

LIDIANE GASPARETO FELIPPE

Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae):
abordagem de aspectos estruturais, metabólicos e biossintéticos.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan
Coorientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues
Nascimento

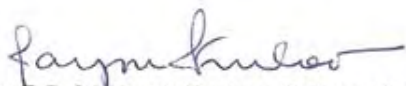
ARARAQUARA, 2013

LIDIANE GASPARETO FELIPPE

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

Araraquara, 15 de fevereiro de 2013.

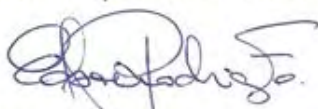
BANCA EXAMINADORA



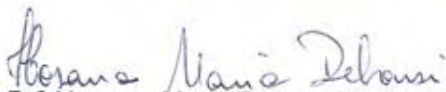
Profª Drª Maysa Furlan (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos



Profª Drª Hosana Maria Deboni
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Lidiane Gaspareto Felipe
Filiação: Cladecir Gaspareto e Isabel Cristina Gaspareto
Nascimento: 06/10/1981
Naturalidade: Araraquara, SP
Nacionalidade: Brasileira
Estado Civil: Casada
Endereço: Rua dos Bombeiros, 55 - Jardim Tabapuã - Araraquara
14810-300, SP - Brasil
Telefone: (16) 3339-4933
E-mail: lidiane_iq@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

Curso: Licenciatura em Química.
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil.
Período: Março de 2001 a Dezembro de 2005.

Pós-Graduação

Curso: Doutorado em Química.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil.
Título: Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): abordagem de
aspectos estruturais, metabólicos e biossintéticos.
Financiamento: FAPESP
Orientadora: Maysa Furlan
Período: Setembro de 2008 – Atual

Curso: Estágio de Doutorando no Exterior – FP-7 - ChemBioFight “Exploring
the Chemical Biodiversity with Innovative Approaches to Fight Chagas Disease
and Leishmaniasis”
Instituição: National and Kapodistrian University of Athens - Greece.
Área de Concentração: Química Orgânica
Financiamento: FP-7, Grant Agreement No 269301
Orientador: Alexios Leandros Skaltsounis
Período: Setembro a Outubro de 2012.

Curso: Mestrado em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

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

Título: Estudo metabolômico e proteômico em *Peperomia blanda* (Piperaceae).

Financiamento: FAPESP

Orientadora: Maysa Furlan

Período: Março de 2006 – Maio 2008

Estágios

Estágio de Iniciação Científica

Área de Concentração: Química Orgânica

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

Projeto: Estudo químico de *Peperomia blanda* (Piperaceae).

Orientadora: Maysa Furlan

Período: Janeiro de 2005 a Dezembro de 2005

Estágio de Iniciação Tecnológica Industrial

Área de Concentração: Química Orgânica

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

Projeto: Viabilização de *Calycophyllum spruceanum* como cosmético funcional.

Financiamento: Natura

Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani

Período: Janeiro de 2004 a Janeiro de 2005

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

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

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

Trabalhos publicados em anais de congressos

FELIPPE, L. G.; BATISTA, 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*. In: 3rd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2011, Ouro Preto - MG.

MAZZEU, B.F.; FELIPPE, L.G.; KATO, M.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Estudo químico e biológico de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). In: 34^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, Florianópolis - SC.

MICALLI, C.B.; FELIPPE, L.G.; KATO, M.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Otimização cromatográfica de lignanas de *Peperomia blanda* por planejamento estatístico. In: 34^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, Florianópolis - SC.

MAZZEU, B.F.; FELIPPE, L.G.; KATO, M.; BOLZANI, V.S.; CICALLELLI R. M. B., FURLAN, M. Prospeção química e biológica de *Piper fuliginum* kunth (Piperaceae). In: 22^o CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010, Araraquara - SP.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; COTINGUIBA, F.; I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Comparative study of phenylalanine ammonia lyase in Piperaceae species. In: 2nd BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP), 2009, São Pedro - SP.

DIGNANI, D. F.; NOGUEIRA, L. G.; ARAUJO, M. G. F.; FELIPPE, L. G.; FURLAN, M.; BAUAB, T. M. Atividade antibacteriana de moléculas isoladas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): comparação do método de difusão em agar e microdiluição. In: 25^o CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Porto de Galinhas - PE.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Peperomins of *Peperomia blanda* (Piperaceae). In: 31^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2008, Águas de Lindóia - SP.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. A new tetrahydrofuran lignan and other metabolites from *Peperomia blanda*. In: 1st BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2007, São Pedro – SP.

CÉSAR, F. S.; MOTA, J. S.; SILVA, F. C.; FELIPPE, L. G.; BOLZANI, V. S.; PASSERINI, G. D.; AMBRÓSIO, D. L.; CICALLELLI, R. M. B.; YOUNG, M. C. M., KATO, M. J.; FURLAN, M. Avaliação biológica dos extratos de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). In: I SIMPÓSIO PAULISTA DE FARMACOGNOSIA, 2007, Araraquara – SP.

ANDRADE, M. M. G.; FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Estudo fitoquímico de *Piper flavoviride*. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2006, Bauru – SP.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Avaliação da atividade tripanocida de lignanas tetraidrofurânicas de *Peperomia blanda* (Piperaceae). In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia -SP.

FELIPPE, L. G.; BERGAMO, D. C. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda* (Piperaceae). In: 5th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2005, Ribeirão Preto – SP

FELIPPE, L. G.; FURLAN, M.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S. Metaboloma de *Peperomia blanda* (Piperaceae). In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Araraquara - SP.

FELIPPE, L. G.; CAVALHEIRO, A. J.; TELASCREA, M.; BOLZANI, V. S. Isolamento e avaliação das atividades antitumoral e antifúngica de desacetil-criptocarialactona. In: 26^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2003, Poços de Caldas – SP.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Claudedir e Isabel, por me permitirem sonhar e realizar meus sonhos e, acima de tudo, por acreditarem em mim.

Ao meu marido Silvio pela dedicação e carinho, por ser meu companheiro nas horas de alegria e também nos momentos difíceis.

Ao meu filho Vinicius, por ser o presente mais lindo que Deus me deu, por ser minha força e minha alegria de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Á DEUS por trilhar os meus caminhos.

À minha querida orientadora Profa. Maysa Furlan, gostaria de fazer um agradecimento especial pelos anos de confiança, de orientação, de incentivo e amizade.

À minha co-orientadora Profa. Isabele R. Nascimento, pela dedicação, ajuda e amizade.

Aos meus pais, Claudécir e Isabel, por me ensinarem a persistir e lutar por tudo que quero. Pelo carinho e amor incondicional.

Ao meu marido Silvio por apoiar meus sonhos e ajudar a realizá-los com dedicação e amor e ao meu filho Vinicius por me trazer tanta alegria, força e me ensinar o verdadeiro sentido da vida.

Aos meus irmãos, Juliana e Felipe, e à minha querida sobrinha Beatriz, por estarem sempre do meu lado e tornarem meus dias mais alegres.

À toda minha família, meu alicerce.

Ao Instituto de Química, que me proporcionou inúmeras realizações ao longo da minha caminhada, desde a graduação até a conclusão deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pela colaboração em várias etapas deste projeto.

Ao Dr. João Marcos Batista Junior pela contribuição fundamental no trabalho de determinação de configuração absoluta, e pela amizade desde a iniciação científica.

Ao professor Alexios-Leandros Skaltsounis, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório na National and Kapodistrian University of Athens-Greece. Apesar do pouco tempo, a experiência e o aprendizado adquiridos foram muito valiosos.

À aluna Caroline Micalli, pela ajuda no trabalho de dinâmica metabólica.

Aos meus grandes amigos Vania, Alan, Andrea, Luis Octávio, Otávio, Andressa, Amauri, Bruna, por estarem sempre presentes, a cada instante, para rir, chorar, conversar, estudar, trabalhar, enfim, por tornarem meus dias muito mais alegres.

À minha amiga e comadre Debora, que foi fundamental desde o início desta caminhada, agradeço por permitir que nossa amizade ultrapassasse as paredes do laboratório para formar uma verdadeira família.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa de Biossíntese de Produtos Naturais: Amanda, Renan, Rute, Tiago, Karina, Tatiana, pela ajuda, discussões, e acima de tudo pelos laços de amizade e confiança.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, pelos cafés, por me atormentar por eu ser corintiana e acima de tudo, pela grande amizade.

Ao Dr. Alberto Camilo Alécio, pela obtenção dos espectros de massas, por estar sempre pronto a ajudar em qualquer situação e pelas risadas.

Aos amigos do Departamento de Química Orgânica, especialmente à família NuBBé, da qual tenho orgulho de fazer parte de um pedacinho de sua história. Uma família adquirida pelo convívio, que sempre me proporcionou muito incentivo, companheirismo, momentos de alegria e que possui muitos nomes. Lembrarei de todos sempre com grande carinho.

Aos meus amigos eternos Carla e Marcelo, Camila e Bruno, que desde a graduação sempre me acompanham e me apoiam.

Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Química Orgânica, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Sandra, Célia, Wennia, Cintia, Ana Paula, pela atenção, ajuda, dedicação aos serviços prestados, e pela amizade.

Às funcionárias da biblioteca, pelo agradável convívio e ajudas tão importantes.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Resumo

O estudo fitoquímico precedente da espécie *Peperomia blanda* culminou no isolamento de lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas. Alguns isômeros destas secolignanas apresentaram configurações absolutas diferentes daquelas já relatadas, as quais foram determinadas por comparação dos espectros experimentais de dicroísmo circular vibracional e eletrônico com aqueles preditos por cálculos mecânico-quânticos *ab initio*. A peperomina B teve a configuração absoluta assinalada como (2S,3S,5S), confirmando a estrutura química descrita na literatura, a substância 2-metil-3-[bis(3',4'-metilenodioxi-5'-metoxifenil) metil]butirolactona foi assinalada como (2R,3S) e a substância 2-metil-3-[5-(3',4'-metilenodioxi-5'-metoxifenil)-5-(3',4',5'-trimetoxifenil)metil]butirolactona foi assinalada como (2R,3S,5S). As dinâmicas metabólicas sazonais de três lignanas tetraidrofurânicas e três secolignanas foram determinadas a partir de análise por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de partes aéreas e raízes de duas populações de *P. blanda*, utilizando planejamento experimental e validação do método cromatográfico. O maior acúmulo destas substâncias foi observado nas raízes, especialmente nos meses de julho e em espécies coletada na Reserva Florestal da Ripasa. Alguns fatores climáticos, como a disponibilidade hídrica, foram determinantes para a produção destes metabólitos. Uma das lignanas tetraidrofurânicas, com oxidação na posição C-9, bem como as secolignanas, tiveram alguns aspectos biossintéticos abordados pela incorporação de precursores em extratos enzimáticos. Os estudos das vias biossintéticas envolvidas na formação dessas lignanas foram iniciados com a investigação e otimização das reações catalíticas da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). A condição ótima reacional foi determinada por planejamento experimental que revelou melhor conversão da *L*-fenilalanina ao ácido *trans*-cinâmico a uma temperatura de 51°C e pH 9,2. O protocolo otimizado foi avaliado em outras espécies de Piperaceae, visando um procedimento comum para análise da atividade da PAL nessa família. Os estudos biossintéticos das lignanas presentes em *P. blanda* tiveram continuidade com a avaliação do acoplamento oxidativo dos precursores, álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol, em presença dos extratos enzimáticos das partes aéreas e raízes da espécie. Os produtos formados foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas e experimentos de ressonância magnética nuclear mono- e bidimensionais. A análise dos resultados mostrou que a biossíntese da lignana tetraidrofurânica com oxidação em C-9 ocorreu a partir do acoplamento cruzado entre os dois precursores utilizados. A biossíntese das secolignanas ocorreu exclusivamente pelo acoplamento do álcool sinapílico. As substâncias isoladas de *P. blanda* foram submetidas à avaliação do potencial de inativação da enzima tirosinase, envolvida na produção de melanina, e mostraram potentes atividades nos ensaios *in vitro*.

Abstract

The previous phytochemical study of *Peperomia blanda* species culminated in the isolation of secolignans and tetrahydrofuran lignans. Some of these secolignans isomers showed different absolute configurations from those reported in the literature, which were determined by comparison of experimental vibrational and electronic circular dichroism spectra with those calculated using *ab initio* quantum mechanical methods. The stereochemistry of peperomin B was assigned as (2*S*,3*S*,5*S*) confirming the previous related structure, the compound 2-methyl-3-[bis(3',4'-methylenedioxy-5'-methoxyphenyl)methyl] butyrolactone was assigned as (2*R*,3*S*) and the compound 2-methyl-3-[5-(3',4'-methylenedioxy-5'-methoxyphenyl)-5-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)methyl] butyrolactone was assigned as (2*R*,3*S*,5*S*). The seasonal metabolic dynamic of three tetrahydrofuran lignans and three secolignans were determined by HPLC-DAD analysis of methanolic extracts of aerial parts and roots of two populations of *P. blanda*, using experimental design and validation of the chromatographic method. The largest accumulation of these substances was observed in the roots, specially in July and in the species collected in the Ripasa's Forest Reserve. Some climatic factors such as water availability were critical for the production of these metabolites. One of the tetrahydrofuran secolignans with oxidation at C-9 as well as the secolignans were studied from the biosynthetic point of view using cell free extracts. These studies were started with the investigation and optimization of catalytic reactions of the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL). The optimum reaction condition was determined by experimental design which showed better conversion of *L*-phenylalanine to *trans*-cinnamic acid at 51 °C and pH 9.2. The optimized protocol was evaluated using other Piperaceae species, seeking a common procedure for analyzing the activity of PAL in this family. The biosynthetic experiments focus on the oxidative coupling of the precursors, synapil alcohol and *E*-5-methoxyisoeugenol, was performed using the enzymatic extract of the aerial parts and roots of *P. blanda*. The products formed were identified by HPLC-MS and NMR mono- and bidimensional experiments. The results showed that the tetrahydrofuran with oxidation at C-9 was biosynthesized from the cross-coupling between the two precursors. On the other hand, the biosynthesis of secolignans occurred from the oxidative coupling of synapil alcohol, and its pathway showed to be syringaresinol and lioniresinol intermediaries in such reactions. The isolated compounds from *P. blanda* were submitted to inactivation assay of the enzyme tyrosinase, which is involved in the production of melanin, and they showed potent *in vitro* activity.

Lista de abreviaturas

a.C.	-	antes de Cristo
AcOEt	-	acetato de etila
CC	-	cromatografia em coluna
CCDC	-	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	-	cromatografia em camada delgada preparativa
CG	-	cromatografia gasosa
CI ₅₀	-	concentração inibitória 50%
CLAE	-	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	-	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CV	-	coeficiente de variação
δ	-	deslocamento químico
d. C.	-	depois de Cristo
d	-	dubleto
DC	-	dicroísmo circular
DAD	-	detector de arranjo de diodos
DCE	-	dicroísmo circular eletrônico
DCM	-	diclorometano
DCV	-	dicroísmo circular vibracional
dd	-	duplo dubleto
DO	-	densidade óptica
DP	-	desvio padrão
DPR	-	desvio padrão relativo
DRO	-	dispersão rotatória óptica
DTT	-	1,4-ditiotreitol
EC	-	efeito Cotton
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
EFS	-	extração em fase sólida
EM	-	espectrometria de massas
E rel.	-	energia relativa
ESI	-	<i>electrospray ionisation</i>
EtOH	-	etanol
<i>gHMBC</i>	-	<i>gradient heteronuclear multiple bond correlation</i>
<i>gHMQC</i>	-	<i>gradient heteronuclear multiple quantum correlation</i>
grad.	-	gradiente
Hex	-	hexanos
IPG	-	<i>immobilized pH gradient</i>
IPP	-	difosfato de isopentenila
i-PrOH	-	isopropanol
isoc.	-	isocrático
IR	-	índice de retenção
HOAc	-	ácido acético
IV	-	espectroscopia no infravermelho
<i>J</i>	-	constante de acoplamento
m	-	múltiplo
MeOH	-	metanol
<i>m/z</i>	-	relação massa-carga
NOE	-	<i>nuclear Overhauser effect</i>

NOESY	-	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
p.	-	página
PAL	-	fenilalanina amônia liase
PI	-	padrão interno
PMSF	-	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR	-	protease
PVPP	-	polivinilpolipirrolidona
R	-	fator de recuperação
R_f	-	fator de retenção
RMN	-	ressonância magnética nuclear
RMN de ^1H	-	ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN de ^{13}C	-	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RO	-	rotação óptica
qn	-	quintuplete
rpm	-	rotações por minuto
s	-	singleto
SDS	-	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
t	-	triplete
TFD	-	teoria do funcional de densidade
TFDTD	-	teoria do funcional de densidade tempo-dependente
TMS	-	tetrametilsilano
tr	-	tempo de retenção
TRIS	-	triidroxiaminometano
UV	-	ultravioleta
v.i.	-	volume de injeção
Vis	-	espectroscopia no visível

Lista de figuras

Figura 1: Principais blocos de construção utilizados na biossíntese de metabolitos secundários.....	2
Figura 2: Fotos de <i>Peperomia blanda</i>	6
Figura 3: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>P. blanda</i>	7
Figura 4: Número de artigos publicados sobre lignanas nos últimos 50 anos....	9
Figura 5: Podofilotoxina derivados utilizados no tratamento de câncer.....	9
Figura 6: Formação do ácido chiquímico a partir da glicose e precursores da via fenilpropanoídica	11
Figura 7: Via fenilpropanoídica de formação das lignanas e neolignanas.....	12
Figura 8: Exemplo da dimerização dos monômeros radicalares com ação da enzima dirigente para formação de um estereoisômero.....	13
Figura 9: Tipos de esqueletos carbônicos de lignanas formados a partir do acoplamento 8-8' entre monolignóis.....	14
Figura 10: Via biossintética do (-)-secoisolariciresinol em <i>Forsythia intermedia</i> com atuação da enzima dirigente e da pinoresinol-lariciresinol redutase.....	15
Figura 11: Via de formação do matairesinol a partir do pinoresinol e atuação das enzimas pinoresinol-lariciresinol redutase (PR/LR) e secoisolaricinos desidrogenase	16
Figura 12: Biossíntese proposta para formação da podofilotoxina a partir do matairesinol segundo Jackson e Molog.....	16
Figura 13: Biossíntese proposta para formação da 6-metoxipodofilotoxina a partir do matairesinol segundo Xia.....	17
Figura 14: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.....	22
Figura 15: Representação gráfica do planejamento fatorial composto central (planejamento em estrela)	38
Figura 16: Representação gráfica do planejamento fatorial 3^2	39
Figura 17: Ilustração da determinação da resolução dos picos cromatográficos.....	40
Figura 18: Substâncias testadas como padrões internos nas análises dos extratos de <i>Peperomia blanda</i>	44
Figura 19: Curva analítica do ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	49
Figura 20: Curva analítica construída com albumina bovina (1 mg.mL^{-1}) para dosagem proteica dos extratos enzimáticos.....	51
Figura 21: Exemplo da estrutura química básica de uma lignana tetraidrofurânica	68
Figura 22: Exemplo da estrutura química de uma 1,7-seco-2,7'-ciclolignana.....	69
Figura 23: Estruturas químicas das secolignanas isoladas de <i>P. blanda</i>	70
Figura 24: Estruturas e energias relativas dos sete confôrmeros de menor energia para (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 1 usados para o cálculo de DCE e DCV.....	72
Figura 25: Comparação entre os espectros experimental e calculado de DCE da substância (-)- 1 com configuração (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)	73

Figura 26: Comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e IV da substância 1 correspondentes à configuração (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>).	73
Figura 27: Estruturas otimizadas e energias relativas dos oito confôrmeros de menor energia para (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- 2 e oito para (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 2 usados para o cálculo de DCE e DCV.....	75
Figura 28: Comparação entre os espectros de DCE experimental de (–)- 2 e os espectros calculados para as configurações (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) (em vermelho) e (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>) (em preto).	76
Figura 29: comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e no IV da substância 2 correspondentes à configuração (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>).....	77
Figura 30: Superposição dos espectros de DCV calculados para as configurações (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) (em preto) e (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>) (em vermelho) da substância 2	77
Figura 31: Estruturas e energias relativas dos oito confôrmeros de menor energia para (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 3 usados para o cálculo de DCE e DCV.....	79
Figura 32: Comparação entre os espectros de DCE experimental de (–)- 3 e os espectros calculados para as configurações (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) (em vermelho) e (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>) (em preto)	80
Figura 33: Comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e IV da substância 3 correspondentes à configuração (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>).....	80
Figura 34: Lignanas isoladas de <i>Peperomia blanda</i> , alvos nas análises de dinâmica metabólica sazonal da espécie.....	81
Figura 35: Perfis cromatográficos dos extratos de partes aéreas de <i>P. blanda</i> realizados com diferentes solventes.....	82
Figura 36: Cromatogramas de três extrações seguidas das partes aéreas (PA) e raízes (R) de <i>Peperomia blanda</i>	84
Figura 37: Comparação entre a fração AcOEt da ELL e da amostra submetida à EFS.....	87
Figura 38: Comparação entre os cromatogramas das frações resultantes da extração líquido-líquido.....	88
Figura 39: Partes aéreas de <i>Peperomia blanda</i> após procedimentos de extração com metanol contendo padrão interno ELL.....	89
Figura 40: Fases estacionárias testadas para análises de extratos de <i>Peperomia blanda</i>	90
Figura 41: Comparação entre os cromatogramas obtidos utilizando (A) coluna C-18 e (B) coluna fenil-hexil.	91
Figura 42: Superfície de resposta gerada à partir dos dados obtidos no planejamento experimental para otimização da proporção de ACN na fase orgânica em função do tempo de análise.....	95
Figura 43: Valores ótimos de porcentagem de ACN e de tempo de análise determinados pelos resultados dos experimentos do planejamento estatístico.....	96
Figura 44: Comparação entre os valores preditos e observados no planejamento estatístico para avaliação do ajuste do modelo utilizado.....	97
Figura 45: Superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos nos experimentos de otimização da temperatura da coluna em função da vazão da fase movel.....	99

Figura 46: Comparação entre os valores preditos e observados no planejamento estatístico para avaliação do ajuste do modelo utilizado.....	100
Figura 47: Cromatograma de extrato de partes aéreas de <i>P. blanda</i> sob condições otimizadas no planejamento experimental, com identificação das lignanas e do padrão interno (registrado a 250 nm).....	102
Figura 48: Curva analítica obtida para a classe das secolignanas realizada com o padrão da substância 1	111
Figura 49: Curva analítica obtida para a classe das lignanas tetraidrofurânicas, realizada com o padrão da substância 5	111
Figura 50: Curva analítica obtida para o padrão interno (Licarina A).....	112
Figura 51: Cromatograma dos padrões benzeno e tolueno.....	114
Figura 52: Dados meteorológicos do local de coleta (Ripasa) e fenotípicos das espécies coletadas.	120
Figura 53: Dados fenotípicos das espécies coletadas na casa de vegetação durante o período de coleta.....	121
Figura 54: Secolignanas de <i>P. blanda</i> avaliadas no estudo da variação metabólica da espécie.....	122
Figura 55: Variação metabólica das peperominas 1-3 em partes aéreas (PA) e raízes (R) de <i>P. blanda</i> coletadas na Ripasa (1) e casa de vegetação (2)	125
Figura 56: Lignanas tetraidrofurânicas de <i>P. blanda</i> avaliadas no estudo da variação metabólica da espécie.....	127
Figura 57: Variação metabólica das lignanas 4-6 em partes aéreas (PA) e raízes (R) de <i>P. blanda</i> coletadas na Ripasa (1) e casa de vegetação (2).....	130
Figura 58: Mecanismo de reação da <i>trans</i> -desaminação da <i>L</i> -fenilalanina em ácido <i>trans</i> -cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL)....	132
Figura 59: Superfície de resposta do experimento de otimização das condições reacionais da enzima PAL para as espécies <i>Piper tuberculatum</i> , <i>Peperomia blanda</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i>	134
Figura 60: Condições ótimas para atividade enzimática da PAL das três espécies de Piperaceae e o valor ótimo comum calculado estatisticamente.....	135
Figura 61: Conversão da <i>L</i> -fenilalanina em ácido <i>trans</i> -cinâmico após fracionamento por precipitação salina nas três espécies de Piperaceae analisadas	138
Figura 62: Cromatograma obtido após a incubação de <i>L</i> -fenilalanina com a fração enzimática com 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) de <i>P. blanda</i> . Condições reacionais: T = 51°C, pH = 9,2 e tempo de incubação de 24 horas.....	138
Figura 63: Géis de poliacrilamida em uma dimensão obtidos dos extratos e das frações preparadas por precipitação fracionada de espécies de Piperaceae, revelados com nitrato de prata.	140
Figura 64: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Peperomia blanda</i> alvos dos estudos biossintético.	141
Figura 65: Precursores das reações enzimáticas para a biossíntese da lignana tetraidrofurânica com oxidação em C-9 e secolignanas.....	142
Figura 66: Biogênese da lignana tetraidrofurânica com oxidação em C-9 isolada de <i>P. blanda</i>	142
Figura 67: Biogênese das secolignanas de <i>P. blanda</i>	143
Figura 68: Espectro de RMN de ¹ H do álcool sinapílico.....	144

Figura 69: Espectro de RMN de ^1H do álcool sinapílico – ampliação.....	144
Figura 70: Espectro de RMN de ^1H do álcool sinapílico – ampliação.	145
Figura 71: Espectro de RMN de ^1H do <i>E</i> -5-metóxi-isoegenol.....	146
Figura 72: Espectro de RMN de ^1H do <i>E</i> -5-metóxi-isoegenol – ampliação.....	146
Figura 73: Espectro de RMN de ^1H do <i>E</i> -5-metóxi-isoegenol – ampliação.....	147
Figura 74: Cromatogramas das reações enzimáticas utilizando (a) branco reacional (sem adição de enzimas), (b) branco dos substratos (sem adição dos substratos), (c) reação com enzimas extraídas das partes aéreas e (d) das raízes, juntamente com os substratos e cofatores.....	149
Figura 75: Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM da reação dos precursores álcool sinapílico e <i>E</i> -5-metoxisoeugenol com enzimas da fração solúvel extraída das raízes de <i>P. blanda</i>	151
Figura 76: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 23,1 min.....	151
Figura 77: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 34,8 min.....	151
Figura 78: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 40,1 min.....	152
Figura 79: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 42,0 min.....	152
Figura 80: Espectros no UV dos produtos formados na reação enzimática utilizando os precursores álcool sinapílico e <i>E</i> -5-metoxisoeugenol com extrato enzimático de raízes de <i>P. blanda</i> . Espectros no UV referentes às substâncias com tr em (A) 23,1 min., (B) 34,7 min. (C) 40,1 min., (D) 42,0 min.....	153
Figura 81: Cromatogramas referentes às reações com enzimas extraídas de raízes de <i>P. blanda</i> com H_2O_2 , NADPH e os precursores: (A) álcool sinapílico e <i>E</i> -5-metoxisoeugenol, (B) apenas o álcool sinapílico e (C) apenas <i>E</i> -5-metoxisoeugenol. (D) Branco sem extrato enzimático.....	154
Figura 82: Estrutura química do produto sugerido correspondente a um intermediário da reação de biossíntese das peperominas com tempo de retenção de 28,9 minutos e m/z 419.	155
Figura 83: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo da segunda reação <i>in vitro</i> do extrato enzimático das raízes de <i>P. blanda</i> com os precursores, álcool sinapílico e <i>E</i> -5-metoxisoeugenol.....	156
Figura 84: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo do produto formado com tr em 28,9 minutos, com m/z 419.	157
Figura 85: Estrutura química da lignana furofurânica siringaresinol, formada na reação enzimática e confirmada por RMN ^1H	158
Figura 86: Espectro de RMN de ^1H do siringaresinol formado nas reações enzimáticas (600 MHz, CDCl_3).	158
Figura 87: Estrutura química da secolignana, formada na reação enzimática...	159
Figura 88: Espectro de RMN de ^1H da peperomina formada nas reações enzimáticas	160
Figura 89: Espectro de RMN de ^1H da da peperomina formada nas reações enzimáticas. – ampliação.	160
Figura 90: Mapa de contorno gHSQC da peperomina formada na reação enzimática.	161

