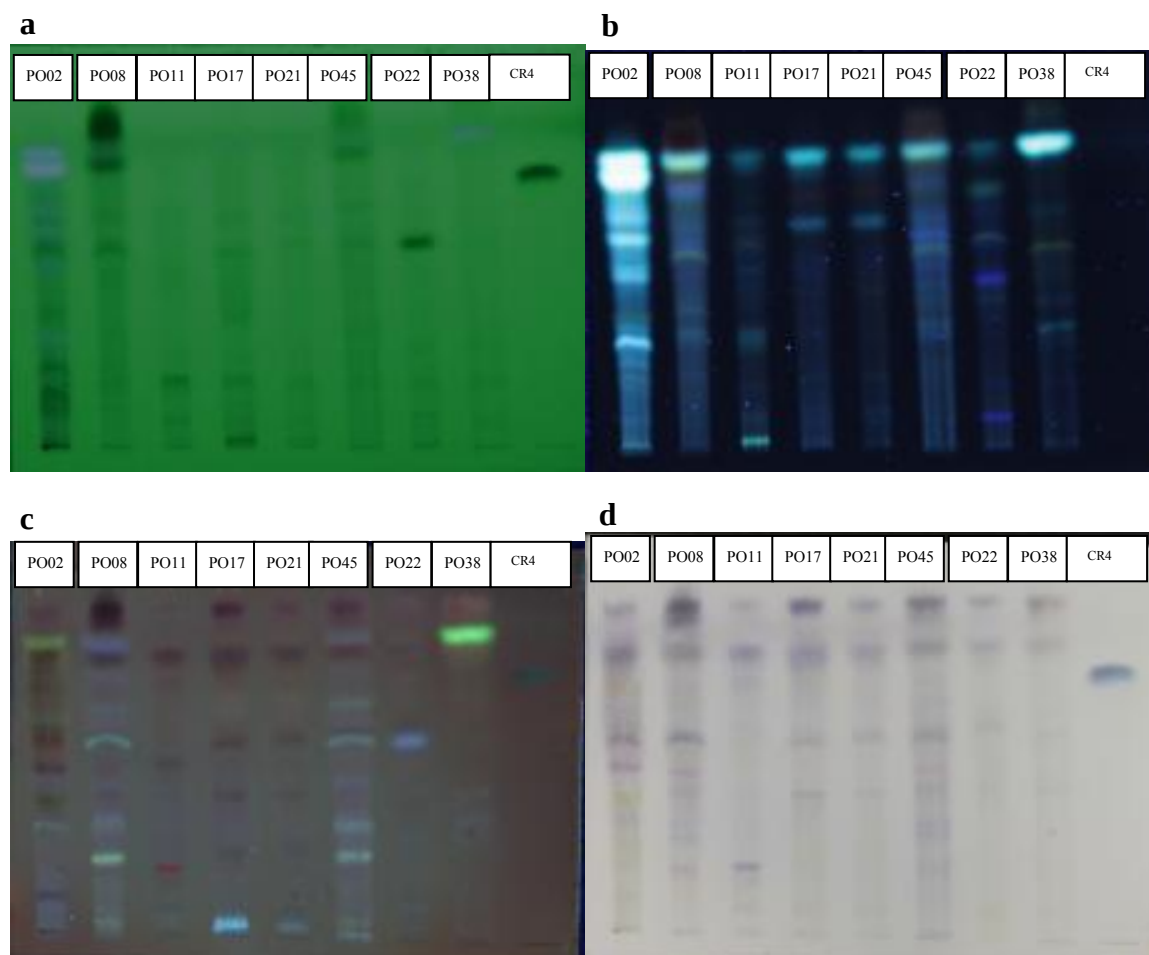
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 59 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM1*



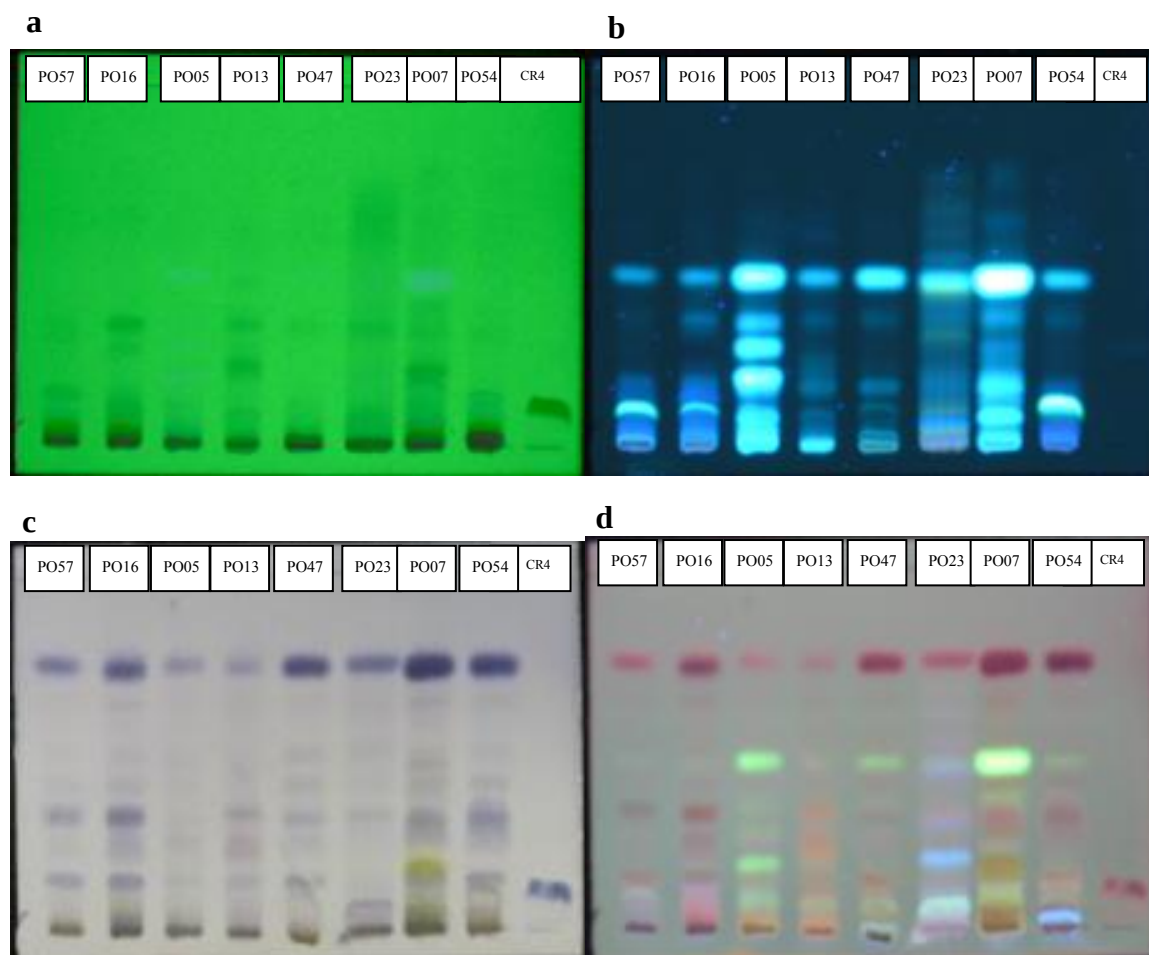
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 60 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM2*



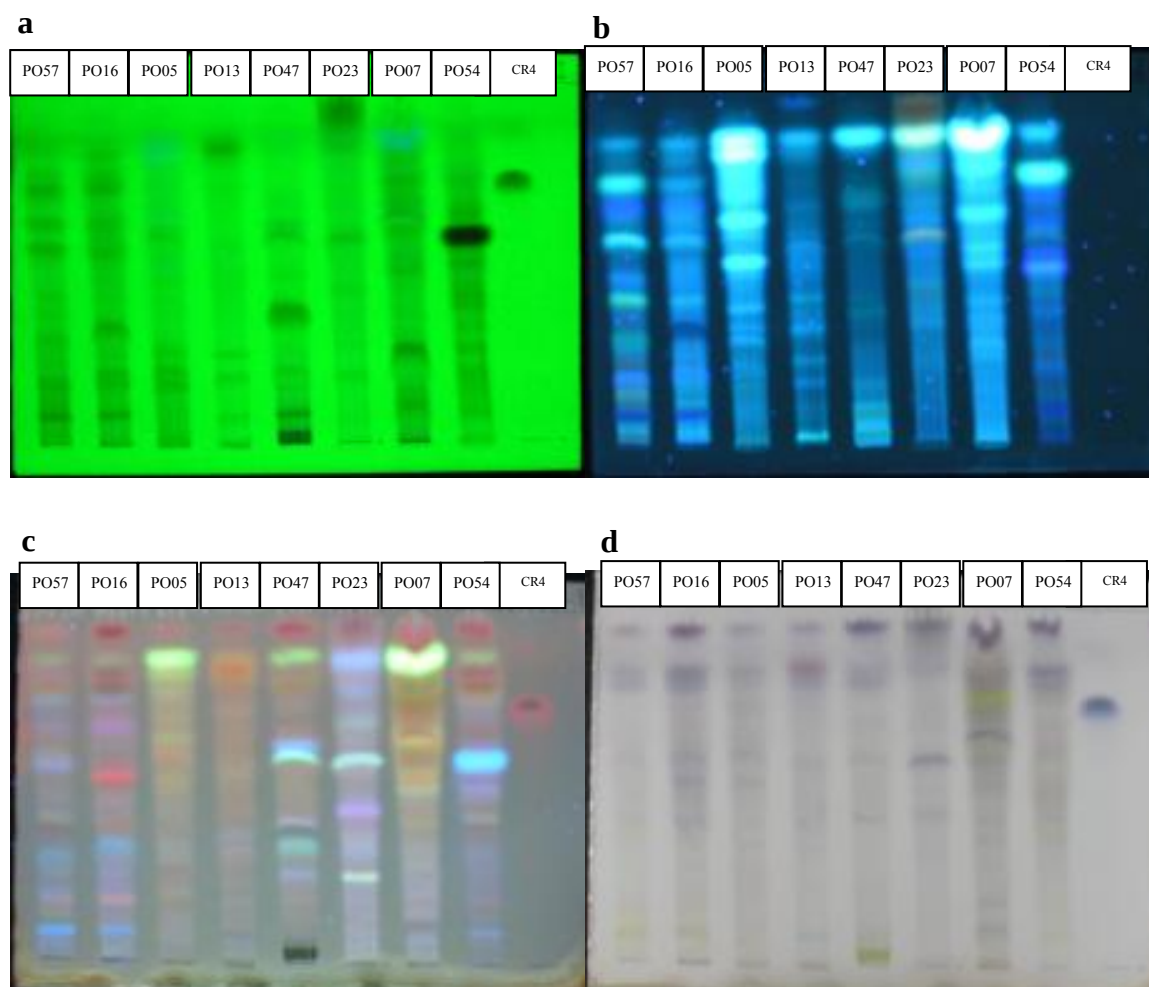
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 61 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM1*