Figura 91: Mapa de contorno gHSQC da peperomina formada na reação enzimática – ampliação.	161
Figura 92: Mapa de contorno gHMBC da peperomina formada na reação enzimática.....	162
Figura 93: Mapa de contorno gHMBC da peperomina formada na reação enzimática – ampliação.	162
Figura 94: Rota biossintética de formação das peperominas.....	163
Figura 95: 2D SDS-PAGE da fração enzimática de raízes e partes aéreas de <i>P. blanda</i> . Separação entre <i>pI</i> 3-10 (IPG 3-10 Linear) e MW entre 14-97 kDa (12,5%).....	164
Figura 96: Biossíntese da melanina.....	165

Lista de tabelas

Tabela 1: Exemplos de fármacos derivados de plantas com maiores potenciais econômicos.....	4
Tabela 2: Níveis codificados utilizados no planejamento para tempo de análise e proporções de ACN.	38
Tabela 3: Experimentos realizados (x) no planejamento em níveis codificados....	39
Tabela 4: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial para a coluna fenyl-hexil.....	40
Tabela 5: Experimentos previstos a partir do planejamento experimental para avaliação do ótimo reacional da enzima PAL.....	48
Tabela 6: Precipitação com sulfato de amônio – concentração de sal a ser adicionado a 0°C.....	50
Tabela 7: Ordem dos precursores utilizados nas reações <i>in vitro</i> com as enzimas extraídas de <i>P. blanda</i>	59
Tabela 8: Protocolo aplicado na focalização isoeletrica	64
Tabela 9: Reagentes e proporções necessários para preparar 100 mL de gel 12,5%.....	65
Tabela 10: Valores de área total dos cromatogramas com tempo de retenção (tr) entre 30 e 50 minutos, em função dos solventes utilizados para extração.....	83
Tabela 11: Rendimento dos extratos metanólicos das partes aéreas de <i>P. blanda</i> obtidos em três extrações sequenciais e em suas triplicatas.....	84
Tabela 12: Rendimento dos extratos metanólicos das raízes de <i>Peperomia blanda</i> obtidos em três extrações sequenciais e em suas triplicatas.....	85
Tabela 13: Quantidade dos extratos obtidas após procedimentos de extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL).....	86
Tabela 14: Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos com tempo de retenção entre 10 e 50 minutos, amostras submetidas à procedimentos de extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL).....	87
Tabela 15: Resolução dos picos em função dos experimentos do planejamento em estrela.....	94
Tabela 16: Resolução dos picos em função dos experimentos do planejamento fatorial 3 ²	98
Tabela 17: Condição cromatográfica final otimizada	101
Tabela 18: Tempo de retenção e resolução dos picos cromatográficos dos padrões analisados.....	103
Tabela 19: Espectros de UV dos picos referentes aos padrões das secolignanas 1, 2 e 3 e comparação com os respectivos picos observados no cromatograma do extrato	105
Tabela 20: Espectros de UV dos picos referentes aos padrões das lignanas tetraidrofurânicas 4, 5 e 6 e comparação com seus respectivos picos observados no cromatograma do extrato.....	106
Tabela 21: Comparação entre os tempos de retenção das secolignanas 1-3 e lignanas tetraidrofurânicas 4-6 em diferentes condições de temperatura da coluna cromatográfica.....	107

Tabela 22: Comparação entre os tempos de retenção das secolignanas 1-3 e lignanas tetraidrofurânicas 4-6 em diferentes concentrações de ACN na fase móvel inicial.....	108
Tabela 23: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da somatória das áreas dos picos das substâncias de interesse dos extratos analisados após diferentes tempos de estocagem, à temperatura ambiente.....	109
Tabela 24: Comparação entre as áreas dos picos das secolignanas 1-3 , em duas concentrações diferentes.	109
Tabela 25: Comparação entre as áreas dos picos das lignanas tetraidrofurânicas 4-6 , em duas concentrações diferentes.	110
Tabela 26: Médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual calculados para os picos cromatográficos referentes aos padrões benzeno e tolueno analisados no mesmo dia.....	113
Tabela 27: Dados de médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual das análises da mistura de padrões benzeno e tolueno em análises de dias diferentes.....	115
Tabela 28: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das partes aéreas de <i>P. blanda</i> coletada na Ripasa...	116
Tabela 29: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das raízes de <i>P. blanda</i> coletada na Ripasa.....	117
Tabela 30: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das partes aéreas de <i>P. blanda</i> coletada na casa de vegetação.....	117
Tabela 31: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das raízes de <i>P. blanda</i> coletada na casa de vegetação.....	118
Tabela 32: Média, desvio padrão e coeficiente de variação entre as triplicatas de injeção ao longo das análises das amostras.....	119
Tabela 33: Teores das substâncias 1-3 calculados nas soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas coletadas na Ripasa.....	122
Tabela 34: Teores das substâncias 1-3 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas coletadas na casa de vegetação.	123
Tabela 35: Teores das substâncias 1-3 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas coletadas na Ripasa.....	123
Tabela 36: Teores das substâncias 1-3 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas coletadas na casa de vegetação.....	124
Tabela 37: Teores das substâncias 4-6 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas de <i>P. blanda</i> coletada na Ripasa.....	128
Tabela 38: Teores das substâncias 4-6 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas de <i>P. blanda</i> coletada na casa de vegetação.....	128
Tabela 39: Teores das substâncias 4-6 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas de <i>P. blanda</i> coletada na Ripasa.....	129
Tabela 40: Teores das substâncias 4-6 calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas de <i>P. blanda</i> coletada na casa de vegetação.....	129

Tabela 41: Concentração protéica total dos extratos brutos no estudo comparativo da PAL de diferentes espécies de Piperaceae.....	133
Tabela 42: Porcentagem de conversão da <i>L</i> -fenilalanina em ácido <i>trans</i> -cinâmico em cada espécie analisada nas condições reacionais otimizadas.....	136
Tabela 43: Concentração protéica total das frações resultantes da precipitação salina dos extratos brutos das espécies de Piperaceae.....	137
Tabela 44: Tempo de retenção, relação massa/carga e estruturas dos reagentes e dos produtos formados sugeridos pela análise dos espectros de massa.....	150
Tabela 45: Atividade das substâncias isoladas de <i>P. blanda</i> frente à enzima tirosinase.....	166

Lista de esquemas

Esquema 1: Extrações das partes aéreas e raízes de <i>Peperomia blanda</i>	35
Esquema 2: Extração líquido-líquido (ELL) dos extratos de <i>P. blanda</i>	36
Esquema 3: Extrações das partes aéreas e raízes de <i>P. blanda</i>	45
Esquema 4: Extração enzimática das espécies de Piperaceae analisadas (<i>Piper tuberculatum</i> , <i>Peperomia blanda</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i>).....	47
Esquema 5: Procedimento para reação enzimática da PAL.....	49
Esquema 6: Síntese do álcool sinapílico.....	55
Esquema 7: Síntese do <i>E</i> -5-metoxi-isoeugenol.....	56
Esquema 8: Procedimento inicial para extração proteica de <i>P. blanda</i>	57
Esquema 9: Concentração das proteínas solúveis de <i>P. blanda</i>	58
Esquema 10: Concentração das proteínas microsossomais de <i>P. blanda</i>	58

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A química de produtos naturais.....	1
1.2. A família Piperaceae e o gênero <i>Peperomia</i>	5
1.3. A espécie <i>Peperomia blanda</i>	6
1.4. Lignananas: ocorrência, importância e biossíntese.....	7
1.5. Determinação da configuração absoluta dos compostos orgânicos quirais. 18	
1.6. A dinâmica metabólica dos produtos naturais.	20
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Coleta do material botânico	27
3.2. Cromatografia.....	27
3.3. Solventes.....	28
3.4. Rotação específica da luz polarizada	28
3.5. Dicroísmo circular eletrônico.....	28
3.6. Infravermelho (IV)	28
3.7. Dicroísmo circular vibracional	28
3.8. Eletroforese mono- e bidimensional.	29
3.9. Espectrometria.....	29
3.9.1. Espectrometria de massas.....	29
3.9.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	29
3.9.3. Espectrofotometria UV/Visível (UV/Vis)	30
3.10. Reagentes	30
3.11. Padrões	30
3.12. Outros Equipamentos.....	30
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1. Determinação da configuração absoluta de secolignananas de <i>Peperomia blanda</i>	31
4.1.1. Dicroísmo circular eletrônico (DCE)	31
4.1.2. Dicroísmo circular vibracional (DCV).	31
4.1.3. Método computacional	31
4.2. Determinação da dinâmica metabólica sazonal das lignanas e secolignananas de <i>P. blanda</i>	33
4.2.1. Coleta e armazenamento do material botânico	33

4.2.2.	Estratégia experimental.....	33
4.2.3.	Preparo das amostras	33
4.2.4.	Desenvolvimento do método cromatográfico.	37
4.2.5.	Validação cromatográfica.....	41
4.2.6.	Extração das amostras.....	45
4.2.7.	Análise cromatográfica dos extratos e quantificação da lignanas de interesse.....	45
4.2.8.	Determinação da dinâmica metabólica envolvida na produção das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas.....	46
4.3.	Determinação de protocolo de extração, concentração e otimização das condições reacionais da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) para diferentes espécies de Piperaceae.....	46
4.3.1.	Extração enzimática e otimização das condições reacionais.	46
4.3.2.	Dosagem Proteica.....	50
4.3.3.	Eletroforese unidimensional.	51
4.4.	Estudo biossintético de dimerização das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de <i>Peperomia blanda in vitro</i>	55
4.4.1.	Síntese dos precursores	55
4.4.2.	Procedimento para obtenção da fração enzimática solúvel e microsomal de partes aéreas e raízes <i>Peperomia blanda</i>	56
4.4.3.	Procedimento para ensaio enzimático in vitro com os precursores sintetizados para formação das lignanas.	59
4.4.4.	Análise dos produtos formados por ressonância magnética nuclear (RMN).....	60
4.4.5.	Eletroforese em duas dimensões (SDS-2D) dos extratos enzimáticos de partes aéreas e raízes.....	60
4.5.	Determinação da atividade <i>in vitro</i> das lignanas e secolignanas de <i>Peperomia blanda</i> frente à enzima tirosinase.	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1.	Considerações gerais.	68
5.2.	Determinação da configuração absoluta das secolignanas isoladas de <i>Peperomia blanda</i>	70
5.2.1.	Determinação da configuração absoluta das secolignanas.	70
5.3.	Estudo da dinâmica metabólica sazonal de lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de <i>Peperomia blanda</i>	81
5.3.1.	Considerações gerais.....	81
5.3.2.	Preparo das amostras	82
5.3.3.	Desenvolvimento do método cromatográfico	90
5.3.4.	Validação do método cromatográfico	103
5.4.	Estudo biossintético das lignanas de <i>Peperomia blanda</i>	132
5.4.1.	Estudo comparativo da enzima PAL em espécies de Piperaceae.....	132
5.4.2.	Eletroforese monodimensional dos extratos e frações enzimáticas das espécies estudadas.....	139

5.4.3. Estudo da dimerização de fenilpropanóides para formação das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de <i>Peperomia blanda</i>	140
5.4.4. Síntese dos precursores.....	143
5.4.5. Ensaio enzimático <i>in vitro</i>	147
5.4.6. Identificação dos produtos formados por ressonância magnética nuclear.....	157
5.4.7. Análise do perfil proteico de partes aéreas e raízes de <i>Peperomia blanda</i> por eletroforese bidimensional.....	163
5.5. Estudo da atividade <i>in vitro</i> das lignanas e secolignanas de <i>Peperomia blanda</i> frente à enzima tirosinase.	164
6. CONCLUSÕES	169
REFERÊNCIAS	171

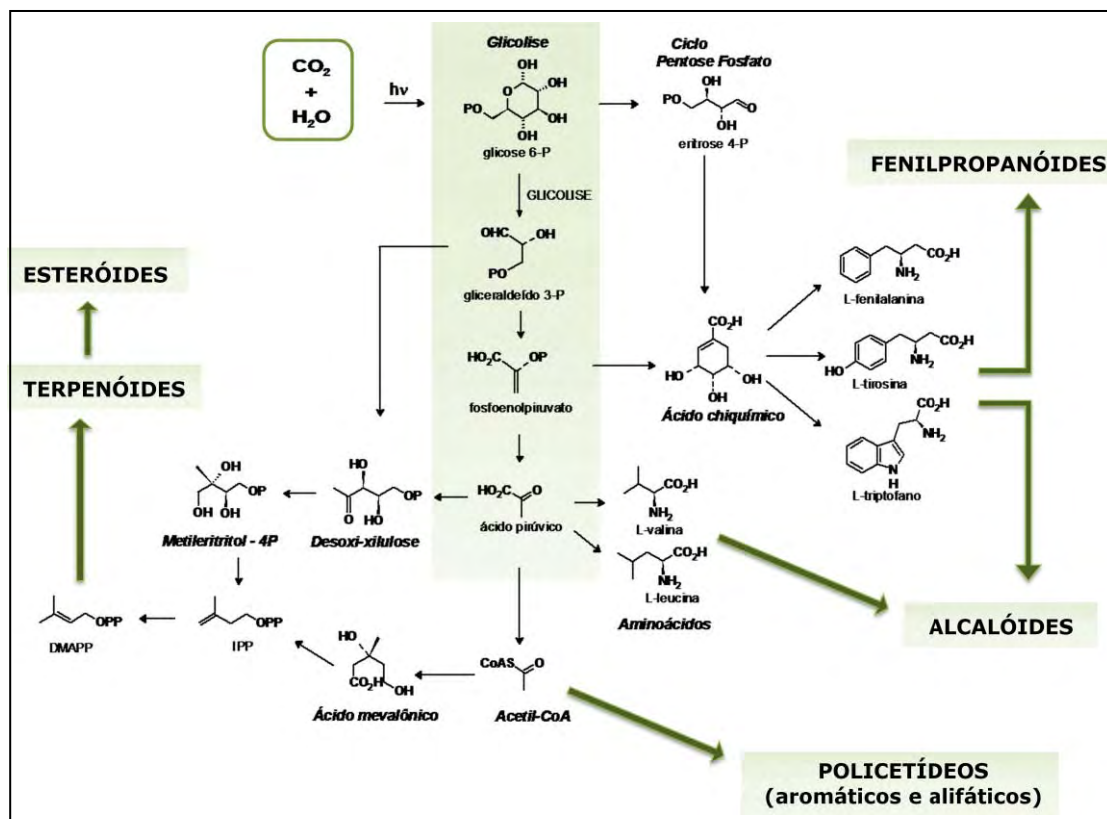
1. INTRODUÇÃO.

1.1. A química de produtos naturais.

A biossíntese e degradação de proteínas, gorduras, ácidos nucleicos e carboidratos, que são essenciais para todos os organismos vivos, é conhecido como o metabolismo primário e os compostos produzidos nas suas vias são os "metabólitos primários". O metabolismo secundário é o mecanismo pelo qual um organismo biossintetiza as substâncias chamadas "metabólitos secundários" ou metabólitos especiais, que são uma expressão da individualidade de uma espécie por serem geralmente encontrados em organismos específicos. Metabólitos secundários não são geralmente essenciais para o crescimento, o desenvolvimento ou a reprodução de um organismo e são produzidos como um resultado da adaptação de um organismo ao seu meio ambiente circundante, ou são produzidos para atuar como um mecanismo de defesa contra predadores e, conseqüentemente, auxiliam na sobrevivência da espécie. A biossíntese de metabólitos secundários é derivada dos processos fundamentais da fotossíntese, glicólise e do ciclo de Krebs para se obter intermediários biossintéticos que, posteriormente, resultam na formação destes metabólitos especiais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Embora o número de blocos de construção biossintéticos seja limitado, a quantidade de metabólitos secundários é infinita. Os blocos de construção mais importantes utilizados na biossíntese de metabólitos secundários são aqueles derivados a partir dos intermediários: acetil-coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-desoxi-xilulose-5-fosfato (Figura 1, p. 2). Eles estão envolvidos em vias biossintéticas incontáveis, envolvendo diferentes mecanismos de reações (DEWICK, 2002).

Figura 1: Principais blocos de construção utilizados na biossíntese de metabólitos secundários (DEWICK, 2002).



O metabolismo secundário utiliza as vias primárias para a produção de metabólitos intermediários criando uma via biossintética alternativa, que conduz à produção destas substâncias especiais. Modificações nas vias biossintéticas podem estar relacionadas a causas naturais (por exemplo, doenças ou mudanças ambientais) ou causas não naturais (por exemplo, agentes químicos ou radiação), num esforço para se adaptar ou proporcionar longevidade para o organismo (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

É a biossíntese exclusiva destes metabólitos secundários, produzidos pelo número incontável de organismos terrestres e aquáticos, que fornece estruturas químicas específicas com grande variedade de atividades biológicas. Estas substâncias ativas de fontes naturais são utilizadas desde a antiguidade para a cura de enfermidades. Os primeiros registros do uso de produtos naturais como medicamentos foram descritos em tabletes de argila em escrita cuneiforme da Mesopotâmia (2600 a.C.), os quais documentam os óleos de *Cupressus sempervirens* (cipreste) e espécies de *Commiphora* (mirra), que são usados ainda hoje no tratamento de tosse, resfriados e inflamações. O Papiro

de Ebers (2900 a.C.) é um registro farmacêutico egípcio, que documenta mais de 700 medicamentos à base de plantas que abrangem desde gargarejos, pastilhas, infusões até pomadas. Os registros do médico grego Dioscorides, (100 d.C.) descreve a coleta, o armazenamento e os usos de ervas medicinais, ao passo que o filósofo grego e cientista natural, Teofrasto (~300 a.C.) descreve suas aplicações em tratamentos de diversas enfermidades. No século 8, os árabes tinham suas próprias farmácias naturais e na mesma época, Avicena, um farmacêutico, médico, filósofo e poeta persa, contribuiu muito para as ciências farmacêuticas e medicas por meio de suas obras como a *Canon Medicinae*, que organiza e sumariza todo o conhecimento medicinal de sua época (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Estes conhecimentos se difundiram para todo o mundo e atualmente os produtos naturais ainda se configuram numa fonte importante no desenvolvimento de medicamentos. Dados atuais mostram que nos últimos 25 anos, cerca de dois terços das novas drogas registradas para uso terapêutico são originárias ou derivados de metabólitos secundários. Este sucesso é atribuído à complexidade estrutural das moléculas encontradas em organismos vivos, que têm uma média de 6,2 estereocentros por molécula em comparação com uma média de 0,4 estereocentros encontrados em substâncias derivadas de síntese combinatória. Com novas ferramentas genômicas, proteômicas e metabolômicas, novos alvos moleculares foram rapidamente determinados, juntamente com as estruturas cristalinas de proteínas responsáveis por várias doenças humanas, o que fez com que a indústria passasse a investir na química combinatória e na previsão de milhões de moléculas virtuais utilizando técnicas e softwares dedicados para o rastreamento de novos compostos com potencial para produzir novos medicamentos (DE LUCA et al., 2012).

Porém, estes esforços não melhoraram a taxa de descoberta de novas drogas ao longo da década passada e, apesar desta mudança de foco, 26% das drogas aprovadas nos anos de 2009-2010 pela FDA (*Food and Drug Administration*) são derivados de metabólitos naturais. Estas tendências, juntamente com a necessidade de melhorar o fornecimento de medicamentos modernos e acessíveis para o mundo em desenvolvimento, renovaram os interesses da investigação de produtos naturais em busca de novos fármacos (LI; VEDERAS, 2009). Um levantamento recente mostra que os fármacos

derivados de plantas mais importantes e comercialmente relevantes movimentam cerca de US\$ 25 bilhões/ano (Tabela 1, p. 4). Entre eles estão: lignanas com atividades antineoplásicas (*Podophylum peltatum*); alcalóides e seus derivados sintéticos com atividade antineoplásica (*Catharanthus roseus* e *Camptotheca acuminata*), antigota (*Colchicum autumnale*), antitussígenos (*Papaver somniferum*), antimaláricos (*Cinchona ledgeriana*), anti-hipertensivos (*Rauvolfia serpentina*), colinérgicos (*Physostigma venenosum*), eméticos (*Psychotria ipecacuanha*), analgésicos (*Papaver somniferum*); terpenos e esteróides com atividades antineoplásica (*Taxus baccata*), antimalárica (*Artemisia annua*) e contraceptiva (*Dioscorea mexicana*) (DE LUCA et al., 2012).

Tabela 1: Exemplos de fármacos derivados de plantas com maiores potenciais econômicos (DE LUCA et al., 2012) .

Fármaco	Propriedade farmacológica
codeína morfina capsaicina	analgésico antitussígeno
atropina hiosciamina escopolamina	anticolinérgico
reserpina	antipertensivo
colchicina	antigota
artemisinina quinina quinolina	antimalárico
camptotecina vinblastina vincristina taxol podophyllotoxina	antineoplásico
quinidina	depressivo cardíaco
galantamina	inibidor de colinesterase
diosgenina hecogenina estigmasterol	contraceptivos hormonais
cocaína	anestésico local
senosídeo A e B	laxativo
tubocurarina	relaxante muscular

1.2. A família Piperaceae e o gênero *Peperomia*

A família Piperaceae, juntamente com outros membros da ordem Piperales como Aristolochiaceae, Saururaceae e Lactoridaceae, é classificada entre as angiospermas basais (KATO; FURLAN, 2007). Piperaceae compreende cinco gêneros, incluindo: *Peperomia*, *Piper*, *Manekia* e *Zippelia* (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004) e o gênero *Verhuellia*, descrito recentemente (SAMAIN et al., 2010). *Piper* e *Peperomia* representam os gêneros mais importantes desta família com 2000 (WANKE et al., 2006) e 1700 espécies (QUIJANO-ABRIL et al., 2006), respectivamente. Espécies do gênero *Piper* estão localizadas em quase todos os tipos de vegetação, predominantemente como componentes de vegetação pioneira. No caso de *Peperomia*, as espécies são, em sua maioria, encontradas como epífitas ou plantas suculentas em florestas úmidas ou de altitude elevada (KATO; FURLAN, 2007).

Muitas espécies da família Piperaceae são amplamente utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatório e analgésico (ARRIGONI-BLANK, et al., 2004; SILVA et al., 2008), cicatrizante (VILLEGAS et al., 2001), leishmanicida (CÉLINE et al., 2009; ODONNE et al., 2009), antitumoral (LI et al., 2003), anticolérico, antiulcerígeno (RHO et al., 2007), antifúngico, bactericida (MICHEL et al., 2007), antidepressivo e ansiolítico (MICHEL et al., 2010), entre outros.

A substância mais conhecida do gênero *Piper* é a amida piperina, o constituinte que confere o sabor pungente da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), sendo esta uma das especiarias mais famosa do mundo, utilizada desde a antiguidade como condimento ou para conservação dos alimentos (GORDO et al., 2012). Um grande número de relatos demonstra e reforça o potencial das amidas deste gênero como agentes inseticida (NAVICKIENE et al., 2003; DEBONSI et al., 2007), moluscicida e antifúngico (DYERS; PALMER, 2004). Juntamente com as amidas, várias outras classes de metabólitos foram isoladas de espécies de *Piper* como cromenos (LAGO et al., 2004), lignanas e neolignanas (MARTINS et al., 2003; CABANILLAS et al., 2010), alcalóides (Ee et al., 2009), e outros metabólitos (KATO; FURLAN, 2007).

O gênero *Peperomia* (Piperaceae) está entre os maiores gêneros de angiospermas em número de espécies (NAUMANN et al., 2011), mas em

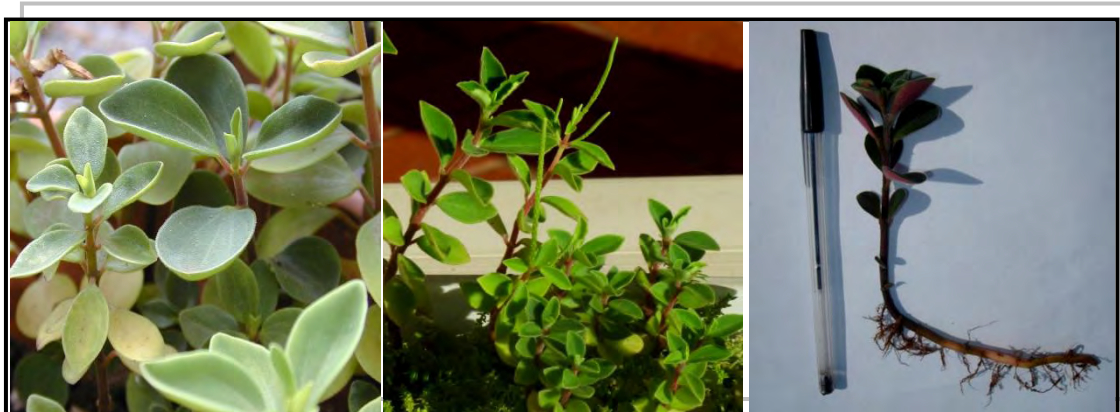
comparação com o gênero *Piper*, o conhecimento químico de espécies de *Peperomia* ainda é limitado, sendo que atualmente apenas 46 das espécies foram estudadas (Fonte: SciFinder, novembro de 2012, palavra chave “*Peperomia*”). As classes de metabólitos mais encontrados em *Peperomia* incluem substâncias fenólicas preniladas (MOTA et al, 2009), lignanas e secolignanas (FELIPPE et al., 2008; FELIPPE et al., 2012), policetídeos (CHENG et al., 2003) e cromenos (BATISTA et al., 2008).

1.3. A espécie *Peperomia blanda*.

Peperomia blanda (Jacq.) H.B. & K. é uma erva rupestre, suculenta, que mede aproximadamente 30 cm de altura, possui folhas petaladas com tricomas e frutos que ocorrem nos ápices da planta anualmente (WAARD, 1986) (Figura 2, p. 6).

Esta espécie é encontrada principalmente nas Antilhas e na América do Sul. No Brasil é encontrada nos estados de Roraima, Goiás (Brasília – DF), Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

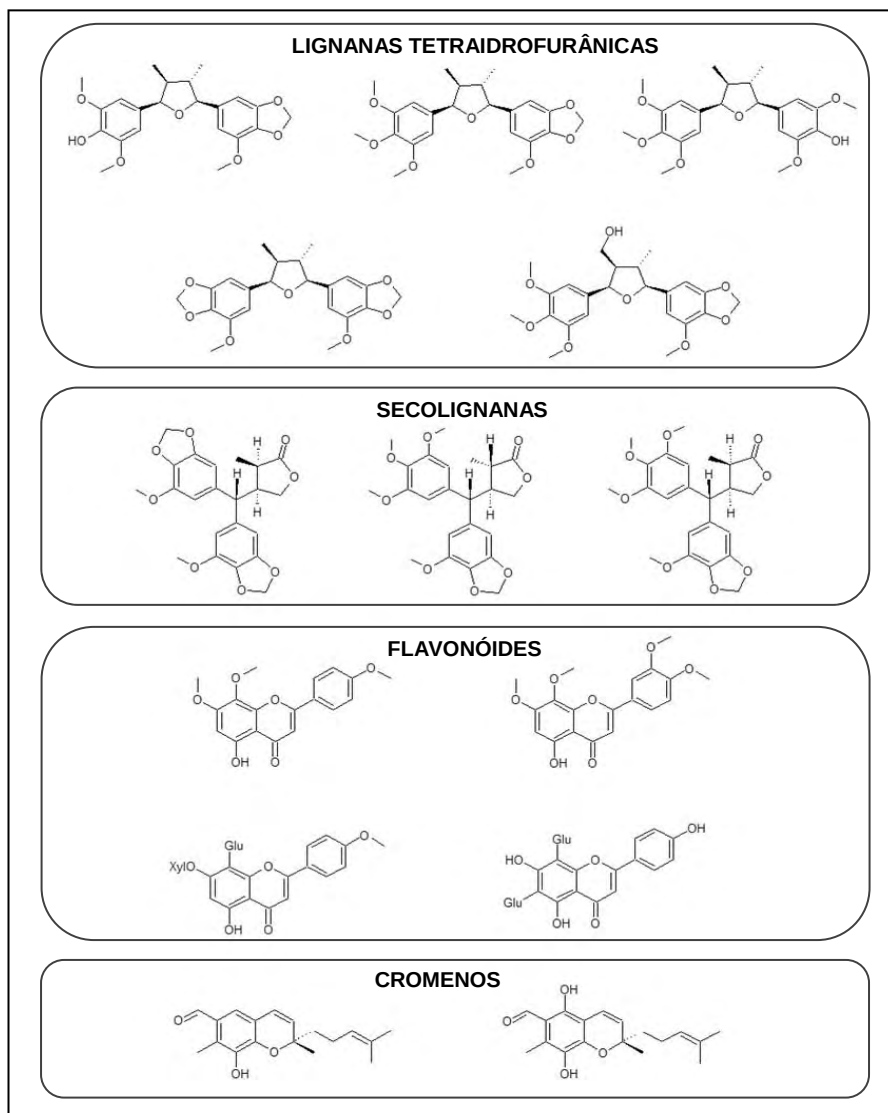
Figura 2: Fotos de *Peperomia blanda*. (créditos: Forest and Kim Starr – <http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Peperomia+blanda> e Lidianie Gaspareto Felipe)



Com relação ao estudo químico de *P. blanda*, é relatada na literatura apenas a presença de mono- e sesquiterpenos como componentes de seus óleos essenciais (SANTOS et al., 2001). Veloso e colaboradores (2006 e 2009)

também relataram a presença de cromenos e flavonas C-glicosiladas. O estudo prévio desta espécie revelou ainda a presença de lignanas tetraidrofurânicas e flavonas (Felippe et al., 2008), bem como a presença de uma classe de secolignanas denominadas peperominas (Felippe et al, 2011 e Felippe et al, 2012) (Figura 3, p. 7).