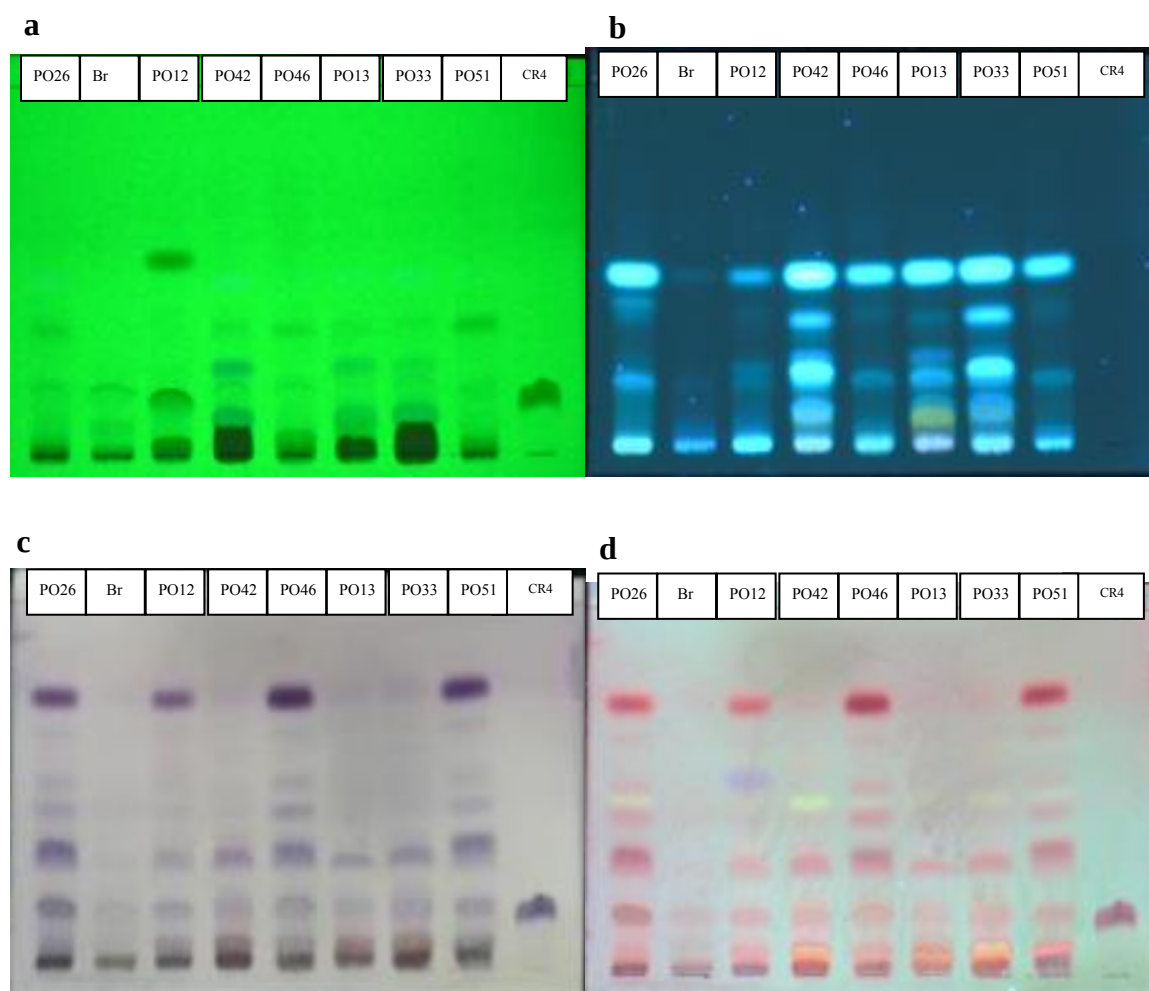
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 62 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM2*



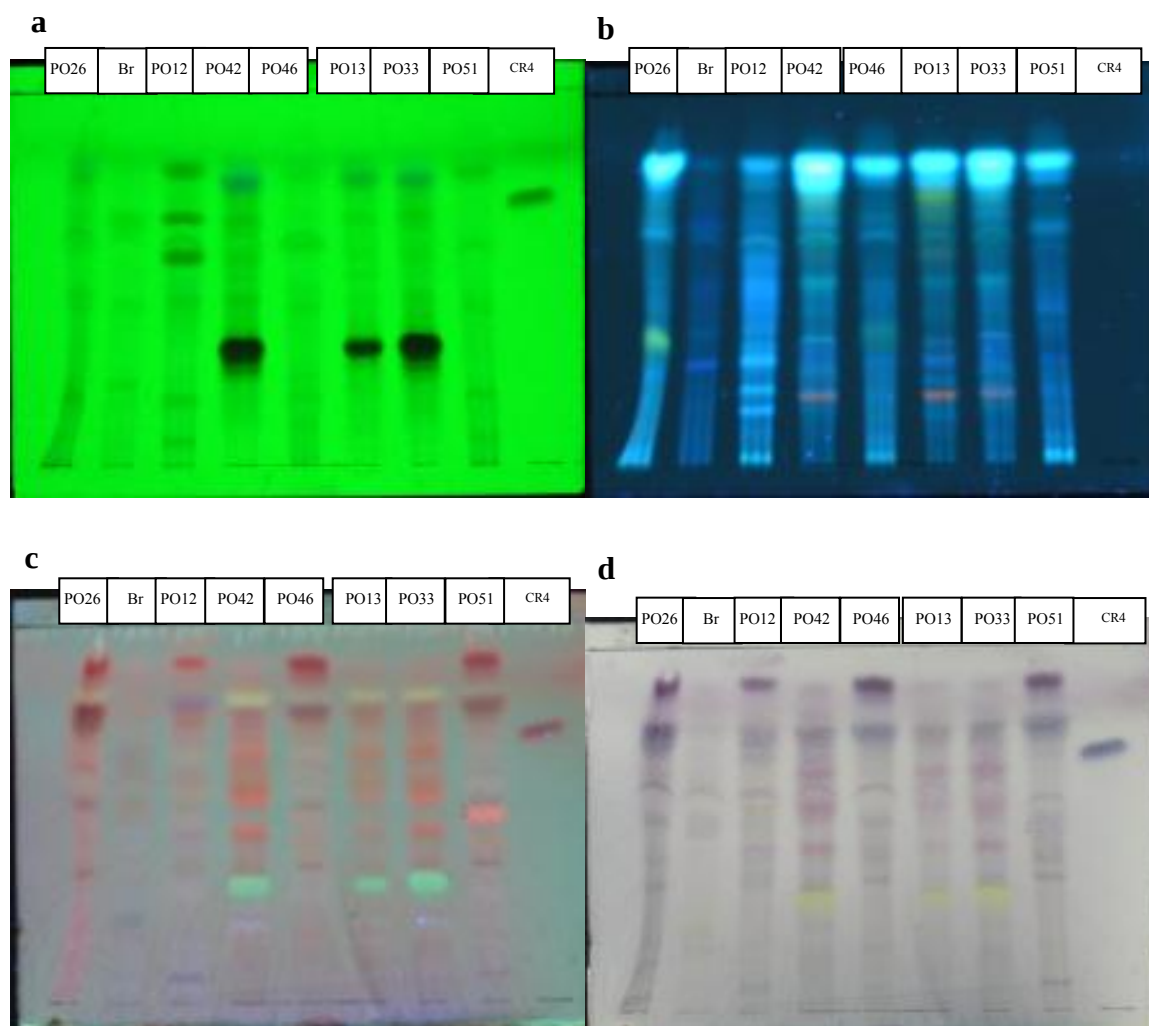
* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 63 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano 4 (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM1*



* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

Figura 64 – Perfil cromatográfico dos fungos endofíticos e cromano **4** (CR4): **a** – 254 nm; **b** – 365 nm; **c** – *para*-anisaldeído (254 nm); **d** – *para*-anisaldeído (365 nm); empregando FM2*



* FM1 e FM2 (item 4.9.4, pág. 73)

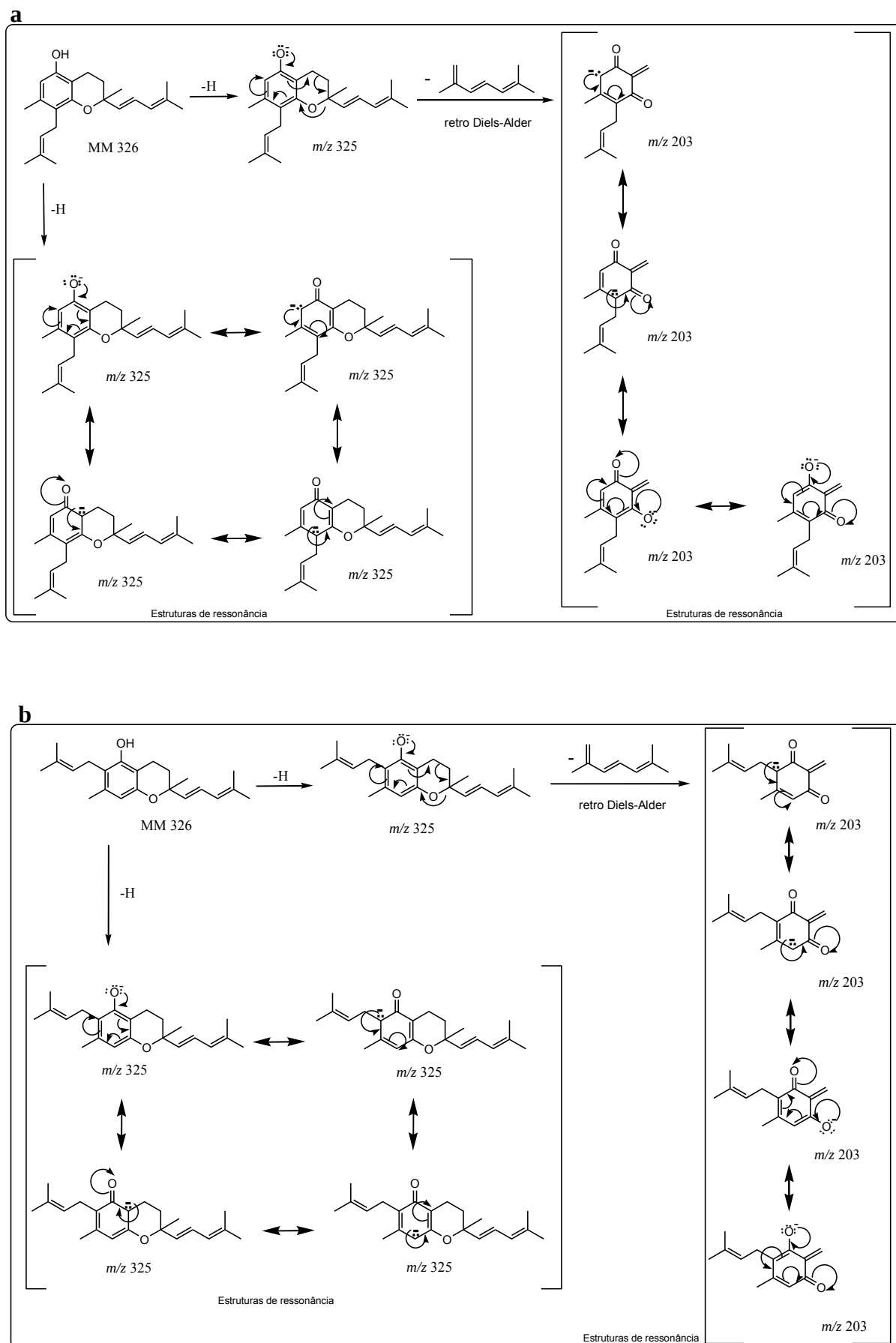
Com intuito de avançar no estudo de triagem dos extratos de fungos endofíticos associados com a espécie de *P. obtusifolia*, com vistas à busca de substâncias que contém o núcleo benzopirano, foi proposto um estudo por espectrometria de massas.

Das fragmentações já descritas para o cromano **4** nos itens 5.2 (pág. 78) e 5.8 (pág. 103), aquelas características do mecanismo tipo retro Diels-Alder no anel oxibenzílico do cromano, eliminação neutra de água e de CO₂ são diagnósticas para este tipo de estrutura (Figuras 27 e 55, págs. 80 e 109). Assim, conhecendo a estrutura química dos cromanos já isolados de folhas e caules de *P. obtusifolia*, cromanos **4**, **5**, **6**, **7** e **8** (Figura 3, pág. 35), e com base nos dados de espectrometria

de massas sequencial obtidos durante os experimentos de investigação da origem biossintética dos cromanos na espécie de *P. obtusifolia*, resultados já demonstrados anteriormente, foram propostas fragmentações para os cromanos **5**, **6**, **7** e **8**, as quais são descritas a seguir.

Em termos de estrutura química a diferença entre o cromano **4** e os cromanos **5** e **6** é devido a ausência da grupo carboxílico em posição meta a hidroxila fenólica (Figura 3, pág. 35). Portanto, para os cromanos **5** e **6** é proposta, inicialmente, a formação da molécula desprotonada com m/z 325 a qual é estabilizada por estruturas de ressonância no anel aromático (Figura 65, pág. 124). A formação da molécula desprotonada é seguida pela fragmentação através do mecanismo do tipo retro Diels-Alder no anel oxibenzílico do cromano, referente à perda de 122 u.m.a., gerando o íon m/z 203 o qual também é estabilizado por deslocalização eletrônica no anel (Figura 65, pág. 124).

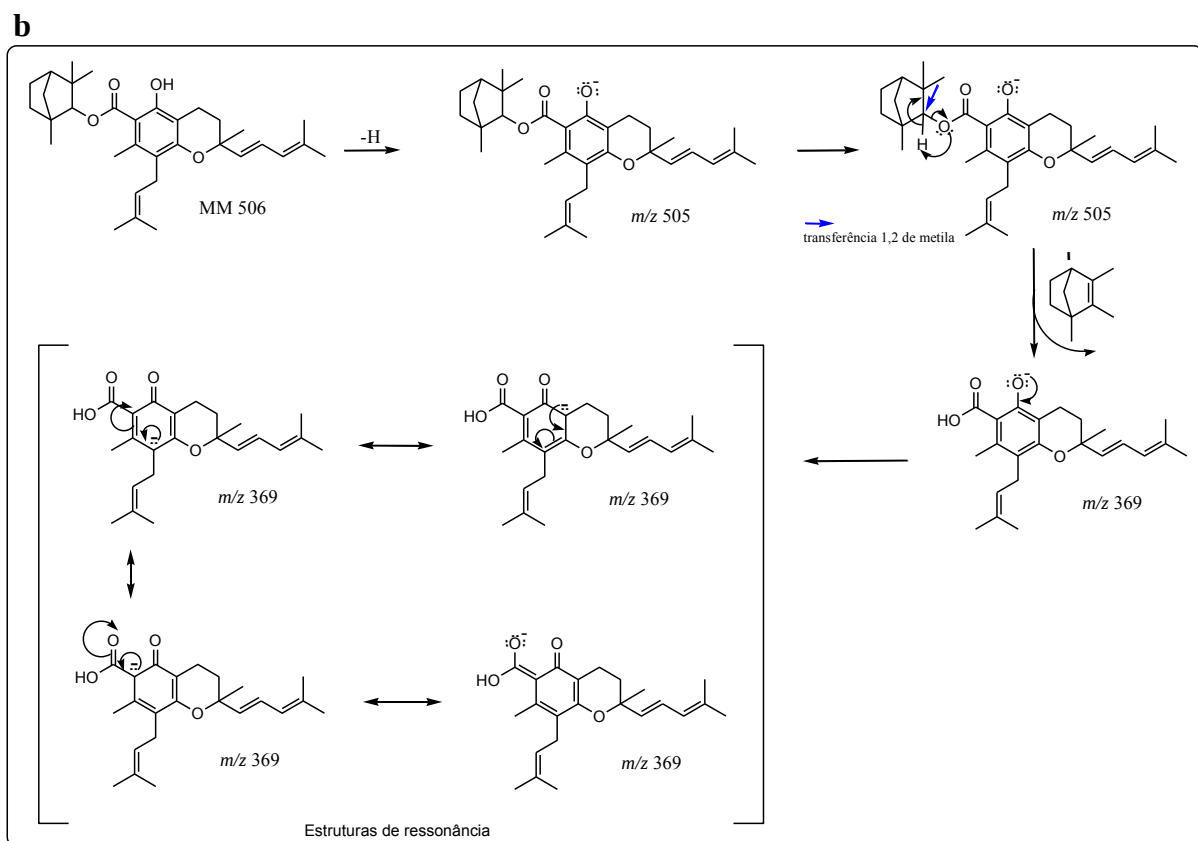
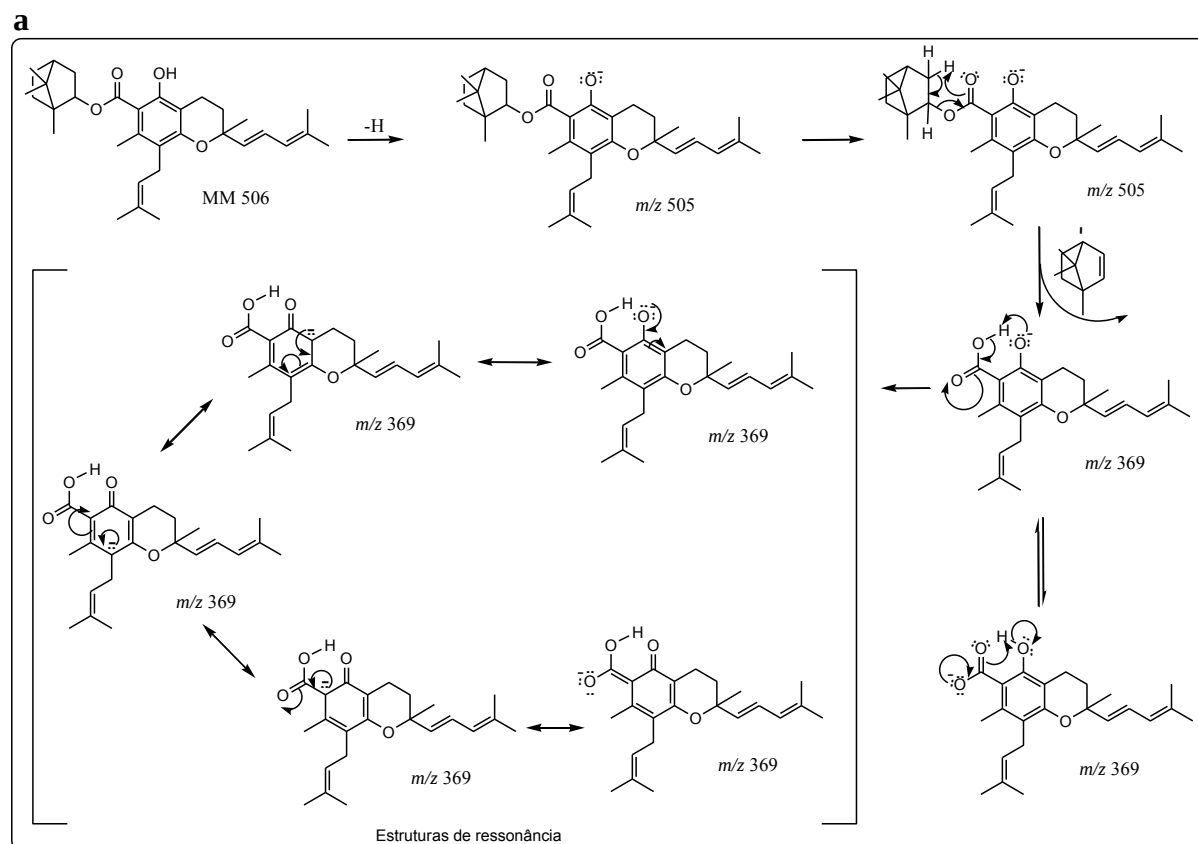
Figura 65 - a - Proposta de fragmentação do cromano **5**; b - proposta de fragmentação do cromano **6**