Figura 3: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Peperomia blanda*.



1.4. Lignanas: ocorrência, importância e biossíntese.

As lignanas se constituem em uma classe de metabólitos secundários amplamente biossintetizadas por espécies vegetais que vão desde arbustos

primitivos até gimnospermas e angiospermas lenhosas e herbáceas. Podem estar localizadas em todas as partes das plantas e, muitas vezes, assumem a função de fitoalexinas e estão envolvidas na proteção das plantas contra doenças e pestes. As lignanas também podem participar no controle do crescimento da planta (RAFFAELLI et al., 2002).

Após as lignanas serem detectadas pela primeira vez em urina de mamíferos em 1981 (ADLERCREUTZ et al., 1981), muitos estudos foram conduzidos com um novo foco, o da investigação das lignanas com o interesse nutricional e terapêutico. Aliado a esse interesse, a magnitude dos testes biológicos envolvendo a classe das lignanas aumentaram consideravelmente e fortaleceram importância medicinal desta classe de substâncias. Entre as principais atividades biológicas descritas para as lignanas destacam-se a antitumoral (LEE et al., 1998; WU et al., 2006; BOZINIS et al., 2010), anti-inflamatória (WU et al., 2005; LI et al., 2007; DE REZENDE et al., 2011) e antiparasitária (MARTINS et al., 2003; SOLIS et al., 2005). Desta forma, o número de publicações sobre esta classe de metabólitos tem aumentado substancialmente, sendo que nos últimos anos este número ultrapassou 300 artigos por ano (Figura 4, página 9).

Dentre as substâncias relatadas desta classe com finalidade terapêutica, uma das mais importantes é a podofilotoxina devido a sua pronunciada atividade antitumoral. Esta substância é usada como composto inicial para produção de três drogas utilizadas no tratamento de alguns tipos de câncer, o etoposídeo (VEPESID[®]), o etopofos (ETOPOPHOS[®]) e o teniposídeo (VUMON[®]) (Figura 5, p. 9). O primeiro é o mais comumente utilizado como agente antineoplásico e, apesar de ter sido identificado em 1966, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) apenas em 1983. O segundo derivado é um análogo fosfatado e foi aprovado em 1996. O terceiro não é tão frequentemente utilizado em quimioterapia e foi aprovado em 1998. Esses resultados tornaram a podofilotoxina um dos compostos mais importantes resultantes das pesquisas de plantas medicinais. (KOULMAN, 2003; DE LUCA et al., 2012).

Figura 4: Número de artigos publicados sobre lignanas nos últimos 50 anos. (Dados adquiridos do SciFinder Scholar em outubro de 2012, palavra chave: "lignan").

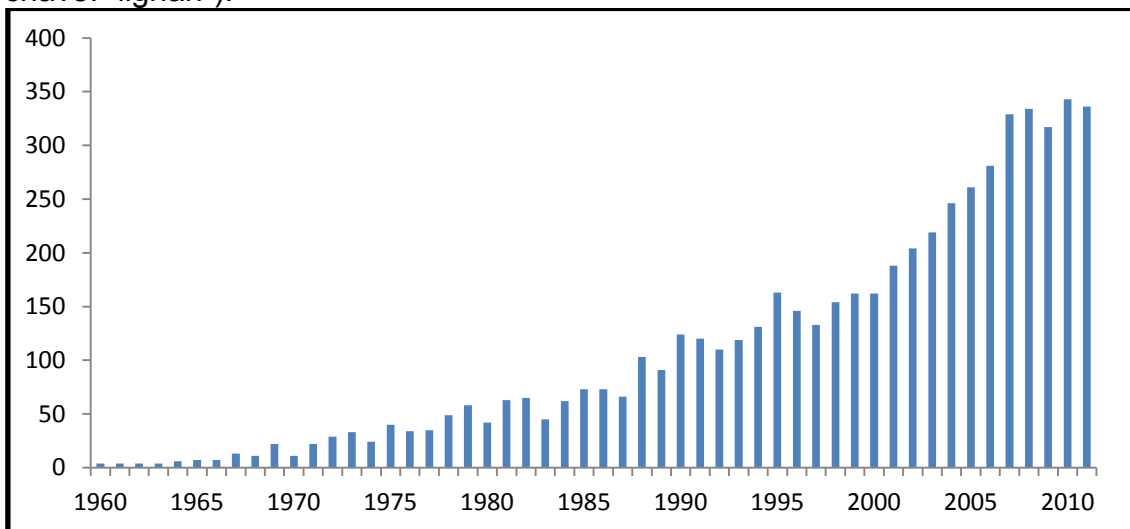
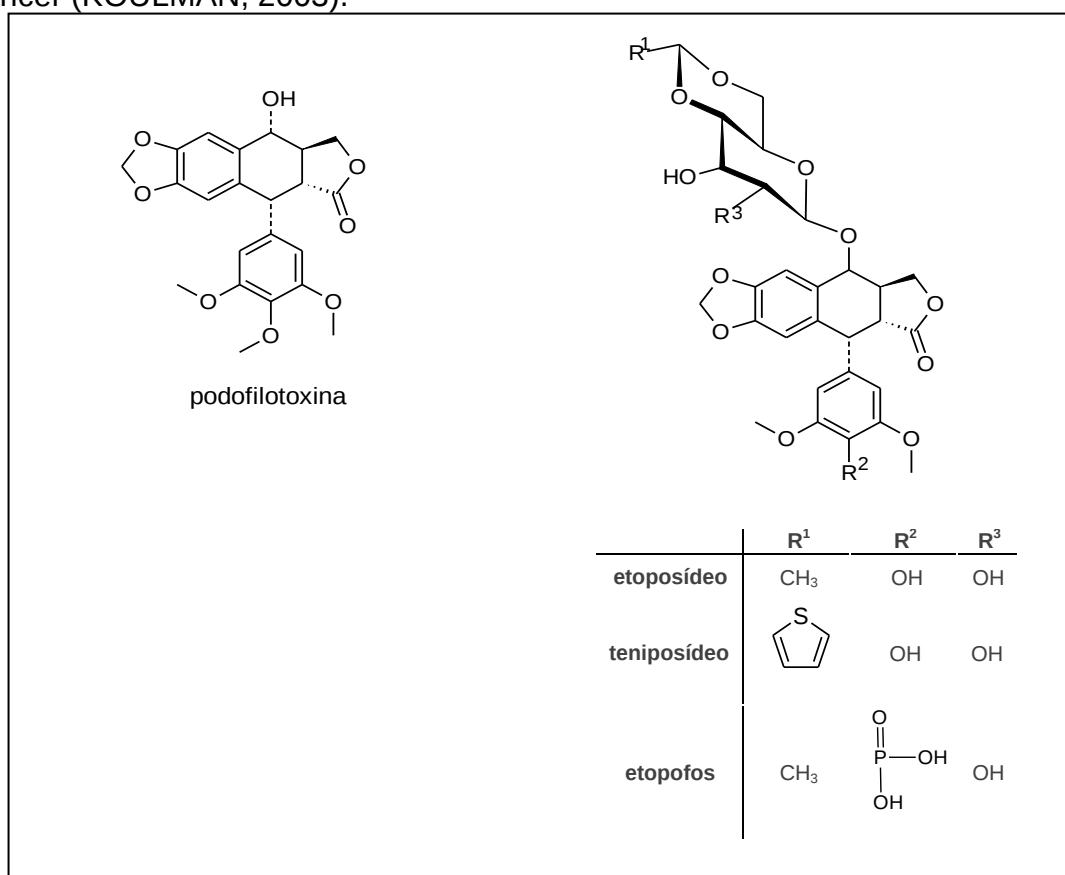


Figura 5: Podofilotoxina e seus derivados utilizados no tratamento de câncer (KOULMAN, 2003).



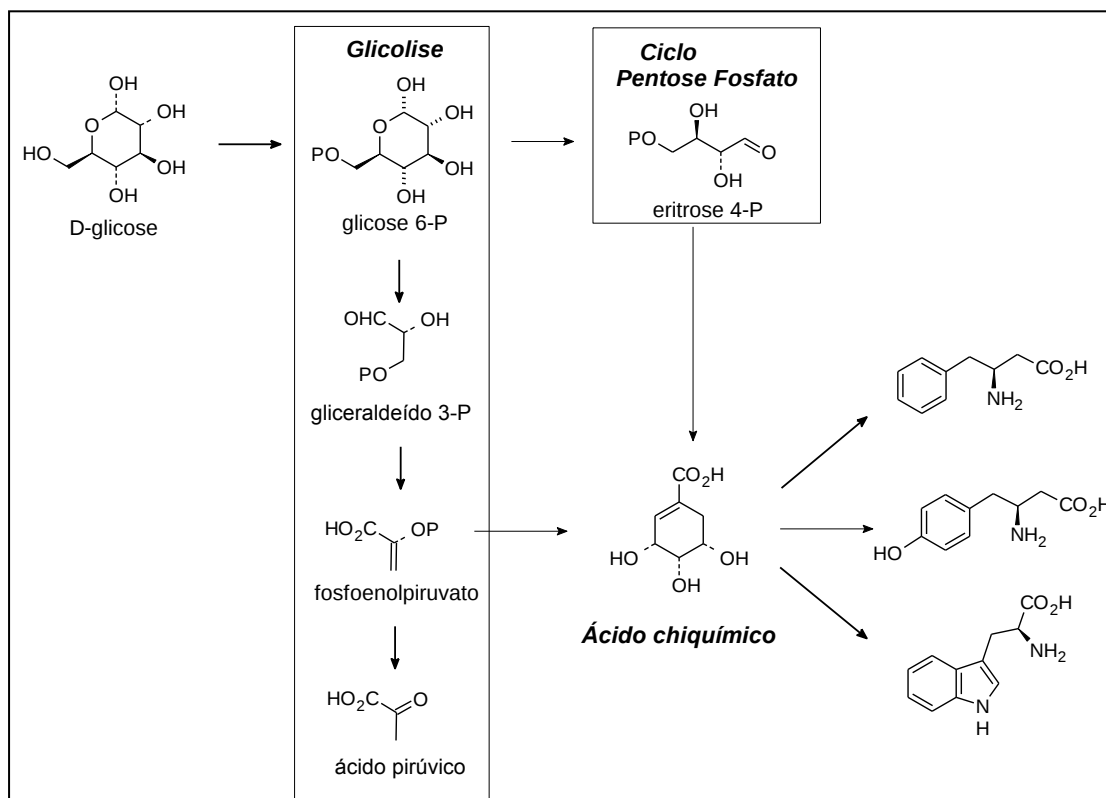
A importância da inserção de lignanas na dieta humana também é muito relatada. Um dos alimentos mais enriquecido com essa classe de metabólitos é a semente de linhaça (*Linum usitatissimum*). Os efeitos benéficos de linhaça

sobre o metabolismo do tecido adiposo e diminuição de gordura visceral são atribuídos à presença das lignanas nesta espécie. Outros alimentos, apesar de conterem uma quantidade menor de lignanas, também são importantes fontes destas substâncias, como a laranja e o café, e seu consumo diário está associado a inúmeros benefícios, principalmente na prevenção de alguns tumores (CARDOSO CARRARO et al., 2012).

Do ponto de vista biossintético, as lignanas são dímeros de fenilpropanóides, amplamente encontrados no reino vegetal. O termo lignana foi introduzido por Haworth (1936) para descrever um grupo de dímeros de fenilpropanóides, onde as unidades fenilpropanoídicas são ligadas pelos carbonos C-8/C-8'. McCredie e colaboradores (1969) propuseram a extensão do termo para todo produto natural de baixo peso molecular que é biossintetizado via acoplamento oxidativo de unidades de *p*-hidroxifenilpropeno. O termo neolignana foi introduzido por Gottlieb (1972) para substâncias compostas de duas unidades de fenilpropano que apresentavam ligação diferente de C-8/C-8'. Contudo, este termo foi redefinido como sendo dímeros de unidade alil ou propenilfenil, enquanto que o termo lignana ficou restrito à dímeros de álcoois cinâmicos e/ou ácidos cinâmicos (Gottlieb, 1978). Apesar destas redefinições, estes termos são utilizados amplamente, sendo adotados no ano de 2000 pela IUPAC, que finalmente definiu que, lignanas são dímeros de C₆C₃ unidos pela ligação entre os carbonos C-8/C-8', enquanto que as neolignanas são dímeros onde a união entre as duas unidades seja diferente de C-8/C-8' (MOSS, 2000).

O termo biossíntese é definido como as sequências metabólicas que levam às diferentes classes de produtos naturais. Em plantas superiores, a biossíntese relacionada à via do ácido chiquímico ocorre em plastídeos ou no citosol. Esta importante via metabólica utiliza como precursores o fosfoenolpiruvato (PEP), oriundo da glicólise, e a eritrose 4-P proveniente da rota das pentoses monofosfatadas e do ciclo de Calvin, resultando na biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (DEWICK, 2002) (Figura 6, p. 11).

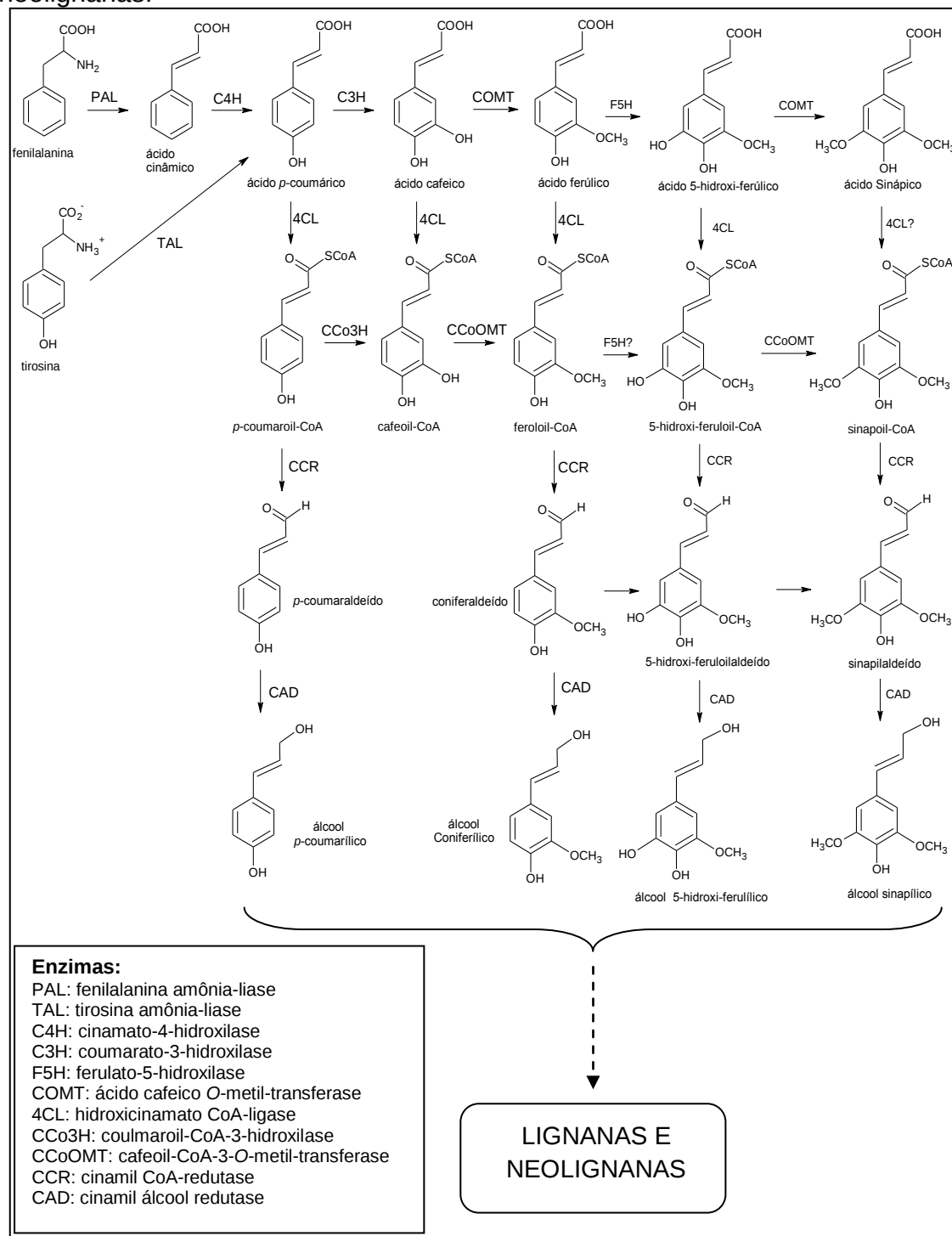
Figura 6: Formação do ácido chiquímico a partir da glicose e precursores da via fenilpropanoídica (DEWICK, 2002).



Uma vez formada a fenilalanina ou a tirosina, esses aminoácidos podem entrar na chamada rota geral dos fenilpropanóides (Figura 7, p. 12), que originarão diversos tipos de compostos fenólicos como as lignanas. A rota dos fenilpropanóides inicia com a *trans*-desaminação da fenilalanina ou tirosina ao ácido *trans*-cinâmico ou *p*-cumárico, respectivamente, numa reação catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL) em dicotiledôneas, e pela tirosina amônia liase (TAL) em monocotiledôneas. Essas enzimas são consideradas reguladoras desta via e um dos principais pontos de controle de muitos metabólitos secundários de vegetais. A PAL é uma enzima tetramérica, e as isoenzimas isoladas individualmente apresentam uma cinética que segue a regra de Michaelis-Menten. Sua atividade é influenciada por vários fatores externos e internos, como: hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A ação de fungos, por exemplo, induz a transcrição do mRNA que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese “de

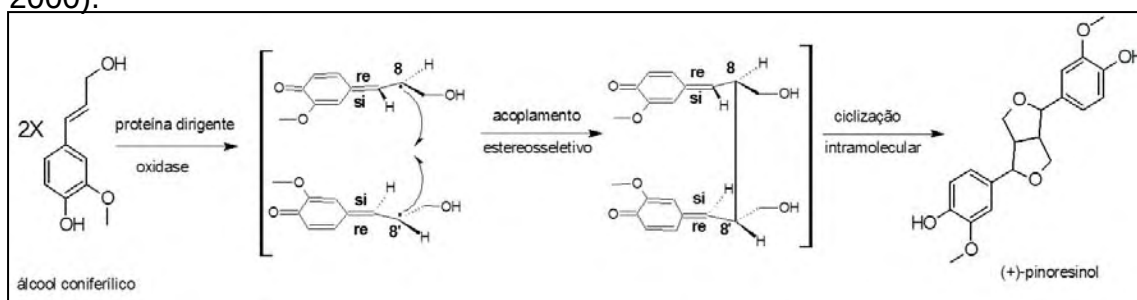
novo” e, conseqüentemente, estimulando a produção de compostos fenólicos (DIAS et al., 2001).

Figura 7: Via fenilpropanoídica geral de formação das lignanas e neolignanas.



Etapas posteriores de redução resultam finalmente em alil- e fenilpropanóis, os quais, por acoplamentos oxidativos iniciados pelas peroxidases ou lacases, formam os chamados intermediários quinona-metídeos que, posteriormente, entram em ressonância. *In vitro*, os radicais livres se dimerizam para produzir uma mistura racêmica. No entanto, na planta, a dimerização é controlada e a formação de um estereoisômero é favorecida. Esta observação levou à descoberta da proteína dirigente (Davin et al., 1997). A proteína dirigente não catalisa a reação como uma enzima padrão, pois não há nenhum sítio ativo na proteína. Não é clara a forma como a proteína se liga (covalentemente ou não covalentemente) aos substratos, ou como dirige o acoplamento de dois monômeros radiculares de um modo estereoespecífico. Davin e Lewis (2000) afirmaram que os genes homólogos estão presentes em várias espécies de plantas, incluindo espécies de *Forsythia*, *Thuja plicata*, *Populus tremuloides*, *Oryza sativa*, *Linum usitatissimum* e *Nicotiana tabacum*. Esses radicais sofrerão então acoplamentos oxidativos posteriores e darão origem aos diferentes esqueletos básicos das lignanas e neolignanas (Figura 8, p. 13). Como resultado, a maioria das lignanas e neolignanas encontradas em plantas são opticamente ativas os isômeros podem apresentar diferentes propriedades biológicas.

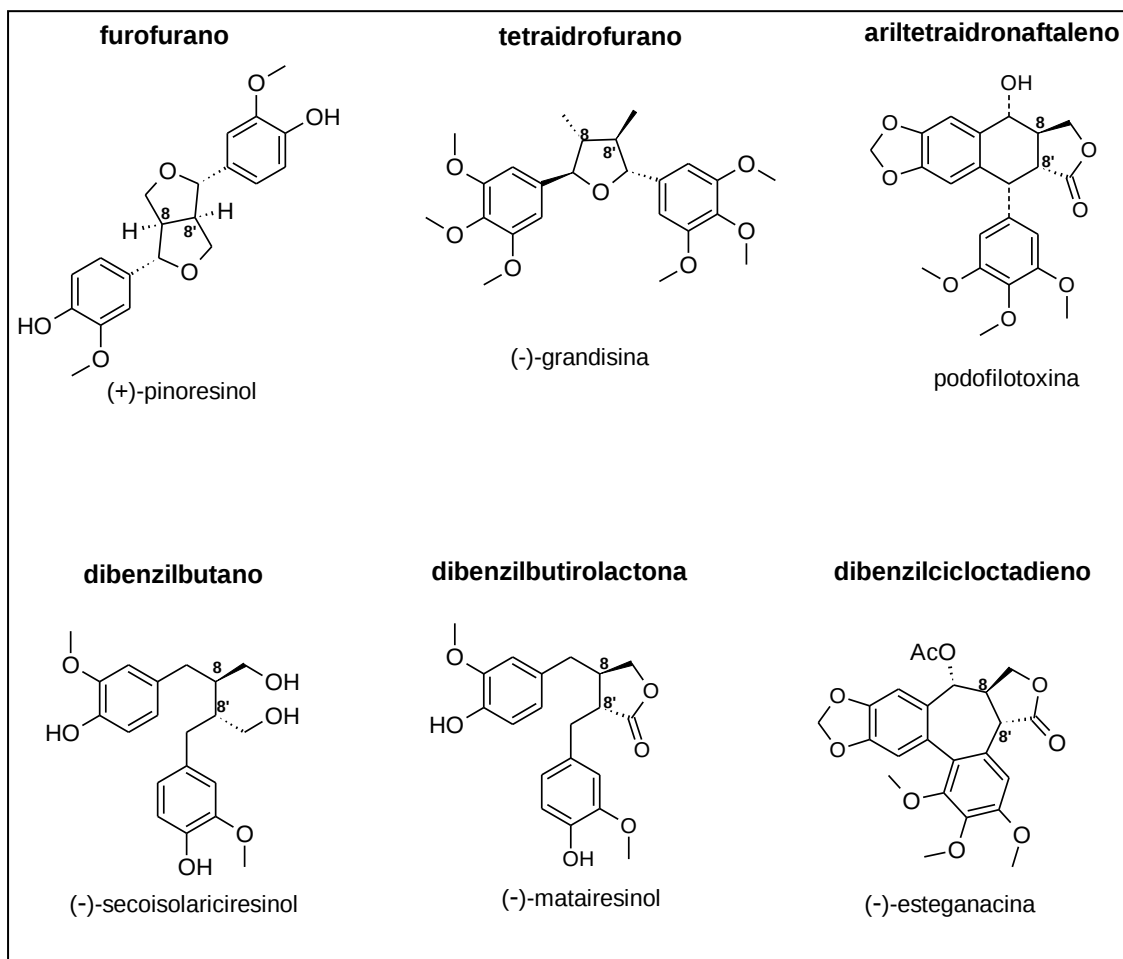
Figura 8: Exemplo da dimerização dos monômeros radiculares com ação da enzima dirigente para formação de um estereoisômero (Davin and Lewis, 2000).



De fato, a dimerização dos monolignóis entre si ou em ligações cruzadas levam à diversidade estrutural das lignanas e neolignanas, que podem ser agrupadas de acordo com os tipos de cadeia lateral. No caso das lignanas, com esqueletos formados a partir do acoplamento 8-8' entre os monolignóis, são encontrados esqueletos carbônicos como das furanofurânicas (ou

furofurânicas), tetraidrofurânicas, dibenzilbutanos, dibenzilbutirolactonas, ariltetraidronaftalenos, arilnaftalenos e outros (RAHMAN et al., 2007) (Figura 9, p. 14). As lignanas formadas a partir do acoplamento dos monolignóis álcool coniferílico (AC) ou álcool sinapílico (AS) geralmente apresentam oxidação na(s) posição(ões) C 9/C-9'.

Figura 9: Tipos de esqueletos carbônicos de lignanas formados a partir do acoplamento 8-8' entre monolignóis.

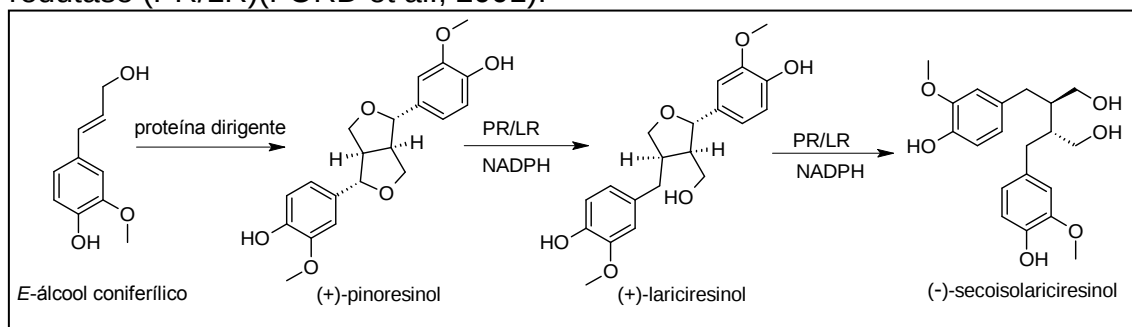


O primeiro relato de estudos acerca da biossíntese de lignanas foi em 1977 (STOECKIGT; KLISCHIES, 1977), no qual foram sintetizados derivados de fenilpropanóides, como o ácido glicoferúlico e aldeído glicoferúlico, marcados isotopicamente com ^3H e ^{14}C . Os resultados mostraram a incorporação destes nas lignanas anctiina e filirina de *Forsythia suspensa*, comprovando que estes eram os precursores diretos destas lignanas.

Outras classes de lignanas também foram alvos de estudos biossintéticos, como das lignanas tetraidrofurânicas. Um exemplo foi o estudo da grandisina em *Piper solmsianum*, utilizando *E*-5-metoxisoeugenol isotopicamente marcado em suas folhas como precursor. Constatou-se que as conversões são enantiosseletivas e que a lignana inicialmente formada é o isômero (+)-di-*O*-desmetilgrandisina que, por sua vez, é metilado com a participação de *O*-metiltransferases para formação da grandisina (MARTINS, 2002).