Paralelamente, a diferença estrutural entre o cromano **4** e os cromanos **7** e **8** encontra-se na substituição do grupo ácido carboxílico por éster no carbono **6** (Figura 3, pág. 35). Dessa maneira, os cromanos **7** e **8** são provenientes de uma etapa de esterificação no grupo ácido carboxílico presente no anel aromático do cromano **4**, no qual ocorre a substituição de uma hidroxila (HO^-) por uma unidade monoterpênica ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}^-$).

Portanto, para os cromanos **7** e **8** são descritas os mecanismos de fragmentação a partir da perda de 136 u.m.a e, consequentemente, formação do íon m/z 369, referente a quebra da unidade monoterpênica (Figuras 66, pág. 125).

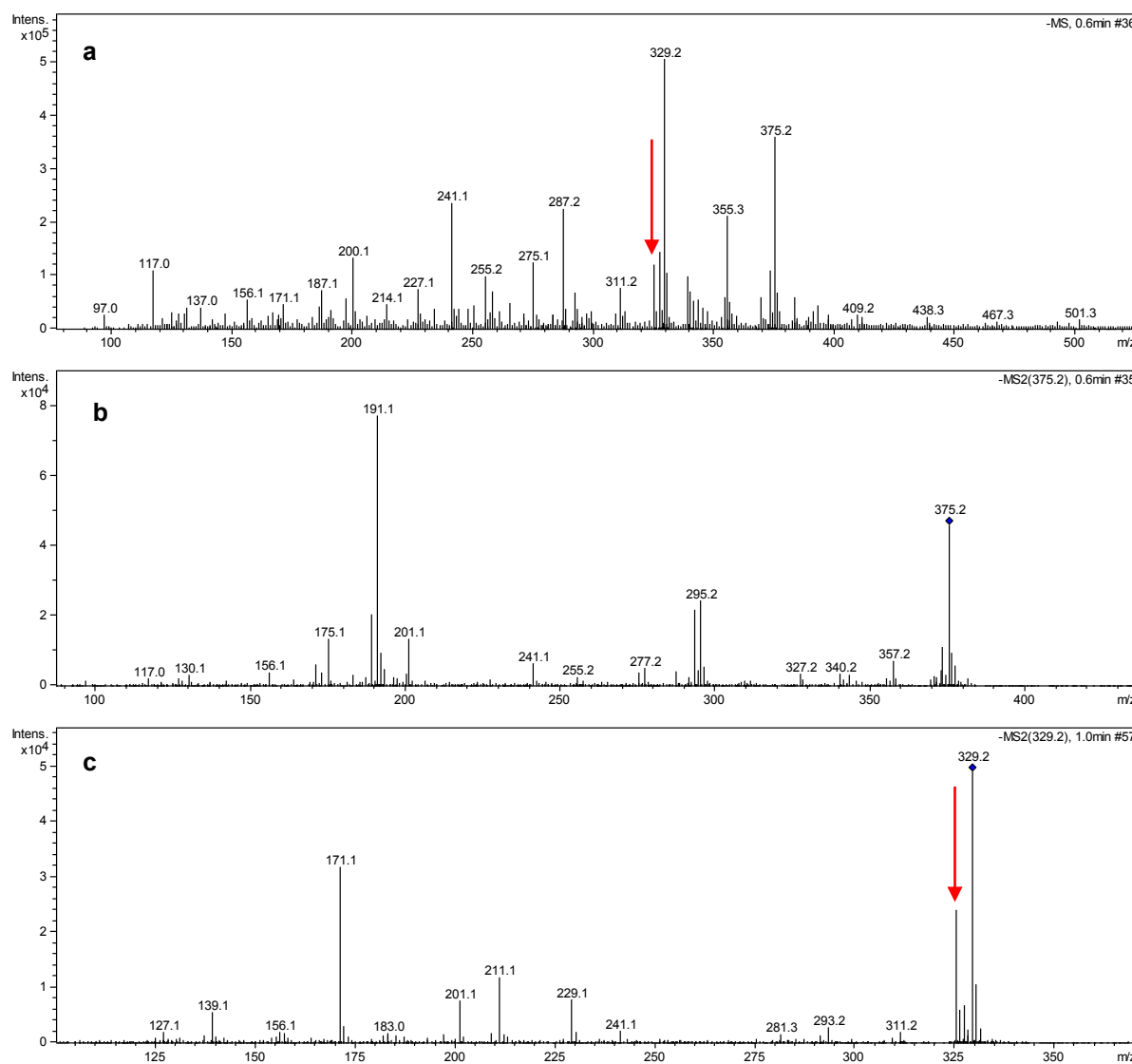
Portanto, para os cromanos **7** e **8** é proposta, inicialmente, a formação da molécula desprotonada com m/z 505 a qual é estabilizada por estruturas de ressonância no anel aromático (Figura 66, pág. 126). A formação da molécula desprotonada é seguida pela eliminação da porção monoterpênica do cromano, com perda de 136 u.m.a., gerando o íon m/z 369 referente à molécula desprotonada do cromano **4**, o qual também é estabilizado por deslocalização eletrônica no anel aromático (Figura 66, pág. 126). É importante ressaltar que as estruturas de ressonância para o íon m/z 505 não são mostradas, mas seguem o perfil daquelas para o íon m/z 369.

Figura 66 - a - Proposta de fragmentação do cromano **7**; **b -** proposta de fragmentação do cromano **8**

Com base nos resultados apresentados pelas análises por CCDC dos extratos dos endófitos isolados de *Peperomia obtusifolia* e nos valores de m/z das moléculas desprotonadas dos cromanos e respectivas fragmentações, os extratos PO14, PO20, PO24, PO42, PO27, PO13, PO26, PO33, PO49 e PO12, cujo perfil metabólico sugere a presença de substâncias que contém o núcleo benzopirano, foram submetidos à análise por espectrometria de massas (IES-EM), operando no modo negativo.

Inicialmente, a amostra Br (branco, referente ao meio de cultivo) foi submetida a análise por IES-EM, com intuito de verificar os principais íons que podem estar presentes no mesmo. O perfil IES-EM apresentado pelo Br demonstra íons com m/z de 375, 355, 329, 287, 241, 200 e 325 (Figura 67, pág. 128), dos quais este último é o mesmo valor de m/z referente ao íon da molécula desprotonada dos cromanos **5** e **6** isolados de *P. obtusifolia* ($[M-H]^-$, figura 65, pág. 124). Com intuito de verificar a origem do íon m/z 325, os dois íons de maior abundância foram fragmentados (m/z de 375 e 329, figura 67b e 67c, pág. 128), no qual aquele com m/z de 329 fornece o íon m/z 325 (Figura 67c, pág. 128). Portanto, no que diz respeito à detecção do íon referente à molécula desprotonada dos cromanos **5** e **6** nos extratos dos fungos endofíticos esta será limitada pela a técnica de IES-EM. No entanto, os demais íons presentes no meio de cultivo dos fungos endofíticos não interferem na análise dos íons referentes às moléculas desprotonadas dos cromanos **4**, **7** e **8**, bem como dos possíveis fragmentos discutidos anteriormente.