A elucidação da via que conduz ao secoisolariciresinol, uma substância preventiva de alguns tipos de câncer, foi primeiramente realizada em espécies de *Forsythia intermedia*, uma planta que produz e ainda metaboliza o pinoresinol enantiomericamente puro. Este metabolismo envolve o acoplamento intermolecular radicalar enzimático de duas moléculas de (*E*)-álcool coniferílico, com propriedades regio- e estereosseletivas. A redução enantioespecífica sequencial deste álcool intermediário ocorre por uma redutase para então, gerar o lariciresinol e, em seguida, o secoisolariciresinol (FORD et al., 2001) (Figura 10, p. 15). A glicosilação do secoisolariciresinol é realizada pela enzima secoisolariciresinol-diglicosil transferase que está compartimentalizada, principalmente na semente da espécie (TOURE; XU, 2010).

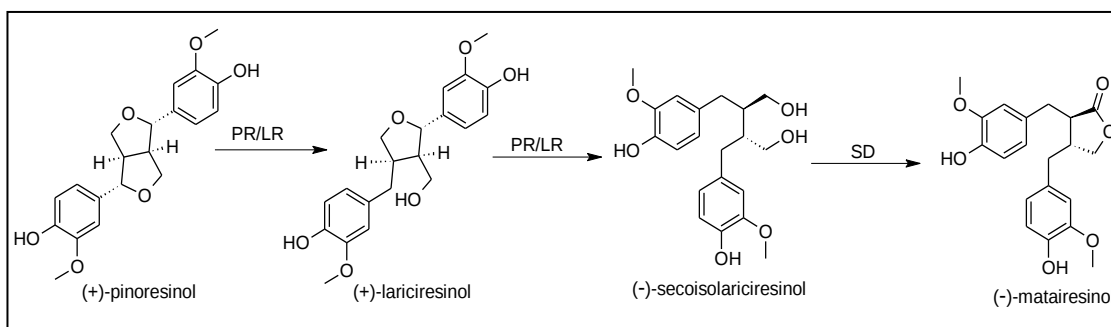
Figura 10: Via biossintética do (-)-secoisolariciresinol em *Forsythia intermedia* com atuação da enzima dirigente e da pinoresinol-lariciresinol redutase (PR/LR)(FORD et al., 2001).



Outra importante via biossintética bastante estudada é das lignanas ariltetraidronaftalênicas (podofilotoxina e seus derivados). Apesar destes estudos não estarem ainda totalmente concluídos, as etapas iniciais da biossíntese da podofilotoxina ocorre necessariamente pela formação do

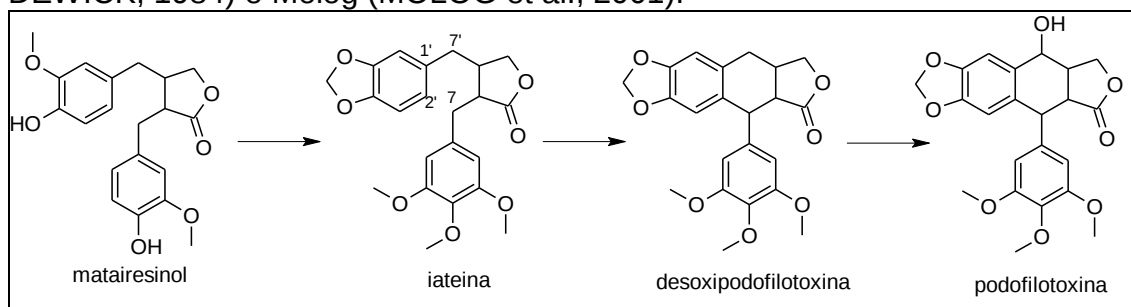
pinoresinol e pela redução enantiospecífica deste ao secoisolariciresino (XIA et al., 2000). O secoisolariciresinol é então convertido no matairesinol (RAHMAN et al., 1990; UMEZAWA et al., 1990) (Figura 11, p. 16). Um estudo utilizando fenilpropanóides marcados com ^{13}C incorporados a culturas de células em suspensão de *Linum álbum*, confirmam que o ácido ferúlico é precursor da podofilotoxina (SEIDEL et al., 2002).

Figura 11: Via de formação do matairesinol a partir do pinoresinol e atuação das enzimas pinoresinol-lariciresinol redutase (PR/LR) e secoisolaricicol desidrogenase (SD).



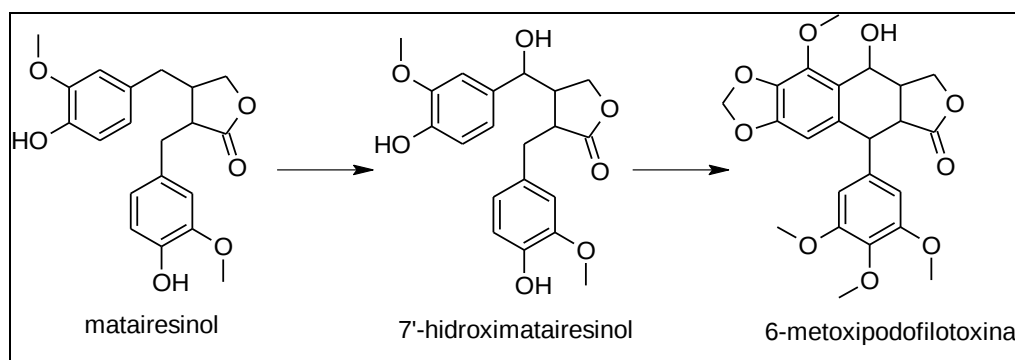
As etapas biossintéticas a partir do matairesinol apresentam divergências. Duas teorias têm sido defendidas sobre a biossíntese de podofilotoxina a partir de matairesinol. A primeira teoria data da década de 80 e provou que matairesinol, iateína e desoxipodofilotoxina podem ser convertidos em podofilotoxina (JACKSON; DEWICK, 1981; JACKSON; DEWICK, 1984). Esta rota, que sugere que a oxidação na posição 7' seja a última etapa de formação da podofilotoxina, foi confirmada por Molog e colaboradores (2001) (Figura 12, p. 16).

Figura 12: Biossíntese proposta para formação da podofilotoxina a partir do matairesinol segundo Jackson (JACKSON; DEWICK, 1981; JACKSON; DEWICK, 1984) e Molog (MOLOG et al., 2001).



A segunda teoria baseia-se na observação de Xia e colaboradores (2000) de que a incorporação de matairesinol marcado com ^{13}C às raízes de *Linum flavum* resulta na formação de 7-hidroximatairesinol e posteriormente da 6-metoxipodofilotoxina (Figura 13, p. 17). Estes dados mostram contradição quando comparados com aqueles discutidos anteriormente (JACKSON; DEWICK, 1981; JACKSON; DEWICK, 1984; MOLOG et al., 2001), pois sugere que a hidroxilação da posição 7' ocorre antes do fechamento do anel nas posições 2 e 7. Esta segunda teoria é menos aceita, pois em condições normais, o 7'-hidroximatairesinol não é encontrado em *Linum flavum*.

Figura 13: Biossíntese proposta para formação da 6-metoxipodofilotoxina a partir do matairesinol segundo Xia (XIA et al., 2000).



Na química moderna e multidisciplinar com enfoque na metabolômica e proteômica, os estudos de biossíntese das diversas classes de metabólitos naturais se configuram em uma importante ferramenta para o entendimento e para a conectividade destas ciências, tornando-se fundamental. Apesar de muito difundida, a biossíntese dos produtos naturais é, entre as áreas de fronteira da química, uma das mais recentes e representa, nos conceitos e na metodologia, a intersecção da química orgânica com a biologia molecular. Com efeito, o conhecimento dos mecanismos biossintéticos, investigados a partir do momento em que os radioisótopos ficaram disponíveis no final da Segunda Grande Guerra, está hoje no cerne de inúmeras atividades do químico de produtos naturais, quer se trate de intervenções nas indústrias farmacêutica, fermentativa, ou alimentar, quer se trate de problemas das áreas da toxicologia, agricultura ou remediação ambiental (LOBBO and LOURENÇO, 2007).

1.5. Determinação da configuração absoluta dos compostos orgânicos quirais.

Considerando a grande importância biológica das substâncias derivadas de produtos naturais, e a complexidade quiral que elas apresentam, é imprescindível o conhecimento da configuração absoluta e a relação dos diferentes isômeros com suas respectivas propriedades medicinais. Diversos exemplos mostram que, enantiômeros diferentes podem possuir propriedades diferentes levando desde a perda da atividade terapêutica até efeitos colaterais desastrosos, como é o caso clássico da talidomida na qual, o isômero dextrógiro é sedativo e o isômero levógiro é teratogênico (KASPRZYK-HORDERN, 2010). Outro exemplo é o limoneno, cujo enantiômero *S* é responsável pelo odor de limão, enquanto que o *R* é responsável pelo odor de laranja (CLAYDEN et al., 2001).

A determinação da configuração absoluta (CA) de compostos orgânicos quirais é, muitas vezes, um problema difícil de resolver (FREEDMAN et al., 2003). Isto é especialmente crítico no caso de substâncias naturais que possuem mais de um centro quirático e mostram, geralmente, excesso enantiomérico (STEPHENS, DEVLIN E PAN, 2008).

Muitos métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos para resolver este problema, incluindo difração de raios X (FLACK; BERNARDINELLI, 2008), os métodos de RMN (SECO; QUIÑÓÁ; RIGUERA, 2004) ou síntese orgânica estereocontrolada. No entanto, o primeiro método exige cristais únicos de elevada qualidade, enquanto que o último é geralmente laborioso, demorado e caro (SADLEJ; DOBROWOLSKI; RODE, 2010). Além disso, nenhum dos métodos acima descritos permite a avaliação direta da estereoquímica absoluta em solução, sem derivatização, se configurando em alternativas muitas vezes inviáveis, principalmente devido às baixas concentrações das substâncias nas matrizes naturais em análise. Como uma alternativa, os métodos quirópticos, tais como dicroísmo circular vibracional (DCV), dicroísmo circular eletrônico (DCE), atividade óptica Raman e dispersão rotatória óptica (DRO), que resultam da interação diferencial de uma molécula quiral com luz circularmente polarizada para esquerda e direita, ganharam uma atenção crescente (POLAVARAPU, 2008). A confiança na utilização destes métodos vem do

desenvolvimentos de cálculos quânticos para prever espectros vibracionais e eletrônicos de maneira confiável, bem como a disponibilidade de instrumentação dedicada a estes experimentos.

A técnica de DCV foi descrita pela primeira vez em 1974 (HOLZWARTH et. al, 1974), mas o primeiro instrumento comercial dedicado à medidas de DCV só chegou ao mercado em 1997, com o lançamento do ChiralIR™ pela Bomem/BioTools. O desenvolvimento desse equipamento foi baseado em um instrumento descrito em 1979 (NAFIE; DIEM; VIDRINE, 1979), o qual permitia a medida simultânea dos espectros no IV e de DCV, em uma ampla região do espectro eletromagnético, graças às vantagens introduzidas pela espectroscopia no IV com transformada de Fourier (IV-TF) (NAFIE, 2008). DCV é a extensão do DCE em regiões do espectro de infravermelho e infravermelho próximo (acima de 3000 cm^{-1}) onde as transições vibracionais ocorrem no estado eletrônico fundamental da molécula (FREEDMAN et al., 2003).

Esta técnica tem muitas vantagens sobre os outros métodos amplamente utilizados, já que não há necessidade de monocristais, derivatização ou a presença de cromóforos no UV-vis, sendo este último essencial para DCE. Devido à riqueza de bandas e da sensibilidade do DCV para conformações moleculares, não só é viável a determinação da estereoquímica absoluta, mas também a análise conformacional das moléculas em solução (SADLEJ; DOBROWOLSKI; RODE, 2010). A determinação da configuração absoluta de compostos orgânicos utilizando DCV inclui inicialmente o cálculo dos espectros, tanto no IV quanto de DCV, de um dos enantiômeros possíveis, arbitrariamente escolhido, por método *ab initio* e pela aplicação da teoria do funcional de densidade (TFD), sendo que essa última rendeu o prêmio Nobel em Química aos pesquisadores Walter Kohn e John Pople, em 1998. Diferentes níveis de teoria são possíveis, sendo que a melhor metodologia deve ser escolhida considerando características intrínsecas a cada uma das moléculas avaliadas. Após os cálculos, os espectros experimentais obtidos na região de IV médio ($1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) são comparados com os espectros preditos e, caso as bandas majoritárias (efeitos Cotton) presentes estejam de acordo com as calculadas, em relação à magnitude e sinal, a configuração absoluta escolhida para os cálculos corresponde àquela da amostra desconhecida. Se, no entanto, uma mesma magnitude com sinais

opostos for encontrada, a configuração absoluta é oposta àquela calculada (NAFIE, 2008). Como o DCV configura-se na superposição linear dos espectros de confôrmeros isolados, não só a determinação da configuração absoluta é possível, mas também da composição quali- e quantitativa dos confôrmeros em solução (BÜRGI; VARGAS; BAIKER, 2002).

O DCV associado aos cálculos quânticos para determinação da configuração absoluta de moléculas orgânicas quirais apresenta-se como uma ferramenta extremamente útil e versátil na elucidação estrutural destes compostos, auxiliando na melhor compreensão das rotas biossintéticas associadas a eles.

1.6. A dinâmica metabólica dos produtos naturais.

Como mencionado anteriormente, as plantas são importantes fontes de produtos naturais. O estudo das substâncias biossintetizadas pelo metabolismo secundário dos vegetais vem aumentando, e a maioria dos pesquisadores está em busca de substâncias biologicamente ativas. Além disso, muitas das substâncias se constituem em modelos para síntese de fármacos, que é de grande interesse comercial.

Em 2008, o Ministério da Saúde brasileiro instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e em fevereiro de 2009 divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renisus). Nesta lista, constam 71 plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, dentre as quais constam: *Cynara scolymus* (alcachofra), *Maytenus aquifolium* (espinheira santa), *Schinus terebenthifolius* (aroeira da praia) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato). Estas espécies são usadas com base na sabedoria popular para tratamentos de distúrbios digestivos, de gastrite e úlceras e de dores articulares, respectivamente, e tiveram suas atividades confirmadas cientificamente (disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1336).

Porém, para ser considerado um fitoterápico de confiança, o material vegetal necessita de critérios de análise para padronização e certificação

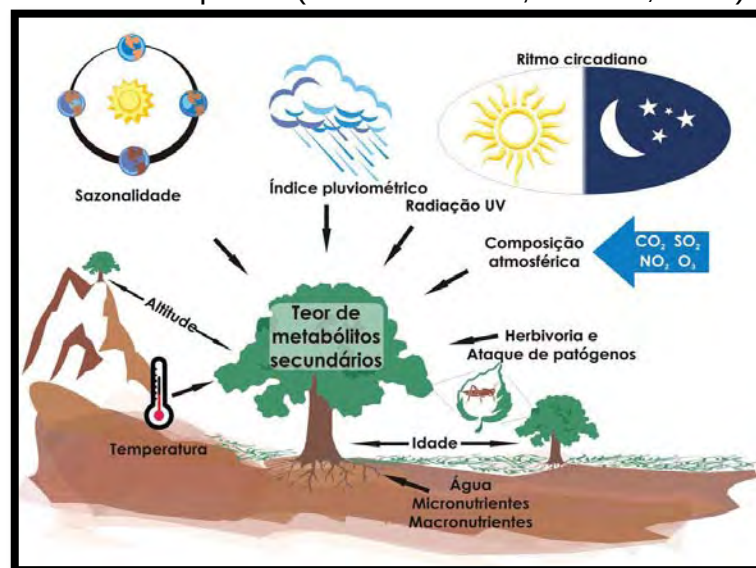
destes medicamentos e, para isso, é imprescindível conhecer a variabilidade química da espécie vegetal em questão.

A diversidade estrutural e variabilidade inter- e intra-específica são as características mais notáveis no metabolismo secundário, porém a diversidade química em plantas não é incidental, é provocada especificamente por rotas biossintéticas organizadas, controladas e integradas ao metabolismo. Há muitos fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários em determinadas espécies. Deve ser enfatizado, porém, que os estudos sobre influência destes fatores na produção de metabólitos secundários geralmente têm se limitado a um grupo restrito de espécies, predominantemente ocorrentes em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e podem ter sofrido fortes pressões seletivas antrópicas visando certas características desejadas. Seu comportamento, portanto, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat (GOBBO NETO e LOPES, 2007).

Além disso, alguns dos fatores como desenvolvimento, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, entre outros, podem apresentar correlações entre si e não atuar apenas isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário (GOBBO NETO e LOPES, 2007) (Figura 14, p. 22).

Esses fatores ambientais podem influenciar diretamente a concentração dos metabólitos presentes em uma determinada espécie ou na dinâmica envolvida na sua produção, tornando fundamental o conhecimento de quais fatores ou quanto eles podem influenciar na produção de substâncias de interesse farmacológico, agrícola ou ecológico.

Figura 14. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta (GOBBO NETO; LOPES, 2007).



Um exemplo de estudo que avaliou fatores externos nos teores de metabólitos produzidos por uma espécie vegetal é o que relata o cultivo de *Maytenus aquifolium* em diferentes estações do ano. A partir dos resultados, foram constatadas variações sazonais significativas na composição química das folhas de *M. aquifolium*. Esse fato mostra que a utilização dessa espécie como matéria-prima para uso como fitoterápicos requer a padronização do cultivo e coleta da mesma (YARIWAKE et al., 2005).

Outra espécie vegetal bastante estudada do ponto de vista da dinâmica metabólica é a *Hypericum perforatum*. Esta espécie é conhecida como Erva de São João, e biossintetiza metabólitos do tipo hipericinas, hiperiforinas, bem como flavonoides, que apresentam propriedades medicinais importantes incluindo antidepressivas, antivirais e antiinflamatórias (BAHLS, 2005). Como resultado deste estudo, observou-se grande variação da produção destes metabólitos em diferentes estágios de maturação da planta, contribuindo nos processos de plantação e colheita dessa espécie quando para fins terapêuticos (FILIPPINI et al., 2010).

Estudos como estes citados e outros que visam compreender a presença ou ausência e a variabilidade dos metabólitos nos organismos são de grande importância, porém escassos. O interesse da maioria dos pesquisadores ainda está em isolar e identificar as substâncias biologicamente ativas, não tendo como foco o entendimento ou a avaliação da variabilidade e a

importância que estes metabólitos desempenham na conservação da espécie e do ecossistema. Este comportamento deve-se principalmente ao fato de se tratar geralmente de um trabalho bastante árduo e longo (FILIPPINI et al., 2010).

A fim de fortalecer as pesquisas em produtos naturais relacionadas à dinâmica metabólica de plantas medicinais, novas abordagens de separação, identificação e quantificação estão sendo desenvolvidas para acelerar o processo de seleção de substâncias químicas que possuam valores farmacológicos. Dentre elas podemos destacar a implementação de ferramentas quimiométricas que auxiliam no planejamento e otimização experimental. A química analítica oferece um vasto número de exemplos de sistemas multicomponentes, com amostras complexas e frequentemente com muitas espécies a serem analisadas simultaneamente (como é o caso dos estudos genômicos, proteômicos e metabolômicos) ou poucos analitos na presença de muitos interferentes (como em amostras ambientais). A necessidade de uma instrumentação mais complexa para analisar estes sistemas de forma eficiente exige, da mesma forma, ferramentas computacionais para manipular e interpretar as informações obtidas (JUAN e TAULER, 2006).

A quimiometria pode ser definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (OTTO, 2007). Os métodos utilizados na quimiometria, a princípio, foram desenvolvidos em outras disciplinas que com a aplicação e pesquisas voltadas para o tratamento de dados químicos acabou dando origem a uma nova área dentro da química analítica. Isso se deu após a segunda metade dos anos 60, com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química que promoveu a geração de uma grande quantidade de dados. Até este período, os químicos baseavam suas decisões em uma pequena quantidade de dados que, na maioria das vezes, eram obtidos de forma lenta e dispendiosa. A partir dos anos 60, o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas possibilitou um grande aumento na obtenção de dados, o que resultou na necessidade de criar novos métodos para analisá-los de forma rápida, gerando a maior quantidade de informações relevantes. Foi então, que

teve início a pesquisa e utilização dos métodos matemáticos e estatísticos, resultando em uma nova área conhecida como quimiometria (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; OTTO, 2007).

Com o avanço da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas com aplicações distintas conforme o objetivo do estudo como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados, as determinações quantitativas, entre outros. Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, pode-se extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos, podendo melhorar e aperfeiçoar o trabalho realizado. Esses métodos são ferramentas poderosas, com as quais vários objetivos específicos podem ser alcançados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Ao invés de utilizar o senso comum e variar um fator de cada vez para encontrar condições otimizadas de análise, é razoável propor a variação de todos os fatores simultaneamente. A razão para isso é que as variáveis podem influenciar-se mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. As nomenclaturas adotadas para esse procedimento são a propriedade de interesse chamada resposta, as variáveis que em princípio influenciam a resposta são os fatores e a função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos. Quando isso não é feito da forma apropriada, o resultado muitas vezes é uma grande quantidade de números estéreis, da qual estatístico algum conseguiria tirar quaisquer conclusões. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. Dependendo do que se deseja, algumas técnicas são mais vantajosas que outras (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Outra necessidade essencial na determinação da dinâmica envolvida no metabolismo de produtos naturais é de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Estes parâmetros são cada vez mais exigidos, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros

irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser validado (RIBANI et al., 2004).

Segundo a resolução nº 899 da ANVISA (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método utilizado é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de determinadas substâncias em matrizes complexas. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados na validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico (SWARTZ, et al., 1998), e são aplicáveis às técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, que vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI, et al., 2004).

É importante ressaltar que a validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução. A estratégia de validação é específica ao objetivo do trabalho e é influenciada pelo procedimento analítico utilizado, pela natureza e concentração do composto de interesse e pela matriz (RIBANI et al., 2004).

Finalmente, um estudo de dinâmica metabólica bem planejado e com validação confiável, permite inferir a época do ano (sazonal) ou do dia (circadiana) onde há um maior acúmulo dos metabólitos de interesse, principalmente em espécies com potencial atividade terapêutica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho foram estudar os aspectos estruturais, funcionais, dinâmicos e biossintéticos das lignanas presentes em *Peperomia blanda*.

Os objetivos específicos foram:

- Determinação da configuração absoluta das secolignanas.
- Estudo da dinâmica metabólica sazonal das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas.
- Estudo biossintético das secolignanas e das lignanas tetraidrofurânicas com oxidação na posição C-9, presentes na espécie.
- Avaliação da atividade biológica frente à enzima tirosinase das substâncias isoladas de *P. blanda*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material botânico

Para realização do estudo químico e de dinâmica metabólica anual, as partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda* foram coletadas na reserva florestal da Ripasa (Parque Ecológico Fortaleza), no município de Araraquara – SP. A espécie foi identificada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães, e a exsicata está depositada no Instituto de Biociência da USP, São Paulo (K-547). Os dados meteorológicos relacionados aos meses de coleta foram cedidos pela empresa Ripasa que obtém diariamente estes dados na reserva. Para o mesmo estudo, o material também foi cultivado e coletado na casa de vegetação do Instituto de Química.

Para realizar os experimentos com a enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), foram utilizadas folhas de *Peperomia blanda*, *Peperomia obtusifolia* e *Piper tuberculatum* coletadas nos meses de novembro e dezembro, na casa de vegetação do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

Para os estudos biossintéticos de lignanas e secolignanas de *P. blanda* foram coletadas partes aéreas e raízes das plantas cultivadas na casa de vegetação do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, preferencialmente nos meses de julho e novembro.

3.2. Cromatografia

Para cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica foi utilizado um cromatógrafo SHIMADZU, constituído por quatro bombas SHIMADZU modelo LC-10 e um detector UV/VIS com arranjos de diodos, modelo SPD-M20A Proeminence.

As colunas cromatográficas analíticas utilizadas foram: coluna Phenomenex Luna LC -18, 250 x 4,60 mm, 5µm, e coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 x 4,60 mm, 5 µm.

Para cromatografia preparativa, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca VARIAN ProStar, equipado com duas bombas modelo SD-1 PrepStar e detector UV-Vis modelo 320.

A coluna preparativa utilizada foi Phenomenex, Phenyl-Hexyl, com tamanho 250 x 21,20 mm e partículas de 10 μm .

3.3. Solventes

Os solventes utilizados na obtenção e fracionamento dos extratos, assim como nas análises por CLAE, foram de grau HPLC (Merk). A água utilizada em todos os experimentos foi purificada antes do uso em sistema Milli-Q, Millipore.

Os solventes utilizados para preparo da amostra para os experimentos de ressonância magnética nuclear foram clorofórmio deuterado e metanol deuterado (99,8 %) da marca Merck.

3.4. Rotação específica da luz polarizada

As medidas da rotação específica da luz polarizada foram realizadas em polarímetro Perkin Elmer 241, com lâmpada de sódio, a 589 nm (linha D).

3.5. Dicroísmo circular eletrônico

Os espectros de DCE foram obtidos em detector Jasco modelo CD- 2095 Plus, cela de amostra de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm e volume de 44 μL . A linha de base dos espectros de DCE de cada amostra foi corrigida por subtração do espectro obtido para o solvente.

3.6. Infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram realizados em pastilhas de KBr no espectrômetro da Perkin-Elmer (FTIR) séries 1600.

3.7. Dicroísmo circular vibracional

Os espectros de DCV foram obtidos em espectrômetro Dual-PEM ChiralIR-2XTM FT-VCD (BioTools, Inc.), utilizando resolução de 4 cm^{-1} e tempo de aquisição de 12 horas. As medidas foram realizadas em CDCl_3 utilizando

cela de BaF₂ com caminho óptico de 100 μ m e volume de 100 μ L. Os desvios da linha de base foram eliminados pela subtração do espectro obtido para o solvente, em condições idênticas às aquelas utilizadas na amostra de interesse. Os dados experimentais foram processados utilizando o software Grams AI 9.0 (Thermo) e os espectros plotados com o software Origin Pro 8 (Origin Lab).

3.8. Eletroforese mono- e bidimensional.

A cuba utilizada na eletroforese SDS-PAGE 1D foi uma Hoefer Mighty Small Mini-vertical Units SE 260.

A eletroforese 2D foi realizada utilizando o sistema o Multiphor II para a focalização das proteínas, sendo que as tiras de gradiente de pH imobilizados (IPG) foram comercialmente obtidas na forma desidratada (GE Healthcare) e antes de serem utilizadas foram reidratadas em bandeja específica (DryStrip Reswelling Tray). Na segunda dimensão foi utilizada uma cuba de eletroforese SE 600 Ruby system

3.9. Espectrometria

3.9.1. Espectrometria de massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no espectrômetro ESI, modelo *LCQ Fleet*, da Thermo Scientific, sistema Accela, acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com sistema quaternário de bomba e injetor automático com detector de arranjo de diodos.

3.9.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C e espectrômetro Bruker Avance® III 600 MHz, equipado com uma sonda criogênica TCI (¹H/¹³C/¹⁵N).

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz.

3.9.3. Espectrofotometria UV/Visível (UV/Vis)

As análises no UV/Vis foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/Visível modelo “Ultrospec 2100 pro UV/Visible”.

3.10. Reagentes

Os reagentes para síntese dos precursores biossintéticos utilizados foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. O sinapaldeído (aldeído *trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) apresenta 98% de pureza. O 4-alil-2,6-dimetoxifenol possui grau técnico (> 90%). O cloreto de paládio II apresenta 99% de pureza.

3.11. Padrões

Os padrões de lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas foram isolados de *P. blanda* e suas purezas foram determinadas por experimentos de ressonância magnética nuclear.

3.12. Outros Equipamentos

A centrífuga refrigerada utilizada durante o processo de extração enzimática é da marca SORVALL® RC PLUS.

O Freezer -86°C utilizado para o armazenamento dos extratos enzimáticos e frações é da marca FORMA Scientific.

A pesagem das amostras foi executada em balança analítica Mettler Toledo® modelo AG245, de capacidade máxima de 210 g.

A centrífuga utilizada durante processo de extração é da marca CELM COMBATE.

A extração foi auxiliada por equipamento de ultrassom ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Determinação da configuração absoluta de secolignanas de *Peperomia blanda*.

4.1.1. Dicroísmo circular eletrônico (DCE)

As substâncias, denominadas **1**, **2** e **3** foram inicialmente analisadas por DCE, sendo que medidas experimentais foram realizadas por injeção direta, em CHCl_3 , utilizando 1,0 mg/mL de cada isômero e cela de amostra com caminho óptico de 1,0 cm. A linha de base dos espectros experimentais foi corrigida pela subtração do espectro de DCE obtido para o solvente utilizado.

4.1.2. Dicroísmo circular vibracional (DCV)

Os espectros de DCV foram obtidos na Universidade de Syracuse, USA, com colaboração do Prof. Laurance A. Nafie. Para a substância **1**, foi utilizada uma solução de 6,5 mg em 100 μL de CHCl_3 , para a substância **2**, foi utilizada uma solução de 6,3 mg em 200 μL de CHCl_3 e para a substância **3** foi utilizada uma solução de 5,0 mg em 100 μL de CHCl_3 , todos em célula de BF_2 com caminho de 100 μm de comprimento.

4.1.3. Método computacional

Todos os cálculos utilizando a teoria do funcional de densidade (DFT) e teoria do funcional de densidade tempo-dependente (TDDFT) foram realizados a 25°C, ambos na fase gasosa utilizando o programa computacional Gaussian 09. Os cálculos foram realizados inicialmente para um dos isômeros, escolhido arbitrariamente. Buscas conformacionais foram realizadas ao nível molecular empregando os programas Hyperchem 7 e Spartan 08. Para o composto **1**, 17 confôrmeros foram obtidos (configuração relativa *E*) com diferença de no

máximo 6 kcal/mol do confômero de menor energia. Estes confômeros tiveram suas geometrias otimizadas e os sete confômeros de menor energia, que corresponde a 85% da distribuição de Boltzmann total, foram selecionados para o cálculo espectros DCE. O fator de Boltzmann para cada confômero foi calculado com base na energia livre de Gibbs. A TDDFT foi utilizada para calcular a energia de excitação (em nm), força rotacional e força dipolar no nível de teoria B3LYP/6-311++G (2d, 2p). As forças rotacionais calculadas das primeiras 20 transições eletrônicas foram simuladas em uma curva ECD. As transições de comprimentos de onda preditos foram utilizadas como tal sem qualquer escala.

Os espectros na região do infravermelho (IV) e de dicroísmo circular vibracional (DCV) para as substâncias **2** e **3** foram criados usando forças dipolares e rotacionais, os quais foram calculados no nível de teoria B3LYP/6-31G (d) e convertidos em absortividades molares ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os espectros foram plotados utilizando o software Origin. Para (2*R*,3*S*,5*R*)-**2**, 32 confômeros com energia relativa (configuração relativa *E*) com diferença de até 6 kcal/mol do confômero de menor energia foram selecionados e otimizados geometricamente. Entre os 16 confômeros com configuração relativa *E* com diferença menor que 1,5 kcal/mol, oito correspondem a 75% da distribuição de Boltzmann total, os quais foram selecionados para cálculo de DCE e DCV. Os mesmos oito confômeros de menor energia foram identificados para a substância (2*R*,3*S*,5*R*)-**3** e foram utilizados para gerar o diastereoisômero (2*R*,3*S*,5*S*)-**3**, pela inversão do estereocentro em C-5. A TDDFT também foi usada para calcular a energia de excitação (em nm), as forças rotacionais e as forças dipolares. As forças rotacionais calculadas das primeiras 10 transições eletrônicas foram utilizadas para simular uma curva de DCE. Para a simulação dos espectros no IV e de DCV, as conformações de menor energia foram otimizadas geometricamente e as forças dipolares e rotacionais foram calculadas no mesmo nível da teoria.

Os cálculos para a determinação da configuração absoluta foram realizadas em colaboração com o Dr. João Marcos Batista Junior, como parte de seu estágio na Universidade de Syracuse, USA (PDEE, BEX3686/09-4), sob supervisão do Prof Laurence A. Nafie.

4.2. Determinação da dinâmica metabólica sazonal das lignanas e secolignanas de *P. blanda*

4.2.1. Coleta e armazenamento do material botânico

As coletas das partes aéreas e raízes de *P. blanda* foram realizadas no dia 6 de cada mês no período matinal, durante os meses de julho de 2006 a julho de 2008, tanto na reserva da Ripasa quanto na casa de vegetação do Instituto de Química da UNESP. Em cada coleta eram colhidas cerca de 10 plantas inteiras e as partes aéreas e raízes eram separadas. Todo o material vegetal foi seco em estufa a 40°C por 4 dias, triturado em moinho pequeno e acondicionado em freezer a -80°C até o momento da preparação dos extratos.

4.2.2. Estratégia experimental

O estudo de dinâmica metabólica de lignanas de *Peperomia blanda* foi organizado em 5 etapas:

- preparação da amostra;
- desenvolvimento do método cromatográfico;
- validação do método cromatográfico;
- análise cromatográfica dos extratos;
- quantificação das lignanas de interesse para determinação da dinâmica metabólica sazonal envolvida em suas produções.

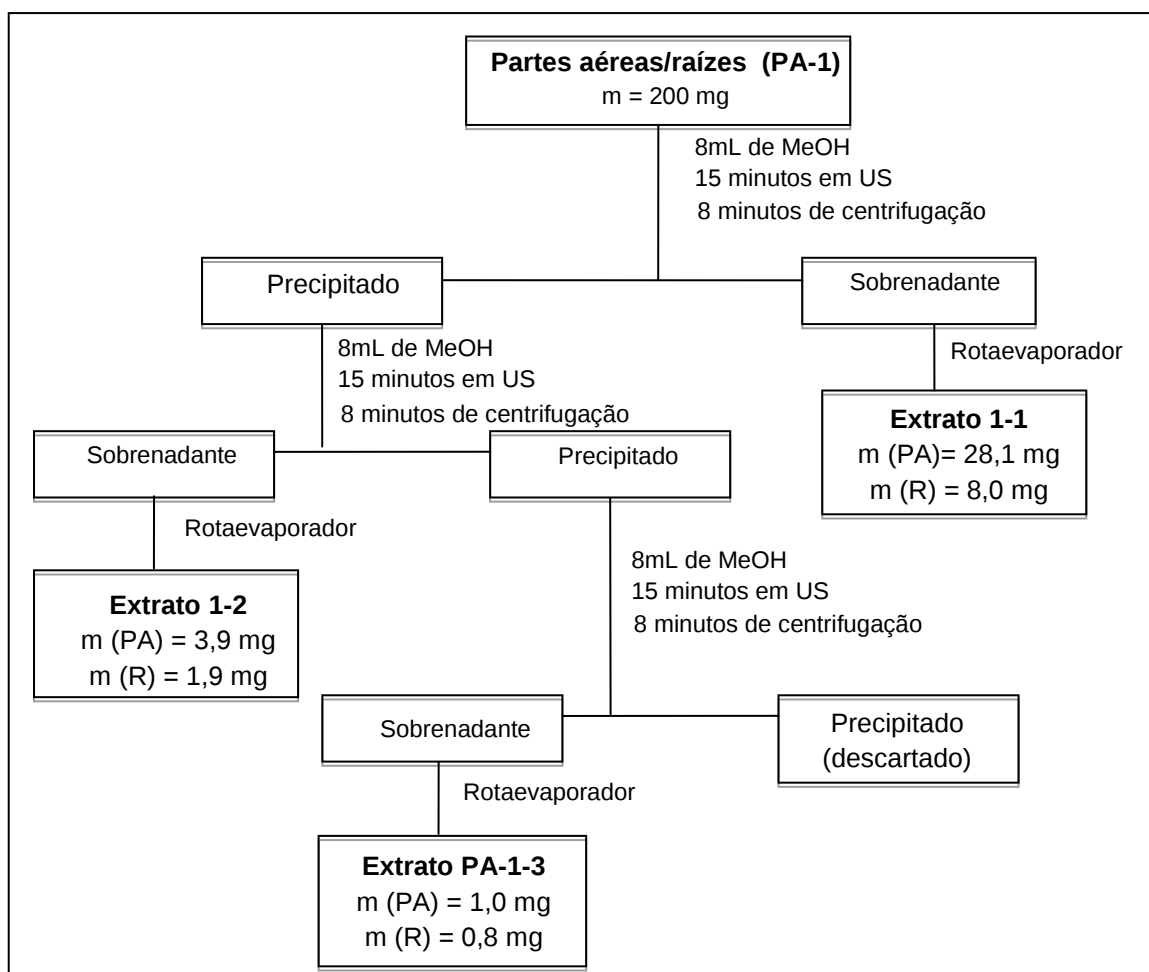
4.2.3. Preparo das amostras

As amostras escolhidas para serem analisadas e avaliadas quanto à dinâmica metabólica de lignanas de *P. blanda* foram compostas por partes aéreas e raízes de espécies coletadas da Reserva Florestal da Ripasa e na casa de vegetação do Instituto de Química. A espécie foi monitorada por um período de dois anos, obtendo-se no final 48 extratos.

Frente ao grande número de amostras a serem manuseadas, foram selecionadas técnicas que pudessem facilitar as etapas de extração e preparo das mesmas, considerando a eficiência na obtenção de extratos com maior teor das substâncias de interesse.

4.2.3.1. Determinação do melhor solvente extrator e número de extrações

Foram selecionados cinco solventes para avaliação do poder de extração das seis lignanas presentes em *P. blanda*, incluindo três lignanas tetraidrofurânicas e três secolignanas. Os solventes escolhidos foram: acetato de etila, metanol, etanol, isopropanol e uma mistura de hexano:acetato de etila (3:7). Foram pesados 200 mg de partes aéreas secas e moídas de *P. blanda* em tubos de centrífuga e adicionados 8 mL de solvente. Após 15 minutos em ultra-som (US), a mistura foi centrifugada por 8 minutos e o sobrenadante foi seco e pesado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes (Esquema 1, p. 35). Os extratos foram submetidos à extração em fase sólida (EFS) e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A condição cromatográfica utilizada foi: gradiente exploratório de 5 a 100% de MeOH, em 65 minutos, utilizando coluna Phenomenex C-18, 250 x 4,60 mm, 5 µm.

Esquema 1: Extrações das partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda*.

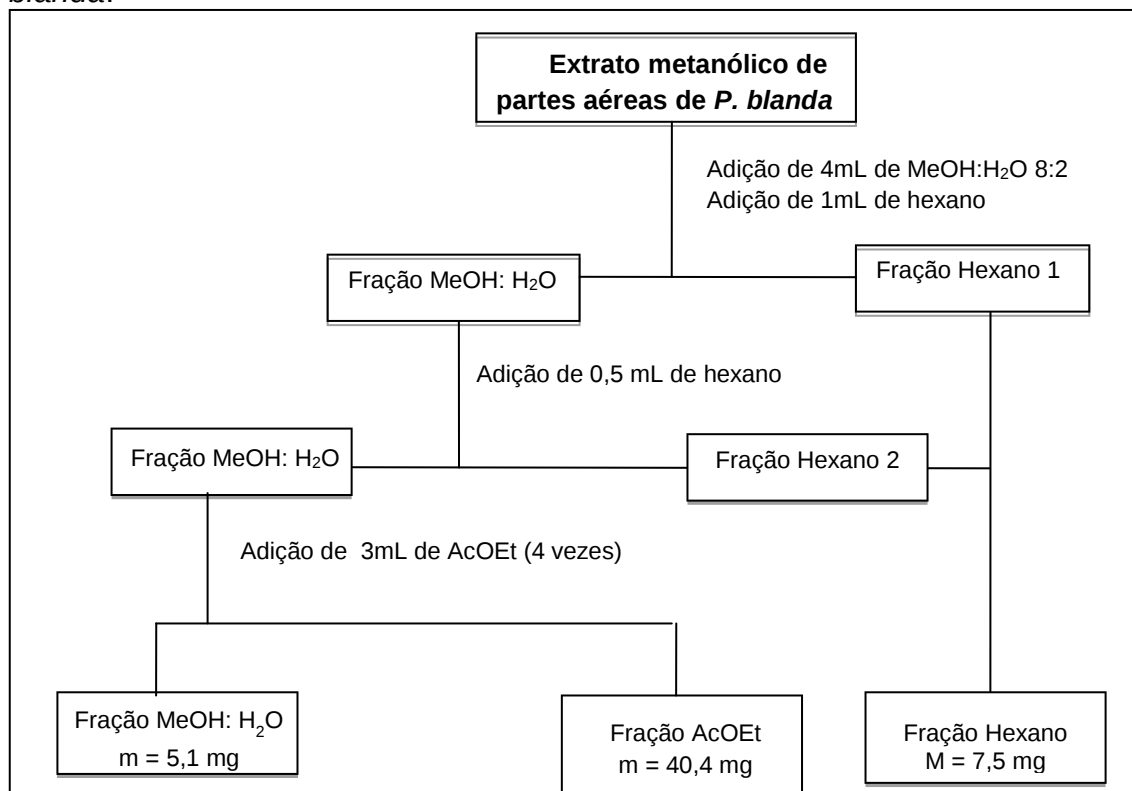
Para avaliar quantas extrações seriam necessárias para obter a concentração máxima das lignanas de interesse no menor número de procedimentos possíveis, foram realizados extratos de partes aéreas e raízes com metanol como descrito acima. A extração foi realizada quatro vezes para cada amostra. Os extratos obtidos foram analisados por CLAE, e as quantidades (em mg) dos extratos foram utilizados para determinar a contribuição de cada extração individual em relação ao total (soma das quatro extrações).

4.2.3.2. Limpeza dos extratos.

Foram avaliados dois procedimentos de preparação dos extratos preliminarmente às análises por CLAE: a extração em fase sólida (EFS) e a extração líquido-líquido (ELL) utilizando solventes de diferentes polaridades. Desta forma, foi obtido um extrato metanólico das partes aéreas de *P. blanda*, ressuspensionado em 2 mL de metanol e este foi dividido em duas alíquotas de 1 mL. Cada alíquota foi submetida a uma técnica distinta para eliminação de interferentes :

- extração líquido-líquido (ELL): 1 mL do extrato ressuspensionado foi colocado em tubo de ensaio e foi adicionado 3 mL de metanol e 1 mL de água. Esta solução foi extraída duas vezes com hexano (1,0 mL e 0,5 mL), e as frações hexano foram reunidas, secas e pesadas. Posteriormente foram realizadas quatro extrações com acetato de etila, seguida dos mesmos procedimentos realizados para a fração hexânica. A fração metanol/água restante também foi seca e pesada. Este procedimento foi realizado em triplicata (Esquema 2, p. 36).

Esquema 2: Extração líquido-líquido (ELL) dos extratos de *Peperomia blanda*.



- extração em fase sólida (EFS): 1mL do extrato ressuspendido foi colocado em béquer, adicionado água até atingir a proporção 95:5 MeOH:H₂O e aplicado em coluna SPE Strata (C-18-E 500 mg/3 mL). O cartucho foi previamente ativado com 3 mL de metanol e condicionado em fase móvel composta por MeOH:H₂O na proporção 95:5. Eluiu-se mais 4 mL desta fase móvel e a fração resultante foi seca e pesada. Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.4. Desenvolvimento do método cromatográfico.

4.2.4.1. Escolha da coluna cromatográfica

Foram realizadas análises em coluna analítica Phenomenex, C-18 , 250 x 4,60 mm, 5 micron e coluna Phenomenex Phenyl-Hexyl, 250 x 4,60 mm, 5 micron.

4.2.4.2. Seleção das condições cromatográficas

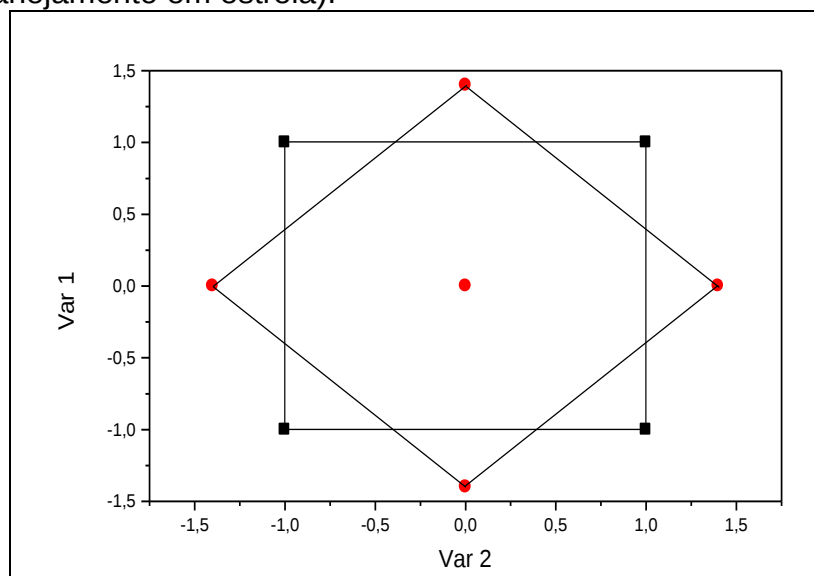
A. Tempo e fase móvel

Com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica obtida nos experimentos preliminares, inicialmente propôs-se um método para avaliar a influência do tempo e de diferentes proporções entre metanol e acetonitrila na fase orgânica da fase móvel, visando variar a força de eluição e a seletividade da fase móvel. Os cromatogramas foram adquiridos utilizando inicialmente um gradiente de 20 a 100% de fase orgânica (MeOH, ACN ou misturas dos solventes) em 65 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹

O planejamento fatorial composto central, também denominado planejamento em estrela, (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001, GALDÁMEZ, 2002) foi utilizado para otimizar as condições cromatográficas de análise (tempo de análise e porcentagem de ACN na fase orgânica da fase

móvel). A configuração de um experimento fatorial composto central com dois fatores ($k=2$) pode ser visualizada na Figura 15.

Figura 15. Representação gráfica do planejamento fatorial composto central (planejamento em estrela).



Os níveis dos fatores (tempo e proporção de ACN) foram codificados para facilitar a construção do planejamento experimental, remover as unidades de medidas dos fatores, colocar a origem do eixo das variáveis no valor intermediário e definir uma nova escala (Tabelas 2 e 3, p. 38 e 39). A partir do planejamento fatorial composto central foram realizados 21 experimentos (duplicata nas laterais e cinco repetições do ponto central).

Tabela 2: Níveis codificados utilizados no planejamento para tempo de análise e proporções de ACN.

Fatores	Níveis codificados				
	-1,4	-1	0	1	1,4
Tempo de análise (min)	40	55	70	85	100
% ACN	0	20	50	80	100

Tabela 3: Experimentos realizados (x) no planejamento em níveis codificados.

		Tempo de análise				
		-1,4	-1,0	0	1,0	1,4
% ACN	+1,4			X		
	+1,0		X		X	
	0	X		X		X
	-1,0		X		X	
	-1,4			X		

B. Temperatura da coluna e vazão da fase móvel.

A fim de avaliar a influência da temperatura do forno da coluna cromatográfica e da vazão da fase móvel, bem como selecionar as condições que propiciassem a melhor separação cromatográfica, utilizou-se um planejamento fatorial 3^2 (Figura 16, p. 39). A partir do planejamento fatorial escolhido, foram realizados nove experimentos com triplicata do ponto central.

Uma variação viável destes parâmetros foi escolhida, de acordo com as possibilidades do equipamento e da coluna cromatográfica (Tabela 4, p. 40).

Figura 16: Representação gráfica do planejamento fatorial 3^2 .

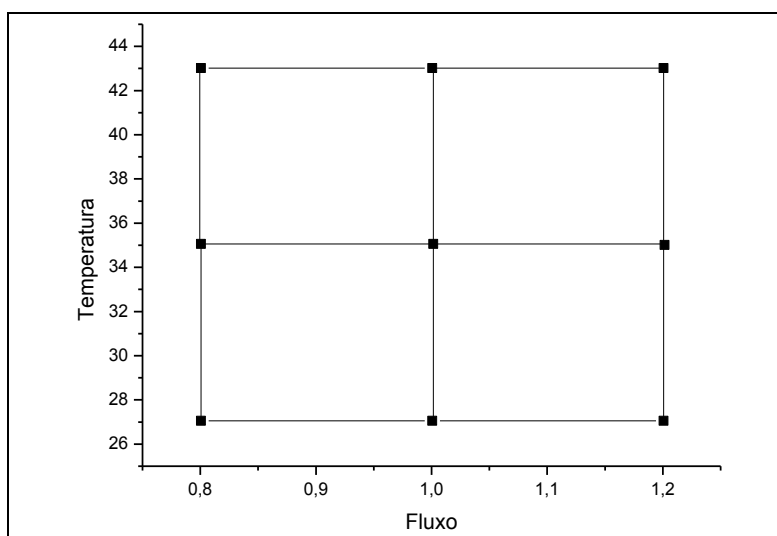


Tabela 4: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial para a coluna fenil-hexil.

Fator	Unidades	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Temperatura	°C	27	35	43
Vazão	mL/min	0,8	1,0	1,2

C. Fator resposta

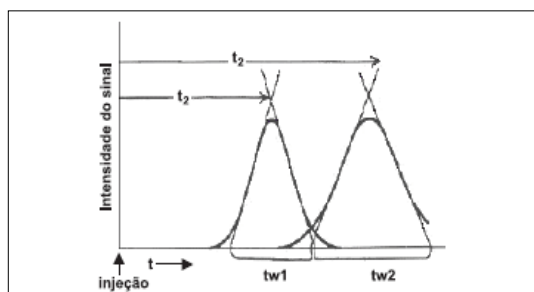
Utilizou-se para o planejamento estatístico o programa computacional *Statistica 7.0*. O fator resposta escolhido foi a resolução total (RT) do cromatograma em relação aos picos cromatográficos referentes às substâncias de interesse. A RT foi calculada da seguinte forma:

Primeiramente foram calculadas as resoluções (R_s) de todos os picos dos padrões em análise no cromatograma, utilizando a equação 1 e como ilustra a figura 17 (ARAGÃO et al., 2009).

$$R_s = 2Dt / (tw_1 + tw_2) \quad (1)$$

Onde: Dt é a medida da separação dos máximos de dois picos adjacentes; e tw_1 e tw_2 correspondem às larguras das bases dos picos, obtidas tangenciando-se as gaussianas até que interceptem a linha base (Figura 17, p. 40). Quanto maior o valor de R_s , melhor será a separação entre os picos de substâncias que eluem seguidamente.

Figura 17: Ilustração da determinação da resolução dos picos cromatográficos (ARAGÃO et al., 2009).



Para cada pico cromatográfico referente às lignanas de interesse, foram determinadas as resoluções em relação ao seu pico anterior e ao seu pico posterior, obtendo-se assim duas resoluções. As menores resoluções de cada

pico foram utilizadas para o cálculo da resolução total do cromatograma, a partir de uma média aritmética entre elas.

Os padrões das lignanas em análise foram injetados nas mesmas condições citadas para identificação dos mesmos nas amostras de extratos utilizados nos experimentos.

Utilizando o programa *Statistica 8.0* para processamento dos dados calculados, foi possível determinar equações matemáticas de regressão do conjunto de experimentos e gerar gráficos de contorno e de superfície de resposta a partir das equações de regressão.

4.2.5. Validação cromatográfica

4.2.5.1. Seletividade

O método escolhido para avaliar seletividade do método cromatográfico para as substâncias de interesse foi através do detector de arranjo de diodos presente no equipamento de CLAE. Este detector é capaz de avaliar a pureza de cada banda no cromatograma. Além disso, pode gerar um espectro no UV correspondente a cada substância.

Desta forma, foram preparados dois extratos com amostras das partes aéreas de *P. blanda*, a partir de diferentes épocas do ano, escolhidas aleatoriamente (janeiro de 2007 e maio de 2008), os quais foram analisados por CLAE-DAD, utilizando o método cromatográfico desenvolvido e otimizado anteriormente. Os picos correspondentes às lignanas de interesse foram identificados por semelhança do tempo de retenção com dos padrões injetados nas mesmas condições de análise dos extratos. A pureza de cada pico do extrato foi determinada a partir dos dados do detector DAD e por comparação de seus espectros no UV com os espectros dos padrões puros.

4.2.5.2. Robustez

A robustez do método desenvolvido foi determinada variando-se 2°C na temperatura otimizada da coluna (25°C e 29°C) e 2% na concentração inicial

de ACN da fase móvel (18% e 22%). Para isso, foi preparado um extrato e submetido às análises com as variações citadas, em triplicata, e os tempos de retenção e resoluções das lignanas foram comparados aos obtidos nas condições ótimas. O método cromatográfico utilizado foi o mesmo otimizado por planejamento experimental.

Foram avaliados ainda os parâmetros de estabilidade da amostra com diferentes tempos de estocagem após preparo. Para esta avaliação, foram comparados os cromatogramas de três extratos das partes aéreas de *P. blanda*, preparados como descrito no item 4.2.3.1 (p. 34), e analisados imediatamente após o preparo, e comparados àqueles armazenados por 6, 24, e 72 horas. As médias das variações de área dos picos relativos a cada substância foram utilizadas para análise da estabilidade de cada componente em solução.

4.2.5.3. Linearidade e intervalo

O método escolhido para avaliar a linearidade e o intervalo foi a construção das curvas analíticas destas substâncias, seguindo a lei de Lambert-Beer, que preconiza que a reta traçada deve passar por todos os pontos do intervalo.

Para a construção da curva analítica foram inicialmente avaliadas as respostas dos padrões das substâncias em análise em duas concentrações diferentes ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e suas áreas foram comparadas. Este procedimento teve como objetivo verificar se todas as substâncias apresentam respostas semelhantes frente ao detector (UV-DAD).

Após análise destes dados, foram construídas três curvas analíticas: uma para a classe das lignanas tetraidrofurânicas, uma para as secolignanas e uma para o padrão interno (licarina A).

Para realizar as diluições e a curva analítica foi preparada uma solução mais concentrada, a partir da pesagem do padrão, denominada *solução estoque*, e as soluções posteriores, preparadas por diluição da solução estoque, chamadas *soluções de trabalho*.

Com isso as curvas analíticas foram obtidas a partir das soluções-estoque preparadas com os padrões purificados em MeOH, e soluções de trabalho preparadas por diluição em metanol da solução estoque nas seguintes concentrações:

- substância **1** (mg.mL⁻¹): 4,00; 2,00; 0,75; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05.
- substância **6** (mg.mL⁻¹): 1,50; 1,00; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05; 0,01.
- licarina A (PI) (mg.mL⁻¹): 0,75; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05; 0,01.

A construção da curva foi realizada utilizando os recursos do programa Microsoft Office Excel 2007.

4.2.5.4. Precisão

A validação do método cromatográfico desenvolvido por CLAE-DAD, para análise do extrato das partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda*, envolveu a análise da precisão. A precisão foi determinada a partir da repetibilidade e da precisão intermediária.

A repetibilidade mede concordância entre resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e equipamento. Para isto, foi analisada uma mistura de padrões composta por benzeno e tolueno (0,1 mg.mL⁻¹ cada, em metanol) em seis replicatas, com intervalos de 30 minutos entre as análises. A partir dos cromatogramas obtidos calcularam-se os desvios padrão dos tempos de retenção e das áreas dos picos das substâncias de interesse, bem como o coeficiente de variação percentual (CV%) entre as análises.

A precisão intermediária mede a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes. Este experimento foi realizado utilizando a mesma mistura de benzeno e tolueno analisados em triplicata por seis dias. Os valores dos desvios padrão dos tempos de retenção e das áreas dos picos das substâncias de interesse, bem como dos coeficientes de variação percentual (CV%) entre as análises também foram calculados.