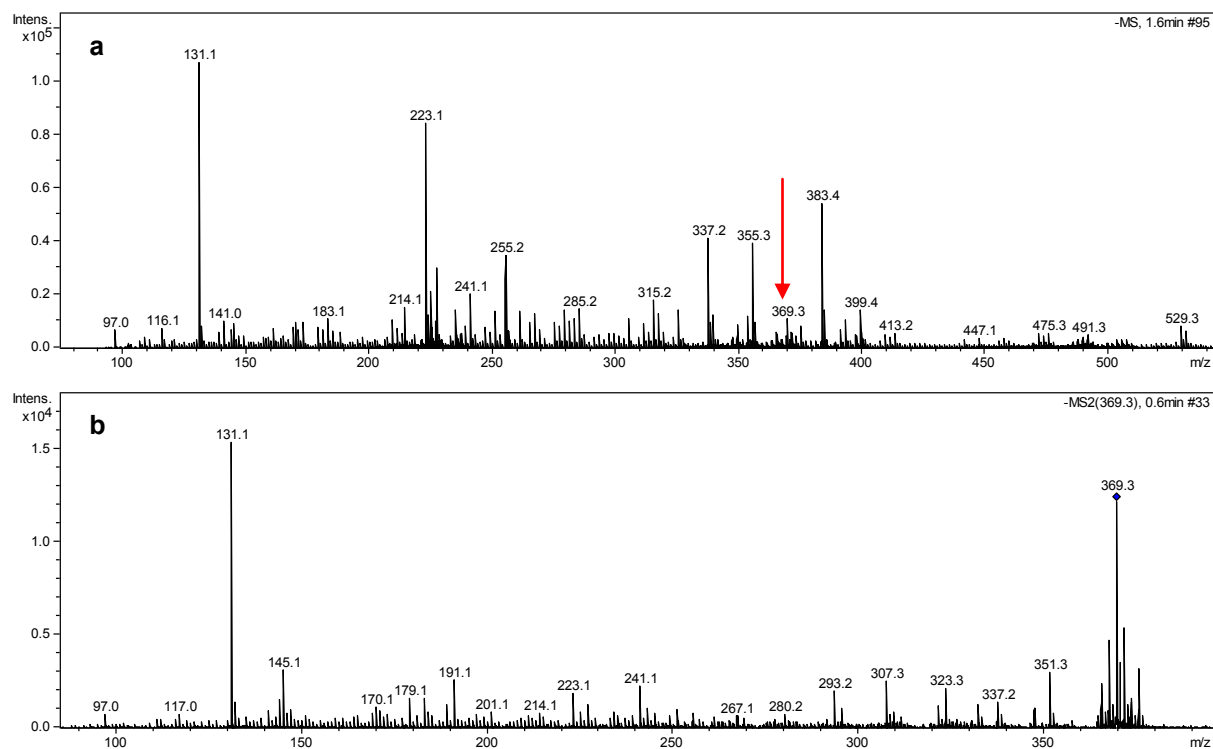
Figura 67 - **a** - IES-EM do branco (meio de cultivo); **b** – IES-EM/EM do íon m/z 375; **c** – IES-EM/EM do íon m/z 329, todos operando em modo negativo



A partir do perfil IES-EM obtido para o extrato AcOEt PO14 é possível destacar os íons com m/z 383, 355, 337, 255, 223, 131 e 369 (Figura 68a, pág. 129). O íon com m/z 369 é característico da molécula do cromano **4** em sua forma desprotonada, a qual também pode ser derivada dos cromanos **7** e **8** após eliminação da porção monoterpênica. No entanto, o perfil IES-EM/EM do íon m/z 369 (Figura 68b, pág. 129) apresentou como íon de maior intensidade aquele com m/z 131, também de maior intensidade no IES-EM. A ausência de íons m/z 505 (molécula desprotonada dos cromanos **7** e **8**) e íons fragmentos com m/z 351, 325, 247, 203 e 187 (fragmentos diagnósticos da molécula desprotonada do cromano **4**)

não permite inferir sobre a presença de substâncias com o núcleo benzopirano na amostra do endófito PO14, tais como os cromanos **4**, **7** ou **8** (Figura 68b, pág. 129).

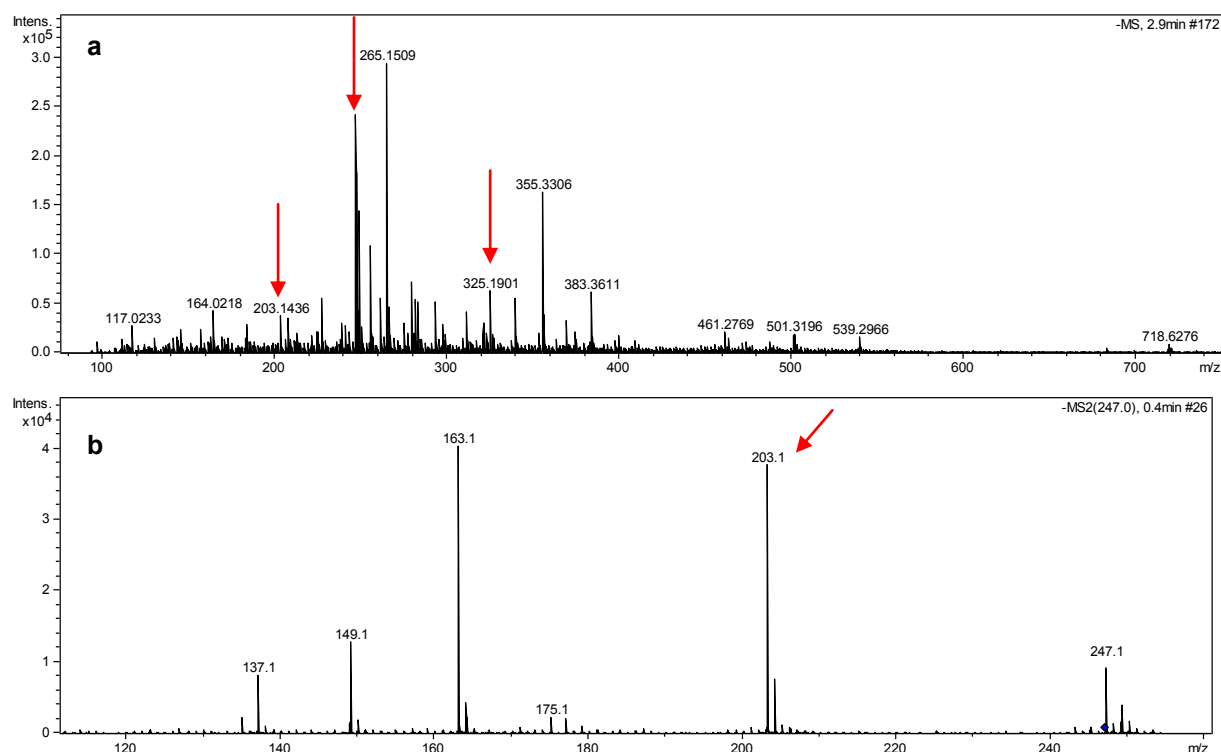
Figura 68 - **a** - IES-EM do extrato AcOEt PO14 de *Peperomia obtusifolia*; **b** – IES-EM/EM do íon m/z 369, todos operando em modo negativo



Analogamente, o perfil IES-EM obtido para o extrato AcOEt PO12 apresenta íons m/z 383, 355, 325, 265, 247 e 203 (Figura 69a, pág. 131). Dentre esses íons, aqueles íons m/z 325, 247 e 203 (Figura 69a, pág. 131) são característicos dos cromanos. Os íons m/z 247 e 203 são diagnósticos do mecanismo retro Diels-Alder no anel oxibenzílico dos cromanos. Além disso, o íon m/z 203 também pode ser originado de uma eliminação neutra de CO_2 . O perfil IES-EM/EM do íon m/z 247 (Figura 69b, pág. 131) apresentou íons com m/z 203, 163, 149 e 137, dos quais o primeiro pode ser referente à substância que apresenta o núcleo benzopirano.

O íon m/z 325 observado no IES-EM é diagnóstico para molécula desprotonada dos cromanos **5** e **6**, podendo sugerir que este esteja presente no metaboloma do endófito PO12, porém, como já discutido anteriormente, o íon m/z 325 também está presente na constituição química do meio de cultivo empregado no desenvolvimento dos fungos em estudo, o que tornar limitante a aplicação da técnica de IES-EM na triagem dos cromanos **5** e **6**. Além disso, a ausência de outros íons característicos permite apenas sugerir que o endófito PO12 pode apresentar em seu metabolismo secundário, classes de substâncias que contém o núcleo benzopirano. Uma investigação do metaboloma através de técnicas hífenadas, tais como CLAE-EM e RMN poderiam fornecer maiores subsídios sobre a constituição química desse fungo endofítico.

Figura 69 - a - IES-EM do extrato AcOEt PO12 de *Peperomia obtusifolia*; **b** - IES-EM/EM do íon m/z 247, operando em modo negativo



Ao analisar o perfil IES-EM obtido para os extratos AcOEt PO20, PO24, PO27, PO26 e PO49 foi possível observar uma similaridade entre eles, visto que os espectros apresentam em comum algum íons de maior intensidade, tais como aqueles com m/z 399, 383, 375, 355, 255 e 223 (Figuras 70-73, págs. 132 e 133), com exceção do endófito PO49 (Figura 78, pág. 133). O qual apresentou íons m/z de 627, 611, 363, 319, 297, 271, 255, 241, 227 e 211. No entanto, a ausência de íons m/z correspondentes aos íons referentes às moléculas desprotonadas dos cromanos e íons fragmentos diagnósticos, tais como aqueles m/z 505, 369, 351, 325, 247, 203 e 187 novamente não permite inferir sobre a presença de substâncias que apresentam em sua estrutura o núcleo benzopirano na constituição química desses fungos endofíticos.

Figura 70 - IES-EM do extrato AcOEt PO20 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

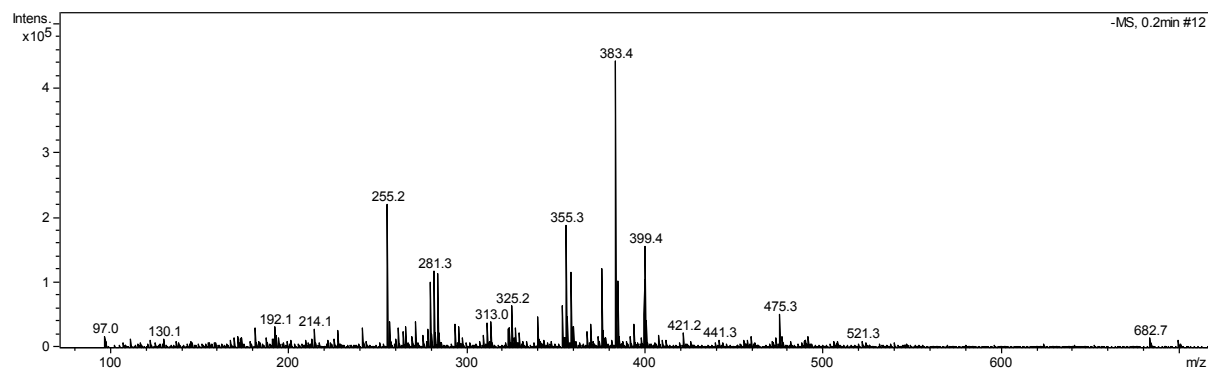


Figura 71 - IES-EM do extrato AcOEt PO24 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

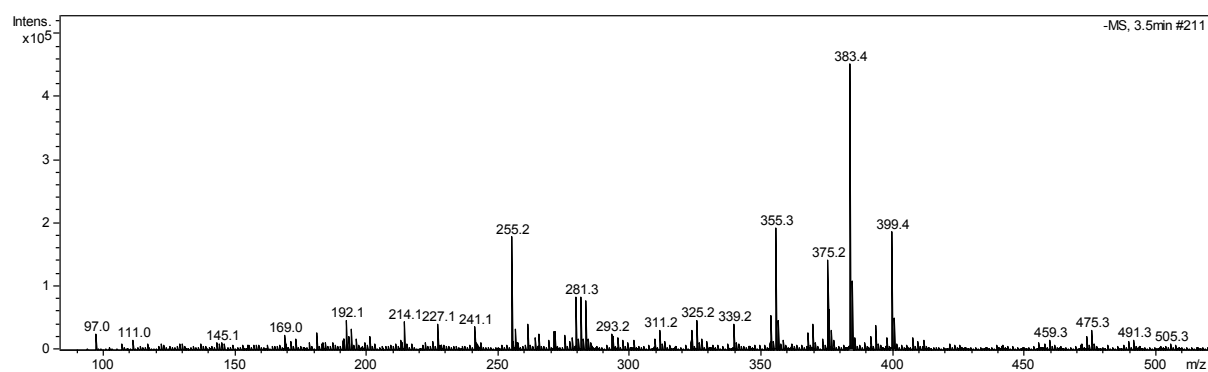


Figura 72 - IES-EM do extrato AcOEt PO27 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

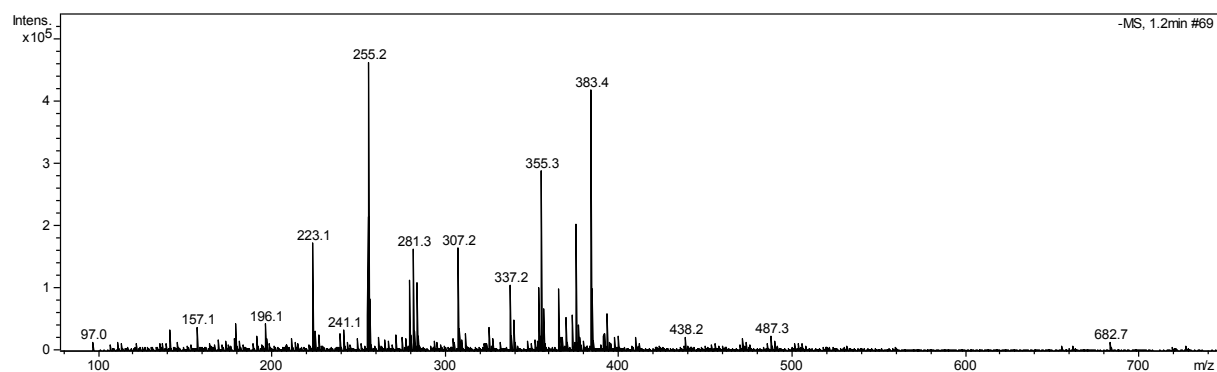
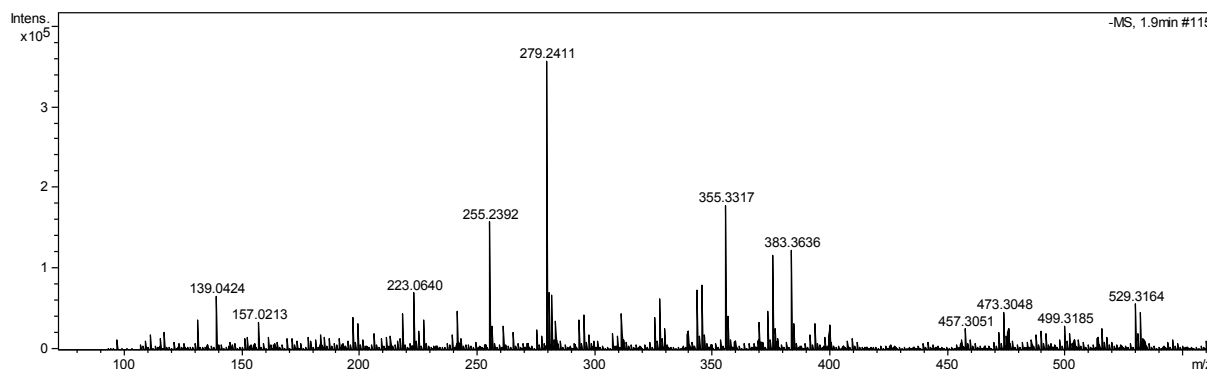
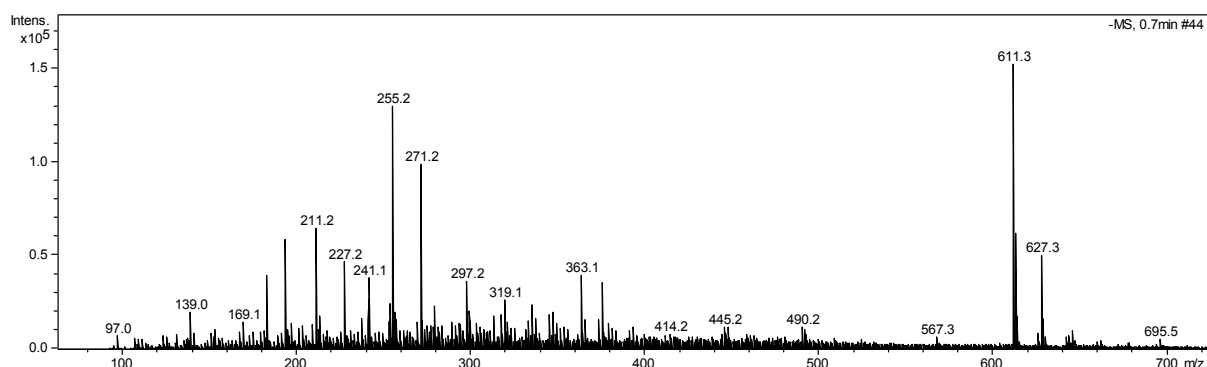


Figura 73 - IES-EM do extrato AcOEt PO26 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo**Figura 74** - IES-EM do extrato AcOEt PO49 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

Paralelamente, o perfil IES-EM obtido para os extratos AcOEt PO42, PO33 e PO13 são característicos de fungos endofíticos no qual o fragmentograma apresentou uma menor complexidade quando comparado aos outros fungos (Figuras 75-77, pág. 134). Além disso, os endófitos PO42 e PO33 foram caracterizados pela similaridade apresentada entre eles, visto que os fragmentogramas têm em comum íons com m/z 847, 628, 612, 415, 196 e 139 (Figuras 75 e 76, pág. 134). Enquanto os íons observados no fragmentograma do endófito PO13 apresentaram m/z 363, 355, 331, 287 e 255 (Figura 77, pág. 134). Mas, da mesma maneira que os endófitos anteriores, a ausência de íons com m/z correspondentes as moléculas desprotonadas dos cromanos e íons de fragmentos diagnósticos, tais como: m/z 505, 369, 351, 325, 247, 203 e 187 não permite inferir

sobre a presença de substâncias com o núcleo benzopirano nas amostras dos fungos endofíticos estudados até o momento.