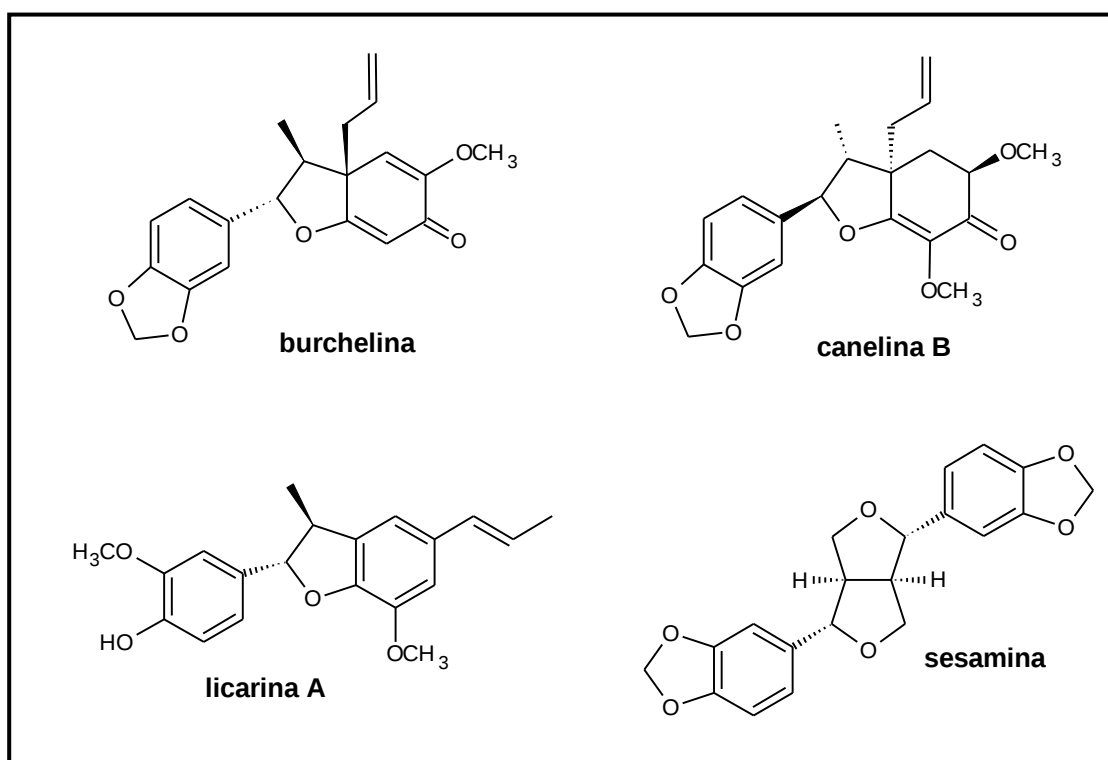
O método cromatográfico foi o mesmo otimizado para a matriz vegetal.

4.2.5.5. Exatidão e recuperação da amostra

A exatidão foi calculada pelo método de adição de padrão interno. Este mesmo método foi usado para avaliar a recuperação da amostra durante os processos de extração, extração líquido-líquido e análise. Para isto foi adicionado um padrão interno, a licarina A, no solvente extrator do material vegetal, na concentração inicial de 0,2 mg/mL.

Para a determinação do padrão interno foram avaliadas quatro tipos de lignanas: a sesamina, a burchelina, a licarina A e a canelina A (figura 18, p. 44), sendo que todas foram injetadas nas mesmas condições de análise dos extratos.

Figura 18: Substâncias testadas como padrões internos nas análises dos extratos de *Peperomia blanda*.



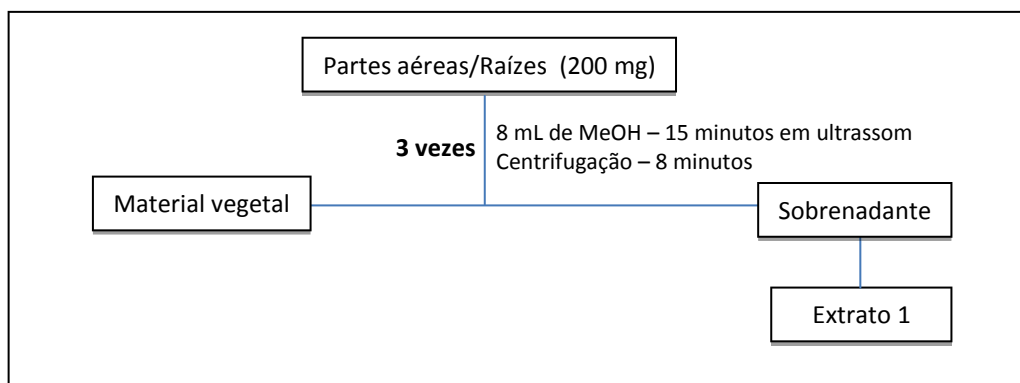
Os dados de recuperação da amostra foram obtidos a partir da comparação das concentrações finais do padrão interno utilizado, encontrados a partir da curva analítica previamente construída e as concentrações iniciais conhecidas.

4.2.6. Extração das amostras

Pesou-se 200 mg da amostra de cada mês, sendo partes aéreas ou raízes, em tubos de centrífuga. A cada um dos tubos foi adicionado MeOH com o padrão licarina A (0,2 mg dissolvidos em 8 mL de metanol), os quais foram colocados, por 15 minutos, em ultrassom (US) e posteriormente centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado e o precipitado, descartado após três extrações. O metanol contendo o padrão interno foi utilizado apenas na primeira extração. O procedimento está descrito no esquema 3 (p. 45).

Os extratos obtidos em cada etapa foram reunidos e secos em evaporador rotativo. A limpeza destes extratos foi realizada por extração líquido-líquido. Os procedimentos de extração e preparo da amostra foram realizados como descrito no item 4.2.3 (p. 33).

Esquema 3. Extrações das partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda*.



4.2.7. Análise cromatográfica dos extratos e quantificação da lignanas de interesse

A avaliação do perfil metabólico das lignanas e secolignanas de *P. blanda* foi realizada para amostras de meses alternados pelo ciclo de dois anos. Os meses escolhidos foram de setembro e novembro de 2006; janeiro, março, maio, julho, setembro e novembro de 2007 e janeiro, março, maio e julho de 2008. Após a preparação das amostras, estas foram ressuspensas em 1,0 mL de MeOH e submetidas à análise por CLAE. O método cromatográfico

utilizado foi mesmo otimizado por planejamento experimental: 20 a 100% de ACN na fase móvel em 85 minutos de análise, vazão 0,8 mL.min⁻¹, temperatura da coluna 27°C, λ 250 nm..

As lignanas de interesse na análise sazonal, bem como o padrão interno foram quantificadas a partir das curvas analíticas construídas previamente.

4.2.8. Determinação da dinâmica metabólica envolvida na produção das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas.

A dinâmica metabólica das lignanas e secolignanas foi proposta a partir dos cálculos de teor destas substâncias nas soluções analisadas por CLAE e por grama de material vegetal. Foram coletados os dados meteorológicos relacionados ao período de análise da planta, bem como os dados fenológicos da espécie como floração, frutificação e crescimento de raiz e avaliou-se a influencia destes fatores nas taxas de produção dos metabólitos.

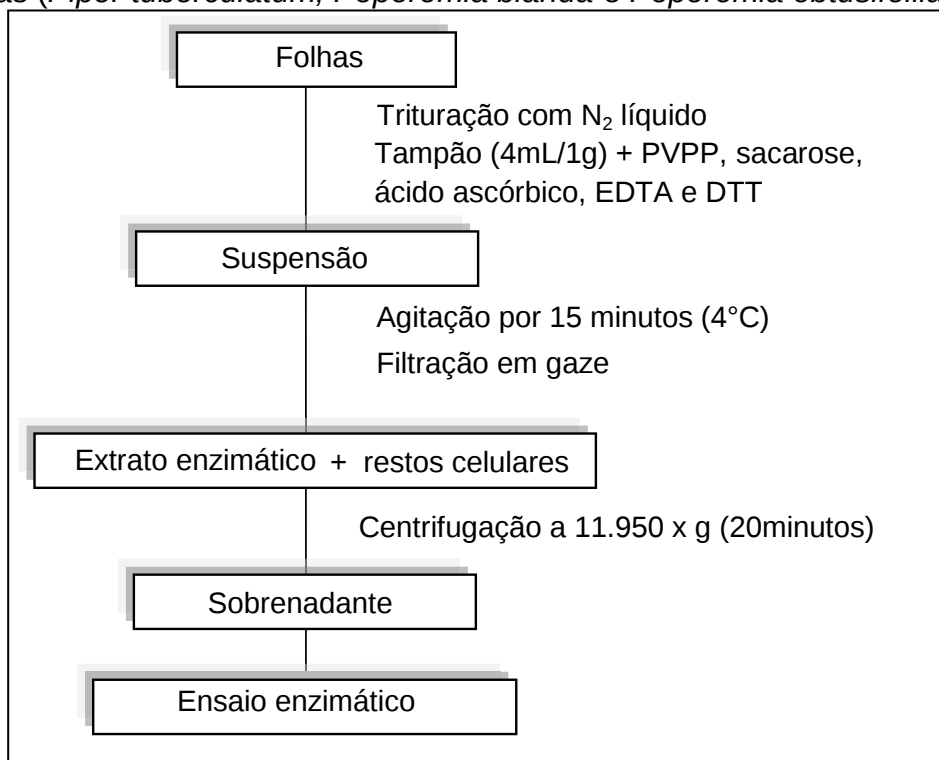
4.3. Determinação de protocolo de extração, concentração e otimização das condições reacionais da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) para diferentes espécies de Piperaceae.

4.3.1. Extração enzimática e otimização das condições reacionais.

A extração da enzima PAL das espécies de Piperaceae foi realizada utilizando-se 25 g de folhas trituradas em N₂ líquido com gral e pistilo. Foram adicionados 100 mL de solução tampão borato 0,1M (pH 8,8) contendo PVPP (10% m/m), sacarose (0,25 M), ácido ascórbico (40 mM), EDTA (1 mM) e DTT (5 mM).

A suspensão obtida foi agitada por 15 minutos em banho de gelo. O extrato foi filtrado em gaze para um tubo de centrifuga mantido a 4°C e centrifugado a 11.950 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi armazenado em banho de gelo e o precipitado foi descartado (Esquema 4, p. 47).

Esquema 4: Extração enzimática das espécies de Piperaceae analisadas (*Piper tuberculatum*, *Peperomia blanda* e *Peperomia obtusifolia*)



Com os extratos brutos de três espécies de Piperaceae (*P. blanda*, *P. obtusifolia* e *P. tuberculatum*) foram realizados experimentos para otimização das condições de reação da enzima PAL, utilizando como substrato a *L*-fenilalanina. Nessa etapa, utilizou-se um planejamento estatístico visando otimizar o trabalho de determinação das condições reacionais com poucos experimentos. Assim, o modelo escolhido foi de planejamento fatorial 3², que foi detalhado no item 4.2.4.2 (p. 37), sendo que as variáveis analisadas foram o pH e temperatura na incubação dos extratos com *L*-fenilalanina. Para isso, os fatores variados foram pH do tampão borato 0,1M (pH 7,8, 8,8 e 10,2) e temperatura (38, 50 e 60°C), seguindo a ordem descrita na tabela 5 (p. 48).

Tabela 5: Experimentos previstos a partir do planejamento experimental para avaliação do ótimo reacional da enzima PAL.

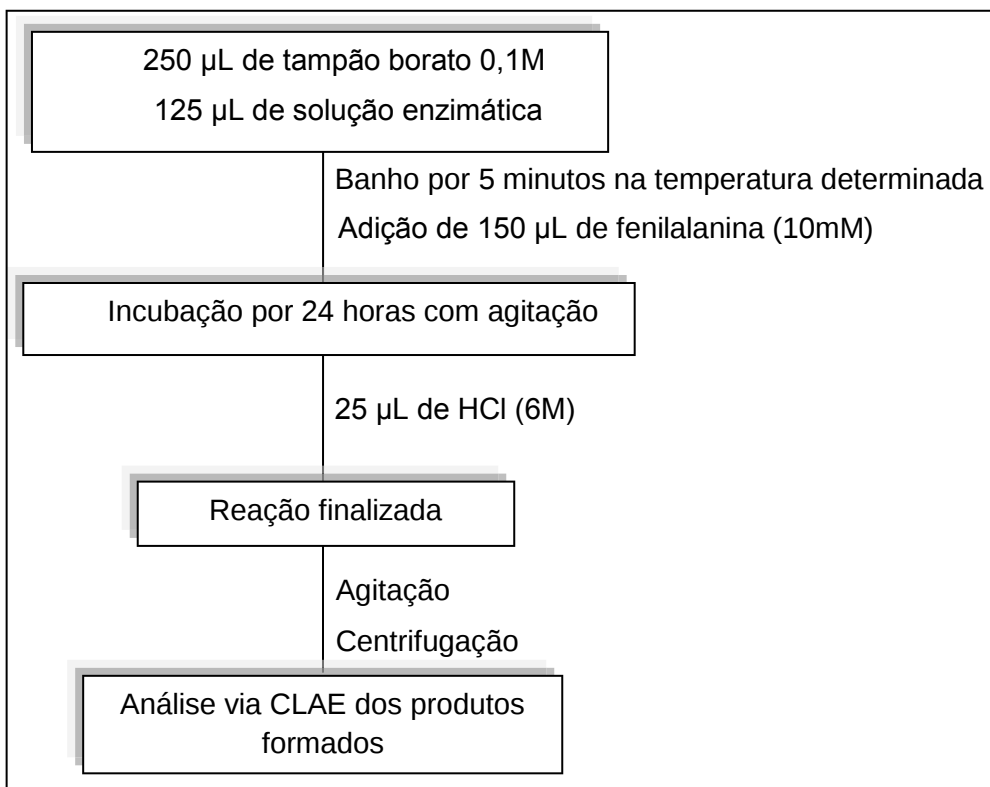
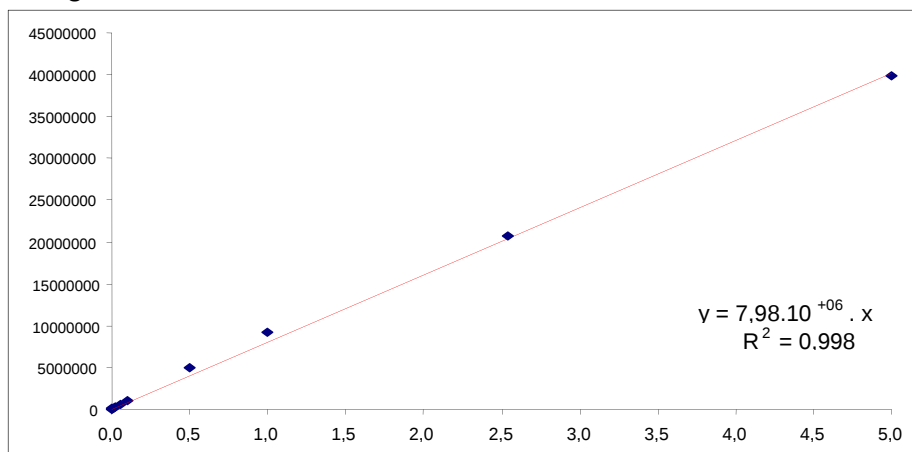
Experimento	pH do tampão borato de sódio 0,1M	Temperatura de incubação (°C)
1	7,8	38
2	7,8	50
3	7,8	60
4	8,8	38
5	8,8	50
6	8,8	60
7	10,2	38
8	10,2	50
9	10,2	60

O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se a um eppendorf, 250 μL de tampão borato 0,1M, 125 μL de solução enzimática ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) e 150 μL de *L*-fenilalanina (10 mM). As reações foram incubadas por 6 horas em banho com temperatura controlada e sob agitação. Após o tempo de incubação, a reação foi finalizada com a adição de 25 μL de HCl (6M). A solução foi agitada e centrifugada a 7.000 g por 1 minuto. Este experimento foi realizado em triplicata (Esquema 5, p. 49).

Os produtos das reações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando a fase móvel composta por MeOH:H₂O (+0,1% de HOAc) na proporção 1:1, coluna LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 μm), fluxo de 1mL.min^{-1} , e comprimento de onda de 275 nm.

A quantificação do ácido *trans*-cinâmico produzido em cada ensaio foi feita utilizando a curva analítica obtida em diferentes concentrações do mesmo (Figura 19, p. 49), sendo que as injeções foram realizadas nas mesmas condições experimentais das reações.

Esquema 5: Procedimento para reação enzimática da PAL.

Figura 19: Curva analítica do ácido *trans*-cinâmico

Experimentos de controle (brancos) das reações também foram preparados, utilizando-se somente o extrato enzimático ou somente os substratos, em duplicata. As reações controles foram submetidas a condições reacionais idênticas às das reações completas.

Os dados do planejamento experimental foram analisados utilizando o programa *Statistica 8.0*, em função da quantidade de ácido *trans*-cinâmico formado e o ótimo reacional foi estipulado.

Após determinação do ótimo reacional, novas extrações enzimáticas a partir das mesmas espécies foram preparadas utilizando os procedimentos experimentais mencionados. Os extratos brutos foram fracionados por precipitação salina com sulfato de amônio com o objetivo de concentrar e pré-purificar a PAL. A quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para atingir a saturação desejada foi determinada utilizando a tabela descrita por Englard (1990) (Tabela 6, p. 50).

Tabela 6: Precipitação com sulfato de amônio – concentração de sal a ser adicionado a 0°C.

saturação (%)	sulfato de amônio (g/L)
0 – 25	134
25 – 55	179
55 – 80	161

Primeiramente foi adicionado sulfato de amônio para atingir a saturação de 25%. Após todo o sal ter sido adicionado, a solução foi mantida sob agitação por 30 minutos a 4°C e posteriormente foi centrifugada a 16.300 x g por 30 minutos. O precipitado foi congelado a -80°C e o sobrenadante foi levado a 55% de saturação, como descrito anteriormente. Uma última adição de sulfato de amônio foi realizada para que o sobrenadante atingisse 80% de saturação.

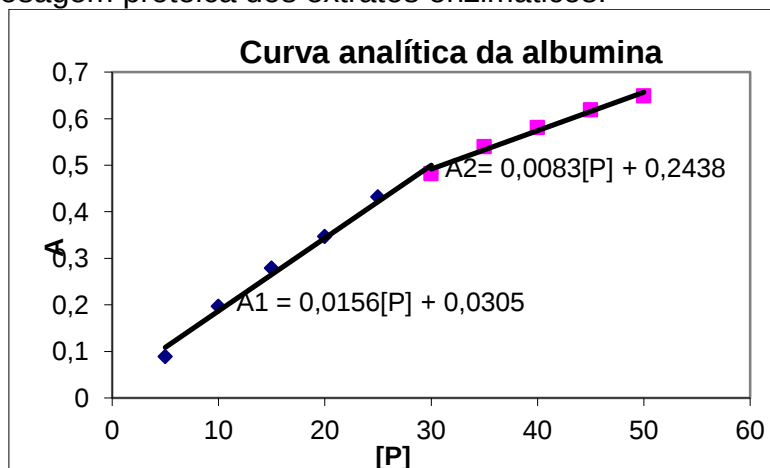
Os precipitados obtidos no fracionamento foram ressuspensos em 3 mL de tampão borato 0,1M e submetidos às reações enzimáticas como descrito para os extratos brutos.

4.3.2. Dosagem Proteica.

A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando-se o método de Bradford modificado com HCl. O reagente foi preparado adicionando-se Coomassie Blue à 500 mL de HCl 0,6 M até apresentarem absorvância entre 1,3 e 1,5, registrada a 465 nm. A curva analítica foi realizada utilizando albumina bovina (fração V) (Figura 20, p. 51). Foram utilizados volumes de 5 a 50 µL dessa solução, as quais foram colocadas em cubeta de

poliestireno e incubados com 1 mL de água e 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 minutos foram feitas leituras a 595 nm.

Figura 20. Curva analítica construída com albumina bovina (1 mg.mL^{-1}) para dosagem proteica dos extratos enzimáticos.



4.3.3. Eletroforese unidimensional.

4.3.3.1. Soluções e reagentes necessários

As soluções foram preparadas em água purificada e deionizada por sistema Milli-Q.

A. Tampão de Separação (pH=8,8)

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

B. Tampão de Concentração (pH=6,8)

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

C. Solução acrilamida-bisacrilamida

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

D. Bisacrilamida 2% p/v em água

E. Solução tampão de corrida (pH=8,3)

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

F. *Loading buffer*

Reagente	Concentração
TRIS-HCl 1,5 M (pH 6,8)	0,83 mL
glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
azul de bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	para 10 mL

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

4.3.3.2. Preparo das amostras e dos padrões

Após a dosagem proteica, as frações foram diluídas para uma concentração de 0,1 mg/mL em tampão de extração. As amostras foram preparadas misturando-se 15 μL destas frações com 5 μL de solução tampão de corrida (*loading buffer*) e foram aquecidas em banho a 100°C por 5 minutos.

Estas soluções foram então centrifugadas a 7.000 g por 30 segundos e posteriormente aplicadas no gel.

Os extratos e frações foram aplicados no gel juntamente com uma solução de padrões de peso molecular. Como padrão foi utilizado 10 μL de uma solução que continha as enzimas fosforilase, albumina sérica, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidora de tripsina e α -lactalbumina, com massas moleculares de 97.400, 66.200, 45.000, 31.000, 21.500 e 14.437 Da, respectivamente.

4.3.3.3. *Preparo, desenvolvimento e revelação do gel*

Foram preparados dois tipos de géis para o procedimento, o gel de concentração e o gel de separação. As proporções dos reagentes utilizados no preparo de cada gel estão indicadas abaixo. Primeiramente foi preparada a solução do gel de separação 12% e aplicado entre as placas de vidro previamente alocadas em suporte apropriado. Após sua polimerização, a solução do gel de concentração 12% foi preparada e aplicada sobre o gel de separação.

A. Gel de separação

Reagente	Gel 10%	Gel 12%
Tampão de separação	1,25 mL	1,25 mL
Solução acril-bisacrilamida	1,67 mL	2 mL
H ₂ O	2,05 mL	1,72 mL
PSA (10% p/v)	50 μL	50 μL
TEMED	7 μL	7 μL

B. Gel de concentração

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

Cada gel (12%) foi transferido para a cuba de eletroforese 1D e foi adicionado o volume necessário da solução tampão de corrida. Foi aplicada uma intensidade de corrente de 20 mA até o *loading buffer* atingir o final do gel. Neste momento, o gel foi desmontado e iniciou-se o processo de revelação com nitrato de prata (AgNO_3).

Para a revelação, o gel foi colocado em uma solução 10% de ácido tricloroacético, na qual permaneceu por uma hora, sob agitação. Esta solução foi então descartada e adicionou-se água destilada. O gel ficou sob agitação em água destilada por 30 minutos. A solução foi então descartada e adicionou-se uma solução de DTT (5 $\mu\text{g/ml}$), na qual o gel ficou sob agitação por mais 30 minutos. Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionou-se uma solução 0,1% de nitrato de prata, a qual foi devidamente descartada após 30 minutos. Em seguida foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 3%, que continha 0,085% de formaldeído, após 10-30 segundos esta solução foi descartada, adicionando-se outra vez a solução de carbonato de sódio e formaldeído. Após o aparecimento das bandas relativas as proteína, a reação foi finalizada adicionando-se uma solução 2,3 M de ácido cítrico até não se observar mais o desprendimento de CO_2 . Após 1 hora esta solução foi descartada, o gel foi lavado com água destilada por três vezes

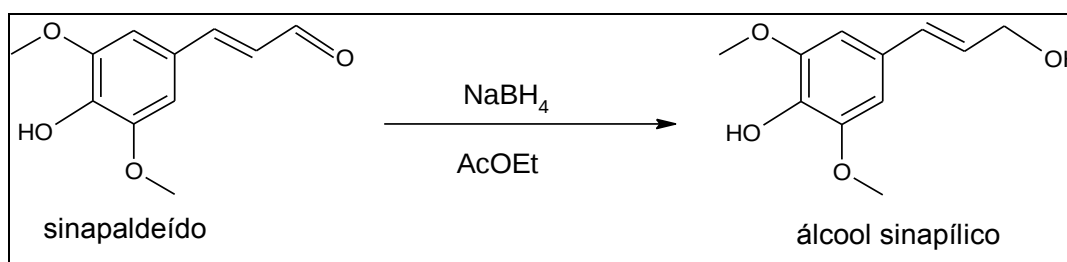
4.4. Estudo biossintético de dimerização das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de *Peperomia blanda* *in vitro*.

4.4.1. Síntese dos precursores

4.4.1.1. Álcool sinapílico

O álcool sinapílico foi preparado seguindo o protocolo descrito por Ludley e Ralph (1996). O reagente sinapaldeído (*trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamaldeído) foi dissolvido em 10 mL de acetato de etila e colocado em um balão de fundo redondo ($2,38 \cdot 10^{-4}$ M). Foi adicionado NaBH_4 na proporção 1:2 p/p em relação ao sinapaldeído e a solução foi agitada por 1 hora à temperatura ambiente, sob atmosfera de N_2 e protegido da luz. Após 1 hora, foram adicionados 50 mL de H_2O e realizada uma extração líquido-líquido utilizando 50 mL de acetato de etila (2 vezes). As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO_4 anidro, filtradas e concentradas. Os processos de extração, filtração e concentração também foram realizados sob abrigo de luz. O rendimento da reação foi de 93% (Esquema 6, p. 55).

Esquema 6: Síntese do álcool sinapílico

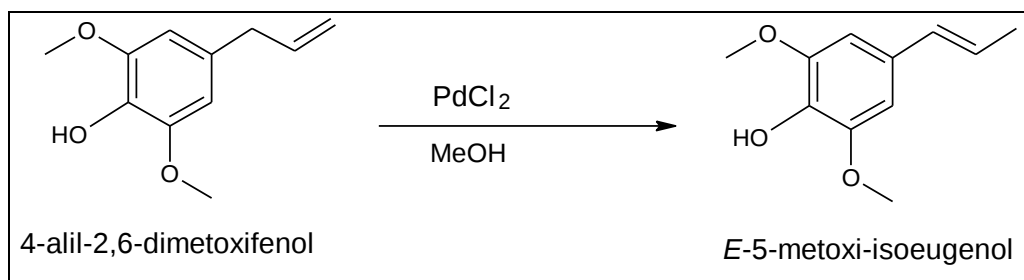


4.4.1.2. *E*-5-metoxi-isoeugenol

O *E*-5-metoxi-isoeugenol foi preparado seguindo o protocolo descrito por Jing e colaboradores (2001) com algumas modificações. O reagente 4-alil-2,6-dimetoxifenol foi dissolvido em 5 mL de metanol ($1,56 \cdot 10^{-4}$ M) em balão de fundo redondo coberto com papel alumínio para evitar contato com a luz. Foi

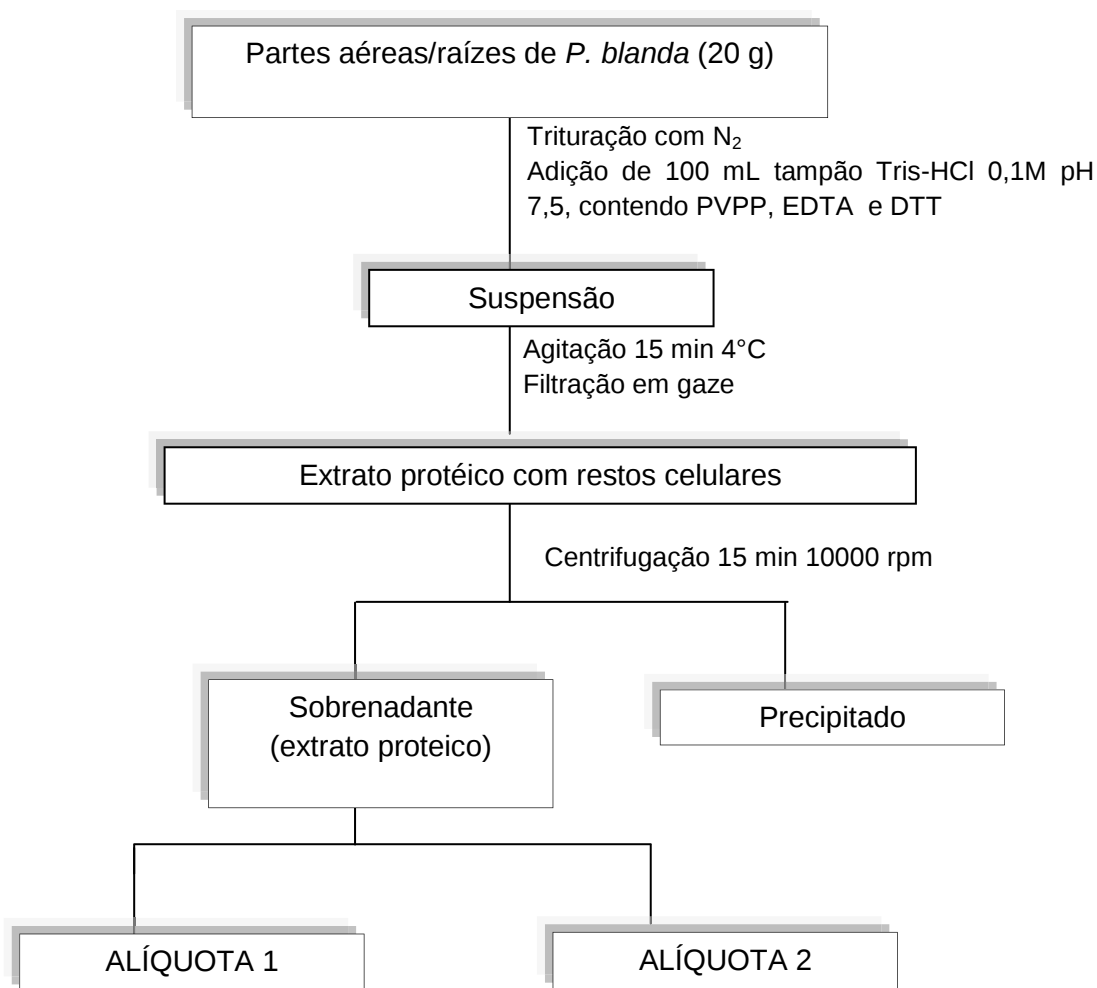
então adicionado 5 mg do catalizador PdCl_2 e a reação foi agitada em sistema fechado por 5 horas. Após o tempo de reação, a solução foi filtrada em filtro tipo Mollipore HPF 0,2 μm (Millex[®]) e imediatamente utilizada nas reações enzimáticas. O rendimento da reação foi de 80 % (Esquema 7, p. 56).

Esquema 7: Síntese do *E*-5-metoxi-isoeugenol



4.4.2. Procedimento para obtenção da fração enzimática solúvel e microsomal de partes aéreas e raízes *Peperomia blanda*.

Foram coletados 20 g de material vegetal (partes aéreas e raízes) de plantas adultas de *P. blanda* e imediatamente adicionado N_2 . Triturou-se utilizando gral e pistilo. Foram adicionados 100 mL de solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo 35 % p/p do PVPP, 1 mM EDTA e 10 mM DTT. A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 min. em banho de gelo, filtrada em gaze, e centrifugada a 8000 g por 10 minutos à 4°C. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas de 50 mL (Esquema 8, p. 57).

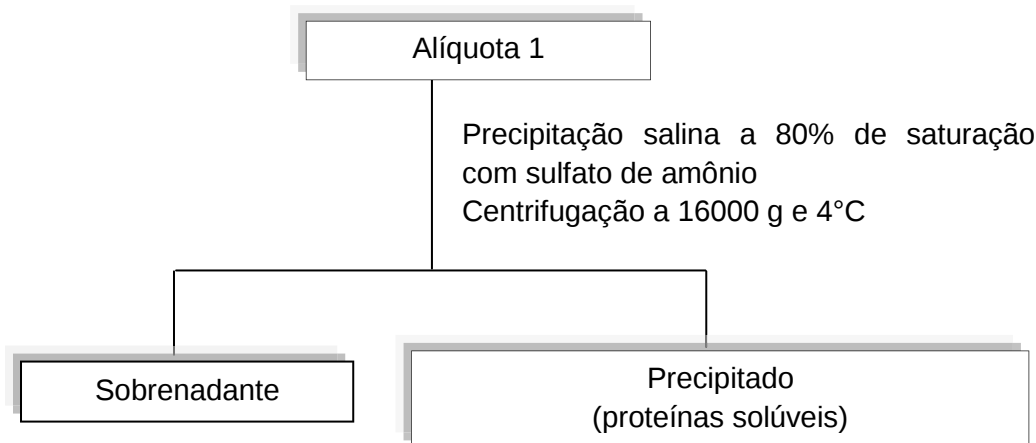
Esquema 8: Procedimento inicial para extração proteica de *P. blanda*.

A primeira alíquota foi submetida à precipitação salina com sulfato de amônio até 80% de saturação para concentração das proteínas solúveis do extrato e novamente centrifugado a 16000 g por 10 minutos à 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de tampão KPi (0,1M) pH 7,5 e submetido a uma coluna de Sephadex G-25 para dessalinização e retirada de substâncias endógenas (Esquema 9, p. 58).

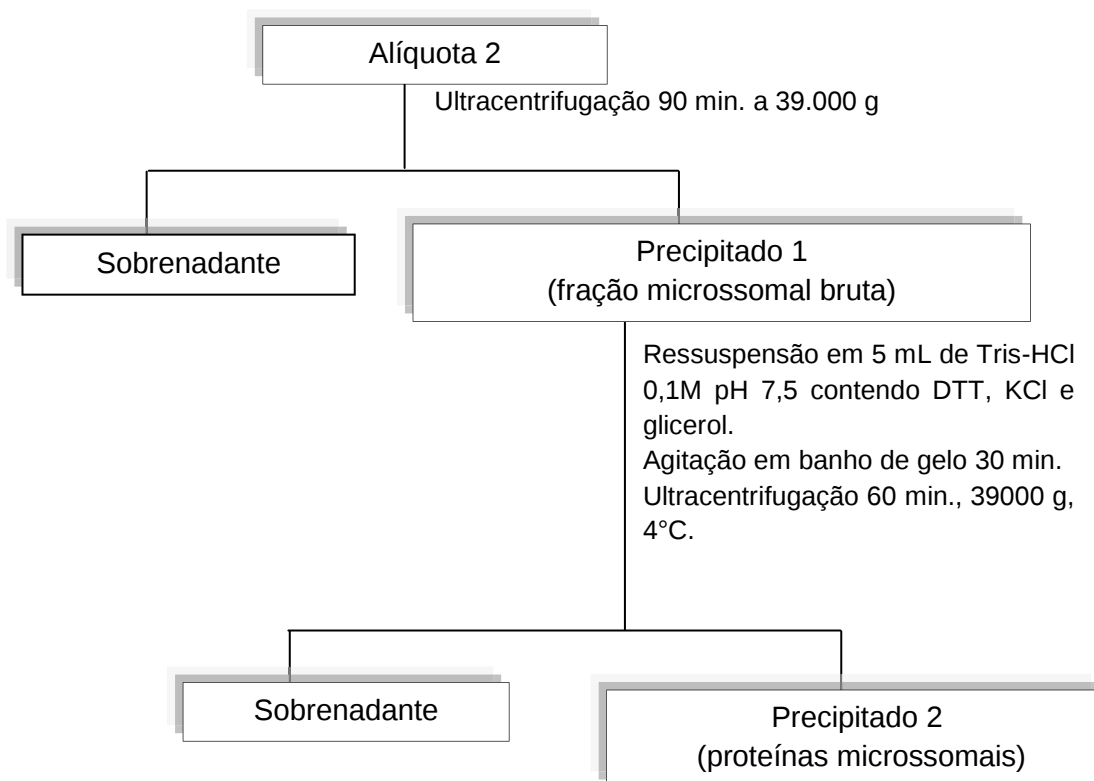
A segunda alíquota foi submetida a procedimento de concentração de enzimas microsomais. Para isso, foi submetida à ultracentrifugação a 39000 g, à 4°C, por 90 minutos. O precipitado resultante (fração microsomal bruta) foi ressuspensionado em 5 mL de solução Tris-HCl 0,1 M e pH 7,5, contendo 2 mM DTT, 1 M KCl e 10% p/v de glicerol com agitação suave em banho de gelo por 30 min. A fração microsomal assim ressuspensionada foi novamente submetida à ultracentrifugação a 39000 g e 4°C, por 60 minutos. O precipitado (fração

microssomal) foi ressuspensionado em 5 mL de solução Tris-HCl 0,1M pH 6,5, contendo 2mM DTT e 4mM CHAPSO e mantido em banho de gelo por mais 15 minutos com agitação suave, sendo posteriormente submetido a uma coluna de Sephadex G-25 com tampão TRIS-HCl (0,1 M) pH 7,5 para retirada de endógenos (Esquema 10, p. 58).

Esquema 9: Concentração das proteínas solúveis de *P. blanda*



Esquema 10: Concentração das proteínas microssomais de *P. blanda*



4.4.3. Procedimento para ensaio enzimático *in vitro* com os precursores sintetizados para formação das lignanas.

Para as reações *in vitro*, foram utilizados os precursores sintetizados: álcool sinapílico e *E*-5-metoxi-isogenol.

Os precursores foram utilizados nas reações biossintéticas de acordo com a tabela 7, (p. 59).

Tabela 7: Ordem dos precursores utilizados nas reações *in vitro* com as enzimas extraídas de *P. blanda*.

Experimento - código	Precursor 1 (1 equivalente)	Precursor 2 (1 equivalente)
1 – AM	álcool sinapílico (A)	<i>E</i> -5-metoxi-isogenol (M)
2 – AA	álcool sinapílico (A)	álcool sinapílico (A)
3 – MM	<i>E</i> -5-metoxi-isogenol (M)	<i>E</i> -5-metoxi-isogenol (M)

O ensaio enzimático foi iniciado adicionando-se a um tubo tipo eppendorf, 200 µL de tampão KPi 0,1 M (pH 7,5), 25 µL de solução 50 mM de cada precursor, como na tabela 7, 100 µL de extrato enzimático e 50 µL de cofator NADPH (20 mM) e 25 µL de H₂O₂ (10 mM). A reação foi incubada inicialmente a 25 °C por 2 horas sob agitação. Após o tempo de incubação as soluções foram extraídas duas vezes com 400 µL de acetato de etila. O solvente foi evaporado e o resíduo foi ressuspensionado em metanol e analisado por CLAE e CLAE-EM.

Os produtos das reações foram analisados por CLAE, utilizando a fase móvel composta por MeOH:H₂O (+0,1% de HOAc) em gradiente de 20 à 100% de MeOH, coluna phenomenex LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 1mL.min⁻¹ e comprimento de onda de 250 nm.

Foram realizadas também as reações de controle com os brancos enzimáticos e brancos dos precursores utilizando as mesmas condições das reações completas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Outras condições reacionais com variação de temperatura (25°C, 35°C e 45°C) e de tempo de incubação (1h, 2h, 4h e 8h) também foram avaliadas.

4.4.4. Análise dos produtos formados por ressonância magnética nuclear (RMN).

Após análise por CLAE e CLAE-EM, os produtos das reações enzimáticas foram fracionados por CLAE preparativo. A condição cromatográfica para o fracionamento foi:

- coluna Phenomenex, Phenyl-Hexyl, com tamanho 250 x 21,20 mm e partículas de 10 µm.
- gradiente de 30 à 100% de MeOH na fase móvel, em 60 minutos.
- comprimento de onda de 250 nm.

As frações foram submetidas a experimentos de RMN mono- e bidimensionais.

4.4.5. Eletroforese em duas dimensões (SDS-2D) dos extratos enzimáticos de partes aéreas e raízes.

4.4.5.1. Soluções e reagentes utilizados

A. Solução de reidratação (sem adição do IPG buffer)

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

Alíquotas de 2,5 mL foram estocadas a -80°C. Imediatamente antes do uso, 7 mg de DTT e 50 µL de IPG buffer ou Pharmalyte (3-10) foram adicionados por cada alíquota.

B. Tampão de equilíbrio (alíquotas de 10 mL foram estocadas a -80°C)

Reagentes	Concentração final	Quantidade
TRIS-HCl, pH 8,8 (solução D)	50 mM	10 mL
uréia	6 M	72,07 g
glicerol (87% v/v)	30% (v/v)	69 mL
SDS	2% (m/v)	4,0 g
azul de bromofenol 1% (Sol. I)	0,002% (m/v)	400 µL
água deionizada		para 200 mL

C. Solução estoque de acrilamida-bisacrilamida

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

D. Tampão de resolução (4x)

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

E. Solução SDS 10%

Reagentes	Concentração final	Quantidade
SDS	10% (m/v)	5,0 g
água deionizada		para 50 mL

F. Solução de persulfato de amônio 10%

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

G. Tampão de corrida

Reagentes	Concentração final	Quantidade
TRIS	25 mM	30,3 g
glicina	192 mM	144,0 g
SDS	0,1%	10,0 g
água deionizada		para 10 L

H. Solução de agarose

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

I. Solução estoque de azul de bromofenol (1%)

Reagentes	Concentração final	Quantidade
azul de bromofenol	1%	100 mg
TRIS	50 mM	60 mg
água deionizada		para 10 mL

4.4.5.2. Limpeza das amostras

Após a determinação da concentração de proteínas no extrato enzimático da fração enriquecida de PAL, as amostras foram diluídas para uma concentração de 100 µg/mL e então submetidas aos procedimentos de preparação necessários para aplicação do gel. O *clean-up* das amostras foi realizado utilizando o kit *2-D clean-up kit* da Amersham Biosciences. Este procedimento envolve a combinação de agentes precipitantes que eliminam da amostra a presença de interferentes, tais como sais e ácidos nucleicos, que dificultam o desenvolvimento e a resolução da metodologia.

O procedimento descrito no kit de *clean-up* aplicado às amostras está descrito á seguir:

- Em um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, transferiu-se 100 μ L de uma solução contendo 100 μ g de proteína e 300 μ L da solução precipitante, agitou-se a mistura em vortex e manteve-se em banho de gelo por 15 minutos.
- Adicionou-se 300 μ L da solução coprecipitante e misturou-se.
- Centrifugou-se a 5.000 g por 10 minutos. O precipitado foi centrifugado rapidamente para a remoção completa do sobrenadante sem ser perturbado.
- Adicionou-se 40 μ L da solução coprecipitante, e colocou-se em banho de gelo por 5 minutos.
- Centrifugou-se a 5.000 g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante.
- Adicionou-se 25 μ L de água deionizada ao precipitado e agitou-se em vortex até dispersão do precipitado.
- Adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem (resfriado a -20°C por pelo menos 1 hora antes do uso) e 5 μ L de aditivo de lavagem.
- Agitou-se o tubo em vortex durante 20-30 segundos e armazenou-se à -20°C . Após 10 minutos o tubo foi agitado em vortex por mais 20-30 segundos. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes.
- Centrifugou-se a 10.000 g por 10 minutos.
- O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente por 3 minutos.
- O precipitado foi ressuspendido na solução de reidratação A (item 4.4.5.1, p. 60)

4.4.5.3. Hidratação das tiras de IPG

Foram utilizadas tiras de IPG de 13 cm (pH 3-10 e pH 4-7), as quais foram reidratadas na bandeja de *DryStrip Reswelling Tray* com 250 μ L da solução de reidratação A (adicionada de DTT e IPG buffer). O período de reidratação foi de 14-18 hs à temperatura ambiente.

4.4.5.4. Primeira dimensão: focalização isoeletrica

A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o equipamento ETTAN™ IPGphor II

As tiras foram colocadas no *Strip Holder* segundo especificação do fabricante. A focalização foi realizada a 20°C sendo aplicados 50 µA por tira. O gradiente utilizado está descrito na tabela 8. Depois de focalizadas, as tiras foram armazenadas a -80°C até serem submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE.

Tabela 8: Protocolo aplicado na focalização isoeletrica (tiras de 13 cm, de pH 3-10L).

Etapa	Voltagem (V)	Volts-Hora	Tempo (hs)
1	500	500	1
2	1000	1000	1
3	8000*	16000	Variável (4-6 hs)

*O tempo consumido para atingir esta voltagem depende da natureza da amostra.

4.4.5.5. Segunda dimensão

A. Preparo do gel de poliacrilamida 12,5%

Para aplicar tiras de IPG de 13 cm de comprimento, foram preparados géis em placas de 18x16 cm com espaçadores de 1,5 mm de espessura e 1 cm de largura. As soluções e quantidades para preparo do gel de poliacrilamida então descritos na tabela 9.

Tabela 9: Reagentes e proporções necessários para preparar 100 mL de gel 12,5%.

Reagente	Volume (gel 12,5%)
solução de acrilamida/bisacrilamida (solução C, item 4.4.5.1)	41,7 mL
tampão de resolução (solução D, item 4.4.5.1)	25 mL
solução de SDS 10% (solução E, item 4.4.5.1)	1 mL
água deionizada	31,8 mL
persulfato de amônio 10% (solução F, item 4.4.5.1)	0,5 mL
TEMED	0,033 mL

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

B. Equilíbrio das tiras

Antes de serem aplicadas ao gel as tiras são submetidas a um tratamento com DTT e iodoacetamida no tampão de equilíbrio (solução B, item 4.4.5.1, p. 60) para reduzir as pontes de dissulfeto das proteínas e alquilar os grupos tióis, evitando assim processos de re-oxidação durante o experimento de eletroforese.

- Adicionou-se a cada tira em um tubo tampado, 10 mL de tampão de equilíbrio (solução B) contendo 100 mg de DTT. A tira foi mantida sob agitação em solução por 15 minutos.
- Essa solução foi descartada e trocada por 10 mL de tampão de equilíbrio contendo 250 mg de iodoacetamida. A tira foi mantida nessa solução por no mínimo 15 minutos, sob agitação.

C. Aplicação das tiras e desenvolvimento do gel.

Uma solução com padrões de peso molecular foi aplicada em papel absorvente e este colocado à esquerda do gel, próximo ao extremo ácido da tira. O gel foi selado com solução de agarose (solução G, item 4.4.5.1, p. 60).

O gel foi colocado na cuba de eletroforese (SE 600 Ruby system) refrigerada à 10-12°C, previamente preenchida com 4 litros de tampão de corrida (solução F, item 4.4.5.1). Aplicou-se uma corrente de 45 mA por gel, com voltagem máxima em 600 V. A corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol migrou até 0,5 cm da parte inferior do gel.

4.4.5.5. Revelação dos géis

Os géis foram revelados com nitrato de prata, como descrito na no item 4.3.3.3, na página 53.

4.5. Determinação da atividade *in vitro* das lignanas e secolignanas de *Peperomia blanda* frente à enzima tirosinase.

Os ensaios *in vitro* das substâncias isoladas de *P. blanda* frente à enzima tirosinase teve como objetivo a avaliação de seus potenciais de inativação ou ativação desta enzima, na busca por possíveis fármacos para o tratamento de doenças envolvidas com sua disfunção. Dez substâncias foram avaliadas neste experimento, entre elas: três secolignanas, quatro lignanas tetraidrofurânicas e três policetídeos. As amostras à serem testadas foram preparadas diluindo-se as substâncias selecionadas em tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 6,8, na concentração de 750 µg/mL.

A reação foi realizada em placa de 96 poços, que foram divididos em quatro grupos, contendo em cada um deles os seguintes reagentes:

- A - Branco enzimático: 120 µL de tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 6,8 e 40 µL de tirosinase de cogumelo (92 unidades/mL do mesmo tampão).

- B – Branco do meio: 160 μL de tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 6,8.
- C – Branco da amostra: 120 μL de tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 6,8 e 40 μL de amostra
- D – Reação completa: 120 μL de tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 6,8, 40 μL de tirosinase de cogumelo (92 unidades/mL do mesmo tampão) e 40 μL de amostra.

Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 40 μL de 3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA, 2,5 mM no mesmo tampão) em todas as reações e após mais 5 minutos, as absorbâncias foram lidas a 475 nm em espectrofotômetro de microplacas. A inibição da atividade da tirosinase foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição} = \{[(A-B)-(D-C)]/(A-B)\} \times 100.$$

Além destas soluções, foram realizadas as reações completas com o controle positivo, ácido kojico (10 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$, dissolvido no mesmo tampão) no lugar das substâncias testadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

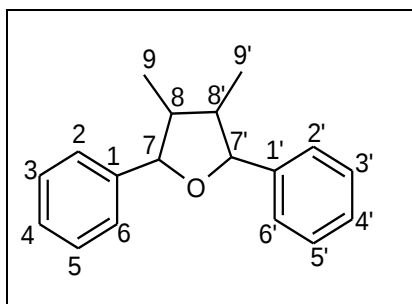
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Considerações gerais.

Estudos químicos precedentes de *Peperomia blanda* (FELIPPE, 2008) revelaram que as lignanas tetraidrofurânicas e as peperominas são os constituintes principais dos extratos de média polaridade desta espécie (Figura 3, p. 7). Relatos na literatura mostram que estas duas classes apresentam importantes atividades biológicas. As principais atividades relacionadas à classe das lignanas tetraidrofurânicas são antiparasitária (MARTINS et al., 2003; FELIPPE et al., 2008), anti-inflamatória (WU et al., 2005), larvicida (LEITE et al., 2012) e antitumoral (YUN et al., 2011). As secolignanas do tipo peperominas também apresentam muitos relatos destacando principalmente suas atividades inseticida (GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998), citotóxica (CHENG et al., 2003; WU et al., 2006; XU et al., 2006), antiviral (ZHANG et al., 2007) e anti-inflamatória (TSUTSUI et al., 2009). Também é importante notar a semelhança estrutural entre as peperominas e as podofilotoxinas (SIBI et al., 2001) usadas no tratamento clínico de tumores malignos (CASTRO et al. 2003).

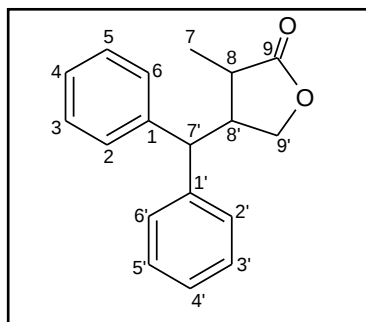
Estruturalmente, as lignanas tetraidrofurânicas apresentam um anel furânico tetrassubstituído, com quatro centros quirais que podem assumir diferentes configurações (Figura 21, p. 68).

Figura 21: Exemplo da estrutura química básica de uma lignana tetraidrofurânica.



As secolignanas do tipo peperominas são encontradas apenas em espécies do gênero *Peperomia* e são caracterizadas pela presença de um anel γ -butirolactônico (Figura 22, p. 69). O prefixo seco- indica a clivagem de uma ligação em um anel com a correção apropriada do número de hidrogênios na estrutura.

Figura 22: Exemplo da estrutura química de uma 1,7-seco-2,7'-ciclolignana.



As lignanas tetraidrofurânicas de *Peperomia blanda* previamente isoladas revelaram configurações relativas constantes no anel tetraidrofurânico, mostrando um sistema enzimático bastante estereosseletivo. No entanto, para as peperominas foram observadas diferentes configurações relativas no anel butirôlactonico, sendo que a configuração *cis* é bastante rara nesta classe. Os dados disponíveis na literatura não foram suficientes para a determinação da configuração absoluta destas substâncias, sendo necessário o uso de uma técnica mais eficaz para esta finalidade. Os métodos quirópticos de dicroísmo circular eletrônico (DCE) e vibracional (DCV) foram selecionados e se mostraram bons resultados.

Com as estruturas e configurações determinadas, foi investigada a dinâmica metabólica de formação das duas subclasses de lignanas que tiveram como principal objetivo, além do entendimento de suas funções biológicas ou ecológicas na espécie, avaliar a época de maior acúmulo destas e assim, direcionar o estudo biossintético das vias responsáveis por suas formações.

Finalmente as substâncias isoladas de *P. blanda* foram testadas frente a enzima tirosinase para avaliação de seus potenciais biológicos relacionados à produção ou inibição de melanina. Os resultados estão discutidos a seguir.

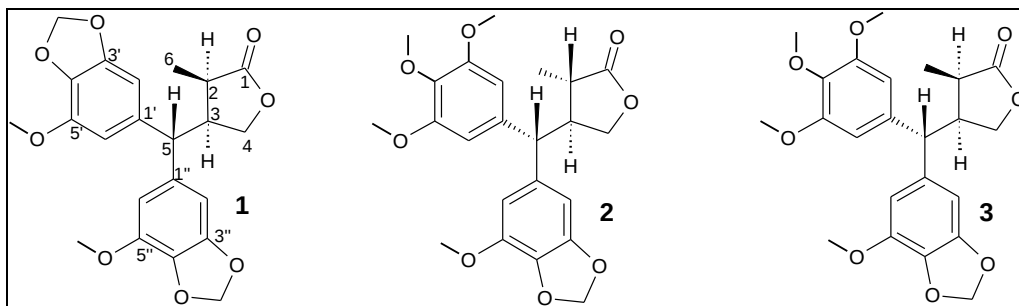
5.2. Determinação da configuração absoluta das secolignanas isoladas de *Peperomia blanda*.

Para a determinação da configuração absoluta das substâncias orgânicas é fundamental que a estrutura química, bem como a configuração relativa da mesma sejam determinadas. A determinação estrutural das peperominas **1-3**, bem como a determinação de suas configurações relativas, foram realizadas por RMN de ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais e esta determinação foi discutida detalhadamente em trabalho anterior (FELIPPE, 2008) e publicadas recentemente (FELIPPE et al., 2011; FELIPPE et al., 2012). Estes trabalhos revelaram a configuração relativa *cis* no anel butirolactônico para as substâncias **1** e **2** e *trans* para a substância **3**. No entanto, as configurações absolutas destas substâncias não haviam sido totalmente elucidadas.

5.2.1. Determinação da configuração absoluta das secolignanas.

O estudo de determinação da configuração absoluta foi realizado para três substâncias da classe das secolignanas, denominadas **1**, **2** e **3**, representadas na figura 23 (p. 70).

Figura 23: Estruturas químicas das secolignanas isoladas de *P. blanda*.



Após determinação das configurações relativas entre as posições 2, 3 e 5 das secolignanas **1**, **2** e **3**, observou-se a presença de diferentes diastereoisômeros. A partir da experiência que o nosso grupo de pesquisa vem adquirindo na determinação da configuração absoluta de substâncias naturais por métodos quirópticos (BATISTA et al., 2010; BATISTA et al., 2011), a técnica de dicroísmo circular vibracional foi escolhida para auxiliar no problema apresentado.

5.2.1.1. Substância 1

Após determinação da configuração relativa por NOESY, haviam duas possibilidades de configuração absoluta para a substância **1**, sendo (2*S*,3*R*) ou (2*R*,3*S*). A configuração (2*R*,3*S*) foi arbitrariamente escolhida, e após otimização da geometria, sete confôrmeros de menor energia foram identificados através do programa computacional (Figura 24, p. 72). Os espectros DCE foram calculados utilizando teoria do funcional de densidade tempo-dependente (TFDTD) em fase gasosa e foram consistentes com os experimentais, isto é, apresentaram um efeito Cotton negativo na região de 270-290 nm, positivo na região 240-270 nm e negativo na região 220-240 (Figura 25, p. 73). Os mesmos sete confôrmeros de menor energia otimizados foram considerados para o IV e DCV para simulação espectral. A semelhança excelente entre os espectros observados e calculados confirmaram a configuração absoluta da substância (–)-**1** como (2*R*,3*S*) (Figura 26, p. 73).

Figura 24: Estruturas e energias relativas dos sete confôrmeros de menor energia para (2*R*,3*S*)-**1** usados para o cálculo de DCE e DCV.