Figura 75 – IES-EM do extrato AcOEt PO42 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

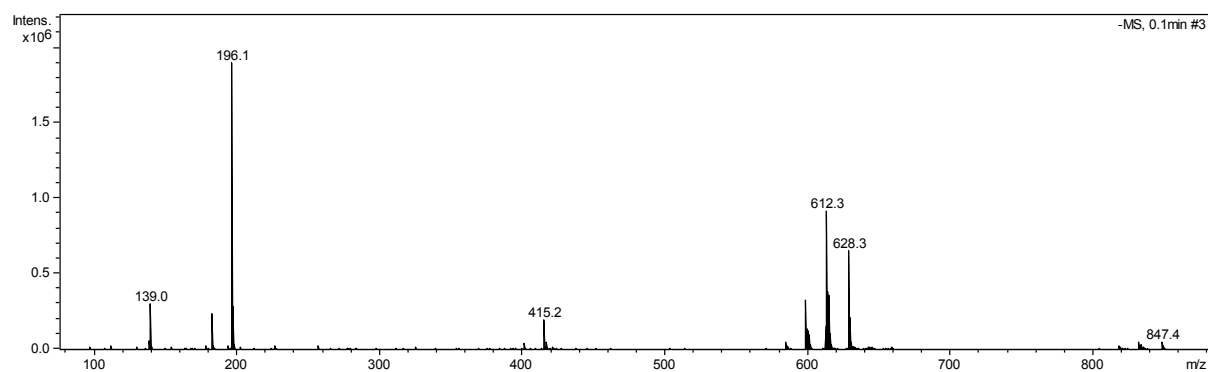


Figura 76 – IES-EM do extrato AcOEt PO33 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo

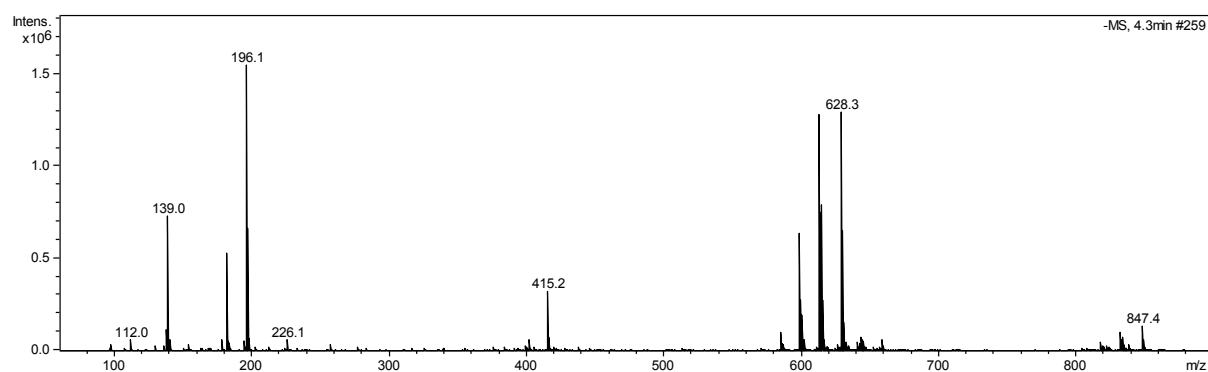
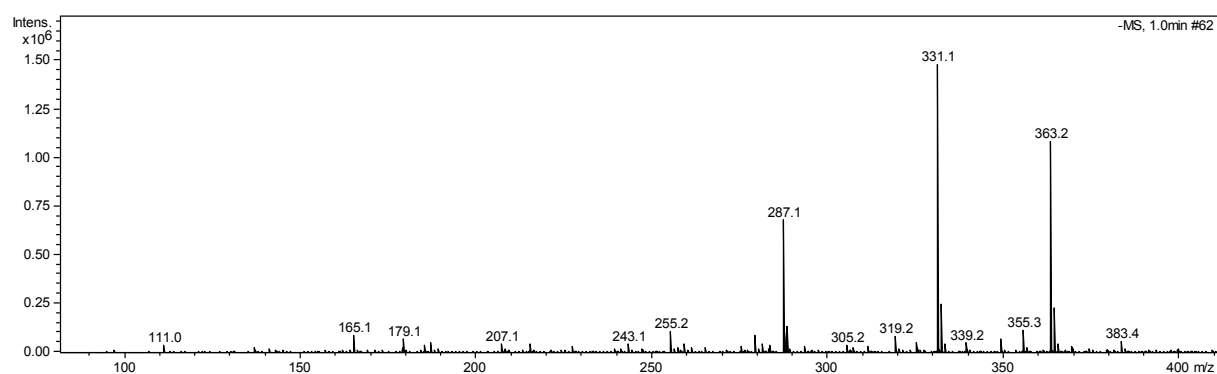


Figura 77 – IES-EM do extrato AcOEt PO13 de *Peperomia obtusifolia*, operando em modo negativo



Esse estudo de avaliação da presença de cromanos e/ou cromenos na constituição química de fungos endofíticos associados à espécie de *Peperomia obtusifolia* não permite afirmar sobre a presença no metaboloma dos mesmos. Mas, abre perspectivas interessantes, tais como os endófitos PO14 e PO12. Além disso, nesse primeiro momento é importante ressaltar que para o estudo dos 36 fungos endofíticos isolados de *P. obtusifolia* foram empregadas apenas às técnicas de CCDD e IES-EM, bem como os fungos endofíticos isolados de *P. obtusifolia* foram desenvolvidos em apenas um meio de cultivo. Portanto, o estudo metabolômico dos fungos endofíticos deverão ser ampliados por meio de técnicas hífenadas, tais como CLAE-DAD-EM e RMN, com vistas à determinação de cromanos e/ou cromenos na constituição metabólica dos endófitos. No mais, a disponibilidade de alguns fungos endofíticos importante, como por exemplo, o PO14 e PO12 podem fornecer informações intrínsecas a respeito da relação biossintética de cromanos e cromenos no gênero *P. obtusifolia*, tanto em folhas e caules como também nos micro-organismos associados com a mesma.

6 CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido demonstra a habilidade de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*, pertencentes a uma mesma família, Piperaceae, biossintetizar uma classe de metabólitos secundários ancorada em processos bioquímicos diferenciados, cujos blocos construtores (precursores) demonstram dinamismo não somente quanto à diversidade química gerada, cujo conhecimento e interpretação do papel de cada metabólito dependem da habilidade do químico em detectar, analisar, expor suas estruturas químicas e entender os mecanismos de formação biossintéticos, mas também quanto à dinâmica metabólica no interior de cada tecido da planta e, mais particularmente, de sua interação ou não com sistemas heterólogos. Os estudos químicos desenvolvidos confirmaram a diversidade química das duas espécies em estudo, *P. aduncum* e *P. obtusifolia*, sendo que as substâncias isoladas foram utilizadas como padrões nos estudos biossintéticos e/ou de dinâmica metabólica. Os estudos químicos foram alicerçados por técnicas espectrométricas, como a espectrometria de massas, cujas análises subsidiaram alguns estudos dinâmicos relacionados à interação da planta (*P. obtusifolia*) com sua população endofítica. Os estudos biossintéticos de *P. obtusifolia* foram baseados em experimentos prévios desenvolvidos pelo grupo com o objetivo de determinar a atividade da enzima prenilttransferase e a dinâmica metabólica dessa enzima para a formação de cromenos em *P. aduncum*. Esse estudo foi planejado, uma vez que experimentos iniciais realizados com folhas de *P. aduncum*, coletadas de forma aleatória não demonstraram a atuação da prenilttransferase e consequente formação dos cromenos. Em estudos anteriores coletas regulares durante vinte e quatro horas com posterior extração e determinação da atividade da enzima demonstrou seu máximo de atividade coincidente com o máximo da produção dos cromenos no início da manhã com forte queda após as 09h00, mostrando um ritmo diurno do tipo sigmoidal como postulado por trabalhos teóricos. Os mesmos experimentos foram realizados com as folhas de *P. obtusifolia* de forma a avaliar a biossíntese dos cromanos que mostram acúmulo na espécie mostraram resultados que indicam uma sinalização metabólica quanto à atividade das prenilttransferases, diferenciada e absolutamente aleatória. A análise dos extratos enzimáticos de *P. aduncum* e *P. obtusifolia* por gel de eletroforese – SDS-PAGE (1D) complementam os resultados dos estudos dos aspectos mecanísticos e

revelaram concentrações proteicas diferenciadas em relação as duas espécies. As bandas eletroforéticas atribuídas as prenilttransferases indicaram maior concentração em *P. aduncum*, indicando efetiva participação da mesma no metabolismo secundário da espécie e aparente dormência metabólica em *P. obtusifolia*. Experimentos de administração *in vivo* e em *in vitro* do possível precursor da unidade aromática dos cromanos de *P. obtusifolia*, acetato de sódio, marcado com isótopos estáveis, não demonstraram sua incorporação nos cromanos, indicando que a(s) enzima(s) poliketídeo sintase(s) (PKS) também poderia(m) não estar ativas na espécie. Esses resultados inspiraram buscar alternativas que responderiam as principais questões e que poderiam a luz de alguns experimentos entender se haveria ou não a possibilidade de haver uma possível interação mais complexa da planta com seu ambiente, mais precisamente sua população endofítica. A colaboração com o grupo da Prof^a Silvia Noelí López da Universidad Nacional de Rosario, Argentina, abriu essas novas perspectivas, uma vez que a Prof^a Silvia N. López estabeleceu protocolo para a obtenção de culturas dos endófitos das folhas de *P. obtusifolia* e a oportunidade de avaliar os processos químicos que levam a diversidade estrutural dessa possível rica associação mostrou que os fungos podem estar biossintetizando cromanos/cromenos por uma rota biossintética diversificada e muito mais condizente com a rota metabólica de unidades aromáticas em fungos e/ou bactérias, comumente relacionada à via do acetato, e assim abrir novas possibilidades para compreender melhor essas inter-relações heterólogas e, conseqüentemente, melhor compreender a natureza.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 23 ago. 2013.
- ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 5, p. 637-639, 1998.
- ARRIGON-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2/3, p. 215-218, 2004.
- ASHWOOD, V. A.; BUCKINGHAM, R. E.; CASSIDY, F.; EVANS, J. M.; FARUK, E. A.; HAMILTON, T. C.; NASH, D. J.; STEMP, G.; WILLCOCKS, K. Synthesis and antihypertensive activity of l-(cyclic amido)-2H-1-benzopyrans. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2194-2201, 1986.
- ATWAL, K. S.; GROVER, G. J.; AHMED, S. Z.; SLEPH, P. G.; DZWONCZYK, S.; BAIRD, A. J.; NORMANDIN, D. E. Cardiosselective anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel openers. 3. Structure-activity studies on benzopyranyl cyanoguanidines; modification of the cyanoguanidine portion. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 17, p. 3236-3245, 1995.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 45, p. 6051-6054, 2012.
- 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 chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.
- BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 19, p. 2402-2407, 2010.

BATISTA JUNIOR, J. M.; LÓPEZ, S. N.; MOTA, J. S.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and absolute configuration assignment of a natural racemic chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality**, v. 21, n. 9, p. 799-801, 2009.

BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2603-2612, 2011a.

BATISTA JUNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Product**, v. 74, n. 5, p. 1154-1160, 2011b.

BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origin of the isoprene units of 4-nerolidylcathecol in *Pothomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1406-1409, 2005.

BONACORSO, H. G.; NAVARINI, J.; WIETHAN, C. W.; JUNGES, A. F.; CAVINATTO, S.; ANDRIGHETTO, R.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N. Efficient entry to trifluoromethyl substituted chromanes from oxidative aromatization of tetrahydro-2*H*-chromen-5(6*H*)-ones using iodine/alcohol conventional and microwave methods. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 142, p. 90-95, 2012.

BURKE, S. J.; JACOBS, H.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Structural and spectral assignment by 2D NMR of a new prenylated benzopyrancarboxylic acid and structural reassessment of a related compound. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 145-146, 2003.

CHENG, M.; LEE, S.; CHANG, Y.; WU, S.; TSAI, I.; JAVAPRAKASAM, B.; CHEN, I. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, 2003.

CHO, H.; KATOH, S.; SAYAMA, S.; MURAKAMI, K.; NAKANISHI, H.; KAJIMOTO, Y.; UENO, H.; KAWASAKI, H.; AISAKA, K.; UCHIDA, I. Synthesis and selective coronary vasodilatory activity of 3,4-dihydro-2,2-bis(methoxymethyl)-2*H*-1-benzopyran-3-ol derivatives: novel potassium channel openers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 19, p. 3797-3805, 1996.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.

DODSON, C. D.; DYER, L. A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D. K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 51-54, 2000.

FELIPPE, L. G.; BATISTA JUNIOR, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 245-249, 2011.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **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.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 21, p. 4208-4214, 2012.

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621-627, 2009.

FONDOM, N. Y.; CASTRO-NAVA, S.; HUERTA, A. J. Seasonal variation in photosynthesis and diel carbon balance under natural conditions in two *Peperomia* species that differ with respect to leaf anatomy. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 136, n. 1, p. 57-69, 2009.

GADWOOD, R. C.; KAMDAR, B. V.; DUBRAY, L. A. C.; WOLFE, M. L.; SMITH, M. P.; WATT, W.; MIZSAK, S. A.; GROPP, V. E. Synthesis and biological activity of spirocyclic benzopyran imidazolone potassium channel openers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 1480-1487, 1993.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.

KHOABI, M.; MA'MANI, L.; REZAZADEH, F.; ZAREIE, Z.; FOROUMADI, A.; RAMAZANI, A.; SHAFIEE, A. One-pot synthesis of 4*H*-benzo[b]pyrans and dihydropyrano[c]chromenes using inorganic-organic hybrid magnetic monocatalyst in water. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 359, p. 74-80, 2012.

KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2398-2402, 2006.

KOYAMA, H.; BOUERES, J. K.; MILLER, D. J.; BERGER, J. P.; MacNAUL, K. L.; WANG, P.-R.; IPPOLITO, M. C.; WRIGHT, S. D.; AGRAWAL, A. K.; MOLLER, D. E. (2*R*)-2-Methylchromane-2-carboxylic acids: discovery of selective PPAR α agonists as hypolipidemic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 14, p. 3347-3351, 2005.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.

LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 153-156, 2005.

LAGO, J. H. G.; CHEN, A.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; OLIVEIRA, A.; KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96-98, 2009.

LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIN, 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.

LEITE, A. C.; LOPES, A. A.; KATO, M. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origin of the isoprene units in chromenes of *Piper aduncum* (Piperaceae). **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1500-1503, 2007.

LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C. M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A. L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, n. 3, p. 253-263, 1998.

LIN, Y.; SUN, X.; YUAN, Q.; YAN, Y. Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria. **Metabolic Engineering**, v. 18, p. 69-77, 2013.

LIPINSKI, C. A.; ALDINGER, C. E.; BEYER, T. A.; BORDNER, J.; BURDI, D. F.; BUSSOLOTI, D. L.; INSKEEP, P. B.; SIEGEL, T. W. Hydantion bioisosteres. *In vivo* active spiro hydroxyl acetic acid aldose reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 2169-2177, 1992.

LIU, H-W.; BEGLEY, T. Natural product biosynthesis - a renaissance. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 4, p. 529-531, 2013.

LOPES, A. A. **Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper gaudichaudianum* e *Piper crassinervium* (Piperaceae)**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2053-2058, 2007.

LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JUNIOR, 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 Product Research**, v. 22, n. 12, p. 1040-1046, 2008.

LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA JUNIOR, J. M.; FLAUSINO JUNIOR, O.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, 2010.

MA, T.; LIU, L.; XUE, H.; LI, L.; HAN, C.; WANG, L.; CHEN, Z.; LIU, G. Chemical library and structure-activity relationships of 11-demethyl-12-oxo calanolide A analogues as anti-HIV-1 agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1432-1446, 2008.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

MORANDIM, A. A. **Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**. 2004. 192 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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-GIANNETTI, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; OLIVEIRA, H. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814, 2010.

MORI, J.; IWASHIMA, M.; TAKEUCHI, M.; SAITO, H. A synthetic study on antiviral and antioxidative chromene derivative. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 391-396, 2006.

MOSTACERO, N. R.; CASTELLI, M. V.; BATISTA JUNIOR, J. M.; SALAZAR, M. O.; FURLAN, R. L. E.; FURLAN, M.; FULGUEIRA, C. L.; LÓPEZ, S. N. Antimicrobial potencial of metabolites from *Peperomia obtusifolia* and its endophytic fungus *Phomopsis* sp. In: SÃO PAULO ADVANCED SCHOOL ON BIOORGANIC CHEMISTRY, 2nd, 2013, Araraquara. **Proceeding...** São Paulo: UNESP, 2013. Disponível em: <http://www.bioorgchemespcq.iq.unesp.br/member_applications/posters_blog>. Acesso em: 10 jul. 2013.

MOTA, J. S. **Estudo químico e biológico das espécies de *Peperomia obtusifolia* e *Peperomia trineura* (Piperaceae)**. 2007. 230 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2011.

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, n. 6, p. 620-623, 2009.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.

NAZARIAN, Z.; EMAMI, S.; HEYDARI, S.; ARDESTANI, S. K.; NAKHJIRI, M.; POORRAJAB, F.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Novel antileishmanial chalconoids: synthesis and biological activity of 1- or 3-(6-chloro-2*H*-chromen-3-yl)propen-1-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1424-1429, 2010.

NICOLAOU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H. J. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. **Journal of the American Society**, v. 122, n. 41, p. 9939-9953, 2000.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.

PARMAR, V. S.; SHARMA, N. K.; HUSAIN, M.; WATTERSON, A. C.; KUMAR, J.; SAMUELSON, L. A.; CHOLLI, A. L.; PRASAD, A. K.; KUMAR, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JHA, A.; SINGH, I.; HIMANSHU; VATS, A.; SHAKIL, N. A.; TRIKHA, S.; MUKHERJEE, S.; SHARMA, S. K.; SINGH, S. K.; KUMAR, A.; JHA, H. N.; OLSEN, C. E.; STOVE, C. P.; BRACKEF, M. E.; MAREEL, M. M. Synthesis, characterization and *in vitro* anti-invasive activity screening of polyphenolic and heterocyclic compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 913-929, 2003.

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, n. 3, p. 280-282, 2011.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; SIQUEIRA, J. R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J. Radical scavenging capacity of *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 900-903, 2008.

ROHMER, M. Methylerythritol phosphate pathway. In: BARTON, S. D.; NAKANISHI, K. (Ed.). **Comprehensive natural products II: polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 1, cap. 14, p. 517-555.

SABRY, N. M.; MOHAMED, H. M.; KHATTAB, E. S. A. E. H.; MOTLAQ, S. S.; EL-AGRODY, A. M. Synthesis of 4*H*-chromene, coumarin, 12*H*-chromeno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives and some of their antimicrobial and cytotoxicity activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 765-772, 2011.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin in *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 5, p. 573-579, 2005.

SAMAIN, M-S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRÍGUEZ, F. J.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 677-688, 2010.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; REYES-TREJO, B.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P.; RODRÍGUEZ-SILVEIRO, J.; CASTILLO-HENKEL, C.; CERVANTES-CUEVAS, H.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 66-71, 2010.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

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

STOSCHECK, C. M. General methods for handling proteins and enzymes: quantitation of protein. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I. (Ed.). **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, cap. 6, p. 50-68.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 229-232, 1998.

TANG, Y.; WEI, J.; ZHONG, W.; LIU, X. Synthesis and characterization of chroman-containing compounds and their preliminary assessment of cytotoxicity toward two human cancer cell lines. **Heteroatom Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 423-429, 2010.

TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S. Endophytes – mines of pharmacological therapeutics. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 5, p. 127-149, 2011.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M.; 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, n. 2, p. 477-497, 2007.