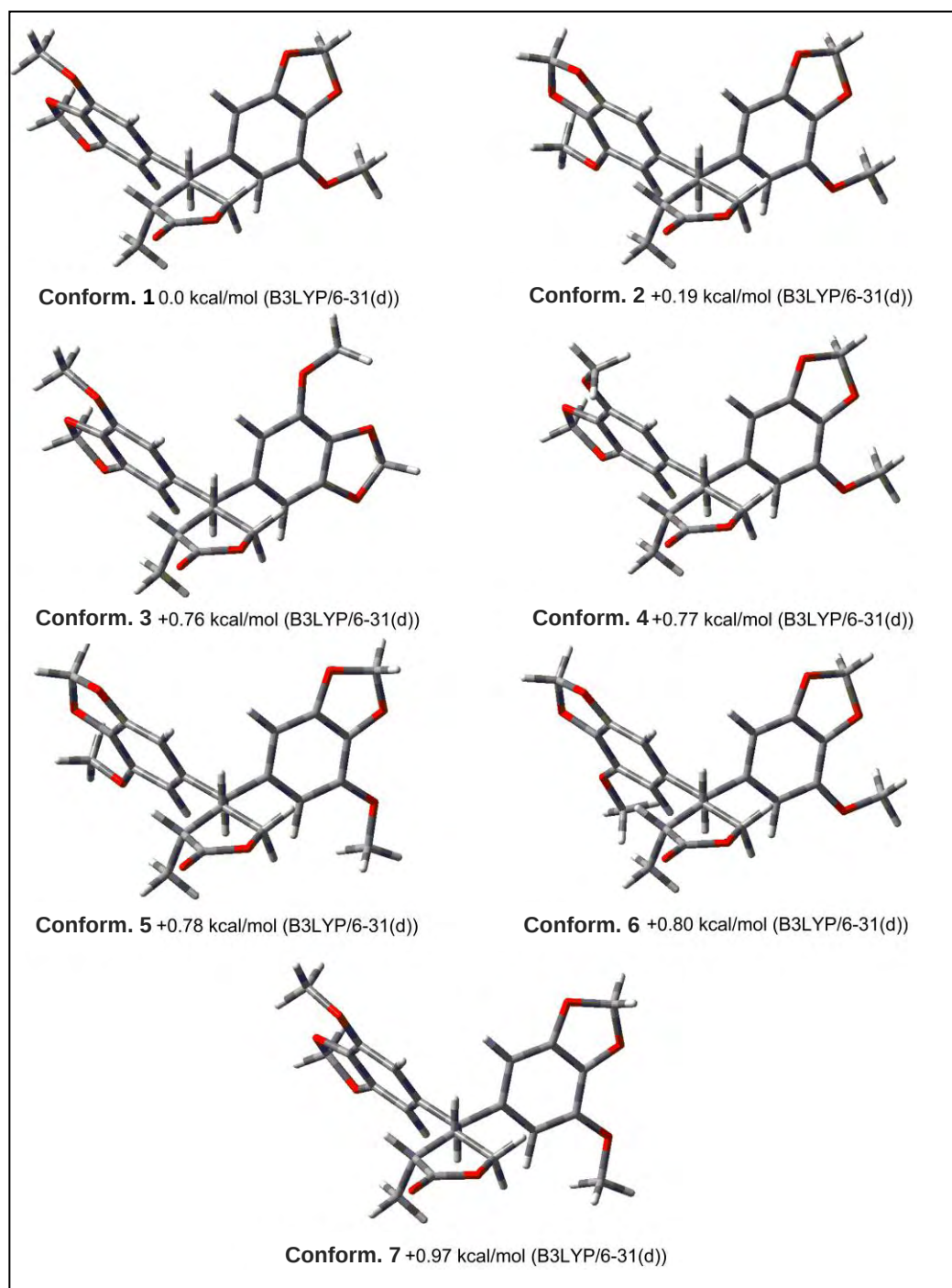


Figura 25: Comparação entre os espectros experimental e calculado de DCE da substância (–)-**1** com configuração (2*R*,3*S*).

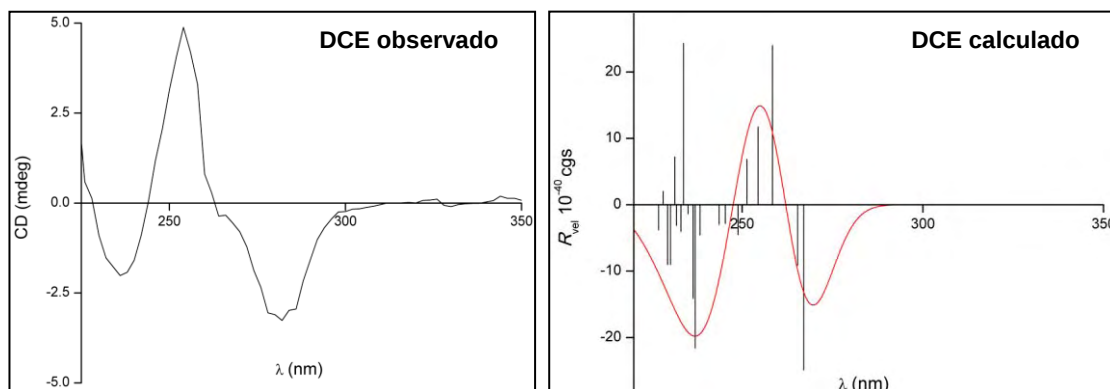
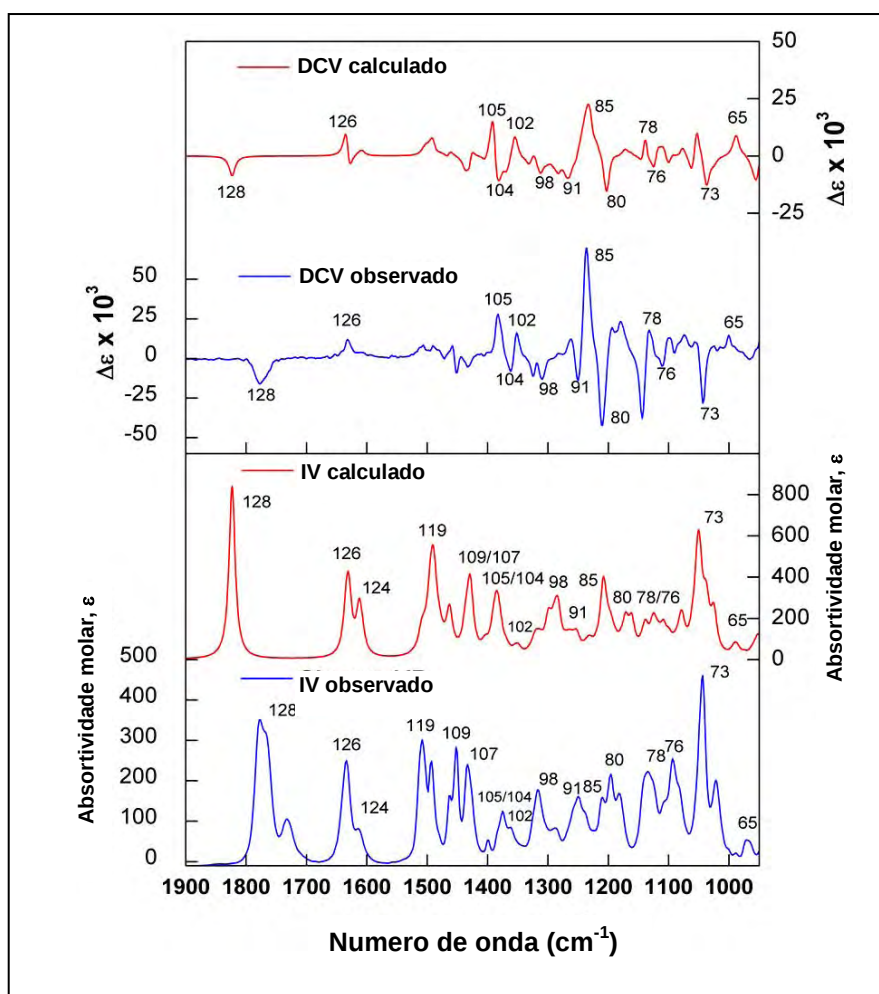


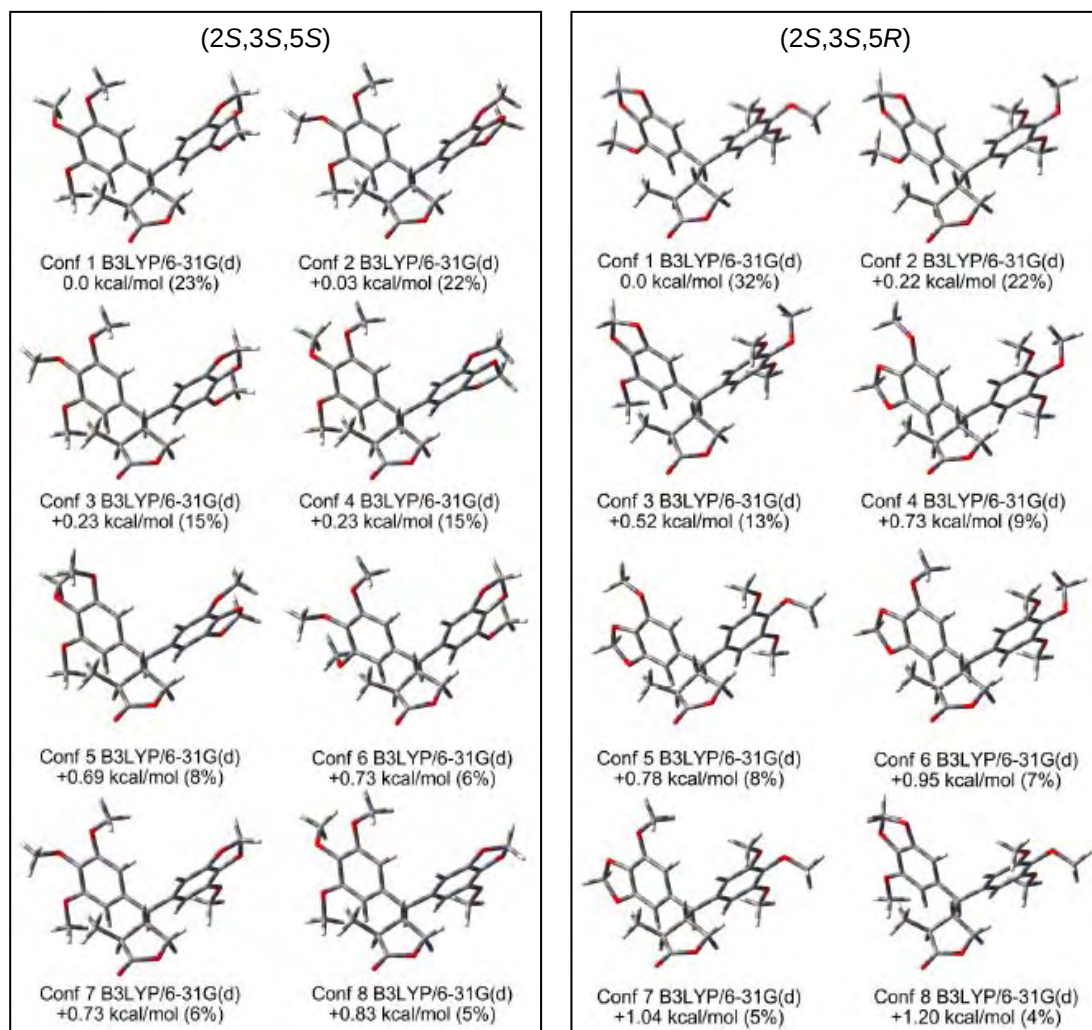
Figura 26: Comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e IV da substância **1** correspondentes à configuração (2*R*,3*S*).



5.2.1.2. Substância 2

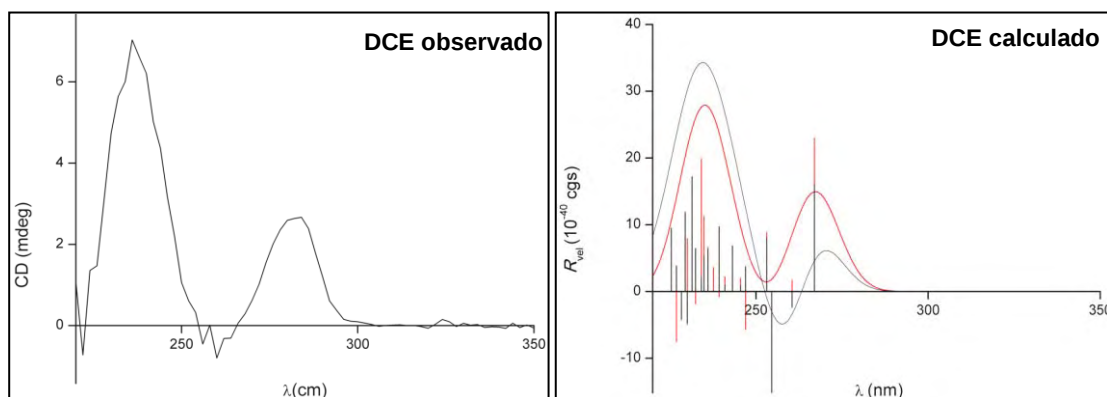
A análise dos dados espectrométricos comparados aos dados da literatura, confirmam que a substância **2** tem a mesma estrutura e configuração relativa no anel butirolactônico que a peperomina B. O primeiro relato da peperomina B mostrou a rotação óptica positiva associada aos efeitos Cotton positivo e negativo em aproximadamente 275 e 250 nm, respectivamente, levou a um assinalamento inicial dos centros quirálicos como (2S,3S,5S) (CHEN; JAN; LEE, 1989). Ao comparar os dados experimentais obtidos para **2** com valores da literatura percebemos que, apesar dos dados de rotação óptica serem muito semelhantes ($[\alpha]_D^{21} +21,8$ em CHCl_3 ; c. 0.49), os dados de DCE não eram condizentes aos reportados para a peperomina B. Embora um efeito de Cotton positivo ter sido observado a 275 nm, este foi seguido por um efeito Cotton ligeiramente negativo e um fortemente positivo á 260 e 240 nm, respectivamente. Estas constatações levaram-nos a calcular o espectro de DCE de **2** utilizando teoria do funcional de densidade tempo-dependente (TFDTD). Os oito confôrmers de menor energia otimizados foram identificados (Figura 27, p. 75) tanto para configuração (2S,3S,5S)-**2** quanto para (2S,3S,5R)-**2** e foram considerados para simulação espectral de DCE. Esta abordagem permitiu-nos investigar todas as configurações possíveis para os três centros quirálicos, tendo em conta a configuração *trans* no anel γ -butirolactônico (os antípodas das configurações arbitrariamente escolhidos foram gerados pela multiplicação de seus espectros finais por (- 1)).

Figura 27: Estruturas otimizadas e energias relativas dos oito confôrmeros de menor energia para (2S,3S,5S)-**2** e oito para (2S,3S,5R)-**2** usados para o cálculo de DCE e DCV.



A comparação dos espectros calculados e experimentais de DCE para **2** está apresentado na figura 28 (p. 76). Foi observado que tanto para a configuração (2S,3S,5S)-**2** quanto para a (2S,3S,5R)-**2**, os espectros calculados possuem boa concordância com os dados experimentais. Portanto, neste caso, o DCE não pode ser usado para determinar sem ambiguidade a configuração absoluta dos dois diastereoisômeros, uma vez que não foi capaz de diferenciá-los. Este fato pode ter resultado da semelhança entre os dois substituintes aromáticos no estereocentro em C-5, que compartilham basicamente as mesmas propriedades de transição eletrônica. Além disso, o DCE é uma técnica de resolução inferior em comparação com DCV, além de apresentar menor número de bandas.

Figura 28: Comparação entre os espectros de DCE experimental de (-)-**2** e os espectros calculados para as configurações (2S,3S,5S) (em vermelho) e (2S,3S,5R) (em preto).



O passo seguinte foi calcular o espectro no IV e de DCV dos mesmos diastereoisômeros considerados na análise por DCE e compará-los com os resultados experimentais. Com efeito, o espectro de DCV forneceu uma atribuição definitiva para (+)-**2** como (2S,3S,5S) (Figura 29, p. 77), o que está de acordo com a literatura (CHEN; JAN; LEE, 1989). Apesar da semelhança entre os espectros de DCV dos diastereoisômeros de (2S,3S,5S)-**2** e (2S,3S,5R)-**2**, algumas características distintas levaram à atribuição correta dos estereocentros da substância **2** (Figura 30, p. 77). As transições vibracionais em 1270 e 1305 cm^{-1} presente em (2S,3S,5S)-**2** substituídos por uma única transição a 1.290 cm^{-1} em (2S,3S,5R)-**2** foram cruciais para a distinção entre os isômeros.

Figura 29: comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e no IV da substância **2** correspondentes à configuração (2S,3S,5S).

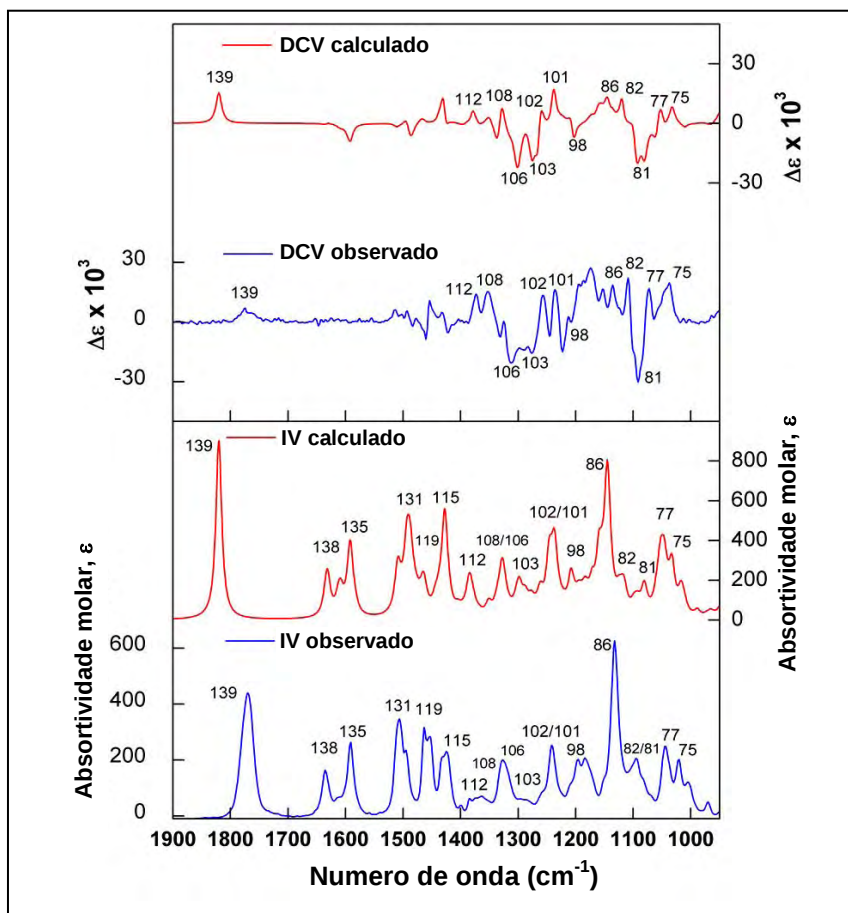
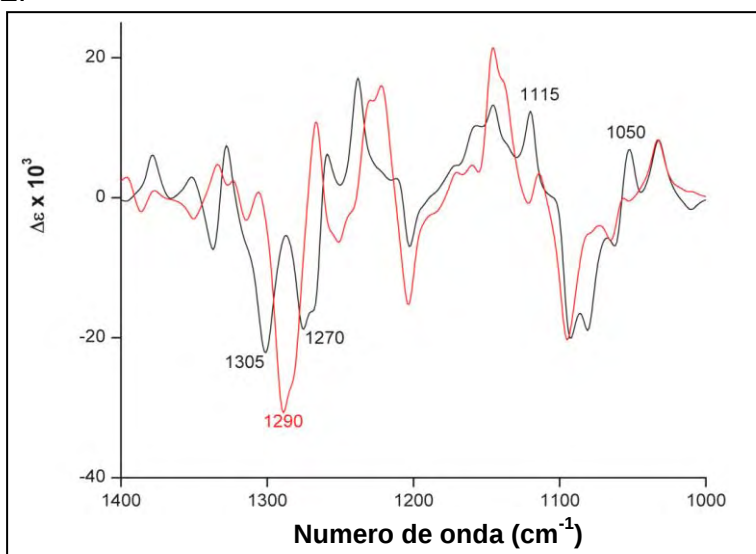


Figura 30: Superposição entre os espectros de DCV calculados para as configurações (2S,3S,5S) (em preto) e (2S,3S,5R) (em vermelho) da substância **2**.



5.2.1.3. Substância 3

Como esta é a primeira vez que este metabólito secundário é descrito na natureza, não havia nenhum modelo adequado para o qual o seu espectro de DCE pudesse ser comparado. Assim, procedeu-se com a construção do modelo computacional, pesquisa conformacional, otimização de geometria, e simulação dos espectros de DCE e DCV. Como resultados foram identificados oito confôrmeros de menor energia que foram utilizados para o cálculo dos espectros de DCE e de DCV (Figura 31, p. 79).

Mais uma vez, o cálculo por TFDTD do espectro de DCE mostrou grande semelhança com os dados experimentais para os dois diastereoisômeros possíveis com configuração *cis* no anel butirolactônico (Figura 32, p. 80). Apesar das substâncias **1** e **3** possuírem a mesma configuração relativa no anel butirolactônico, assim como o mesmo sinal e magnitude da rotação óptica, a substância **3** apresenta um centro quirálico adicional e por isso, seus espectros não podem ser comparados diretamente.

Figura 31: Estruturas e energias relativas dos oito confôrmeros de menor energia para (2*R*,3*S*,5*S*)-**3** usados para o cálculo de DCE e DCV.

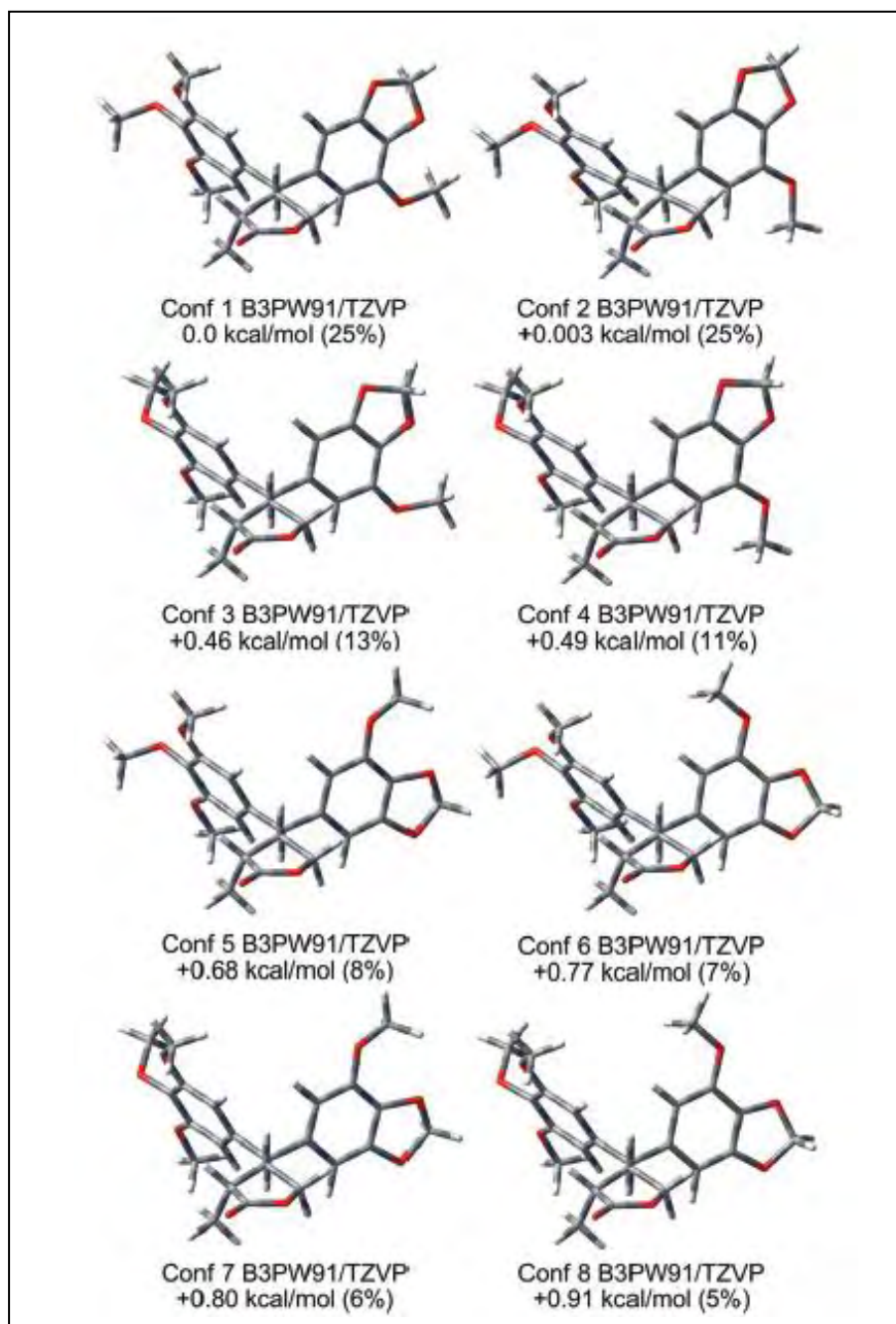
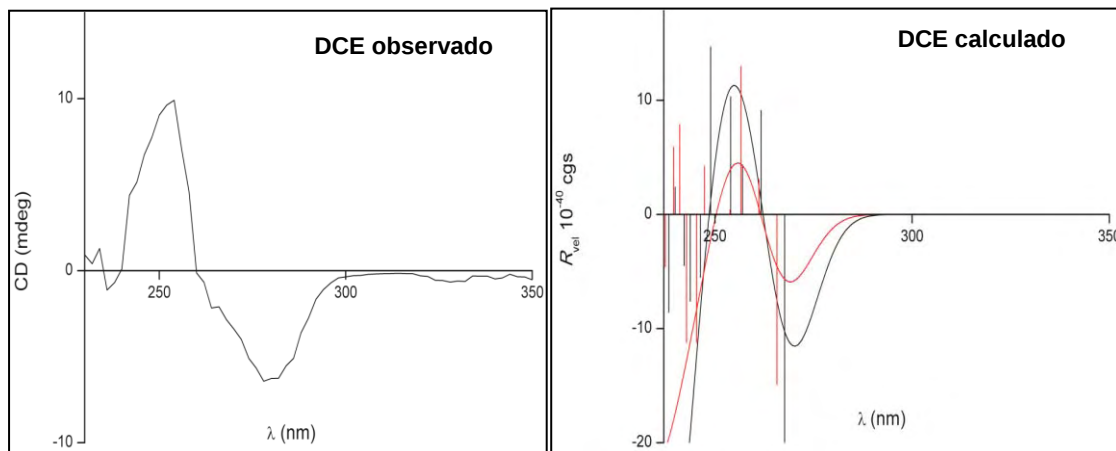
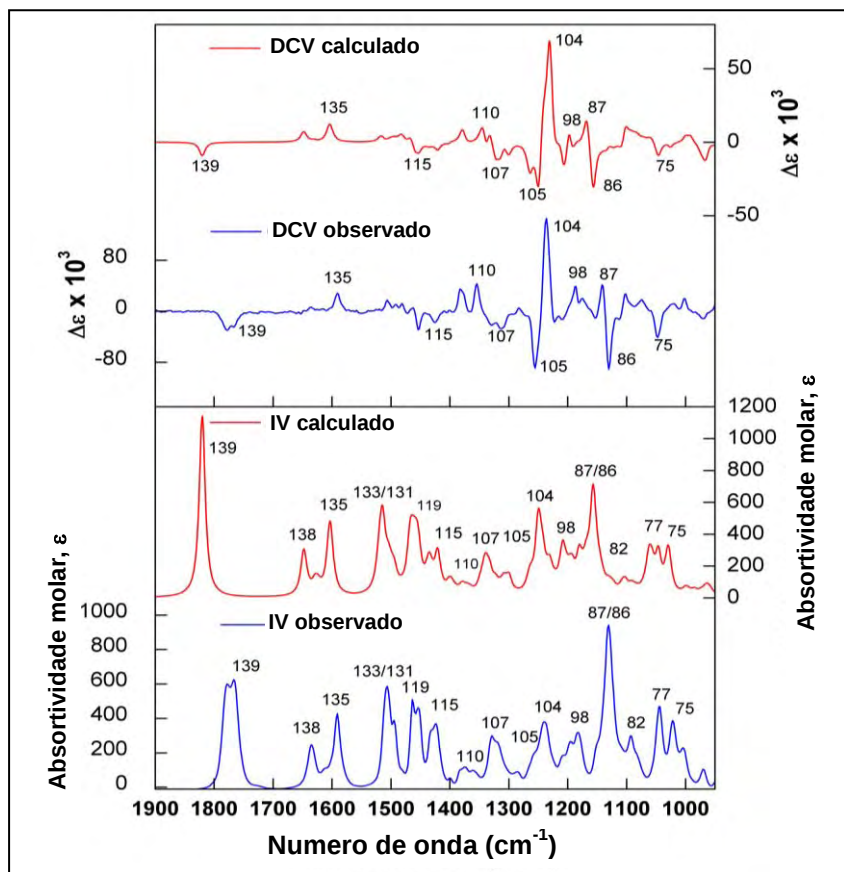


Figura 32: Comparação entre os espectros de DCE experimental de (–)-**3** e os espectros calculados para as configurações (2*R*,3*S*,5*S*) (em vermelho) e (2*R*,3*S*,5*R*) (em preto).



Os cálculos dos espectros no IV e de DCV comparados com os dados experimentais geraram um resultado ótimo que permitiu a atribuição de (–)-**3** como (2*R*,3*S*,5*S*) (Figura 33, p. 80).

Figura 33: Comparação entre os espectros experimentais e calculados de DCV e IV da substância **3** correspondentes à configuração (2*R*,3*S*,5*S*).

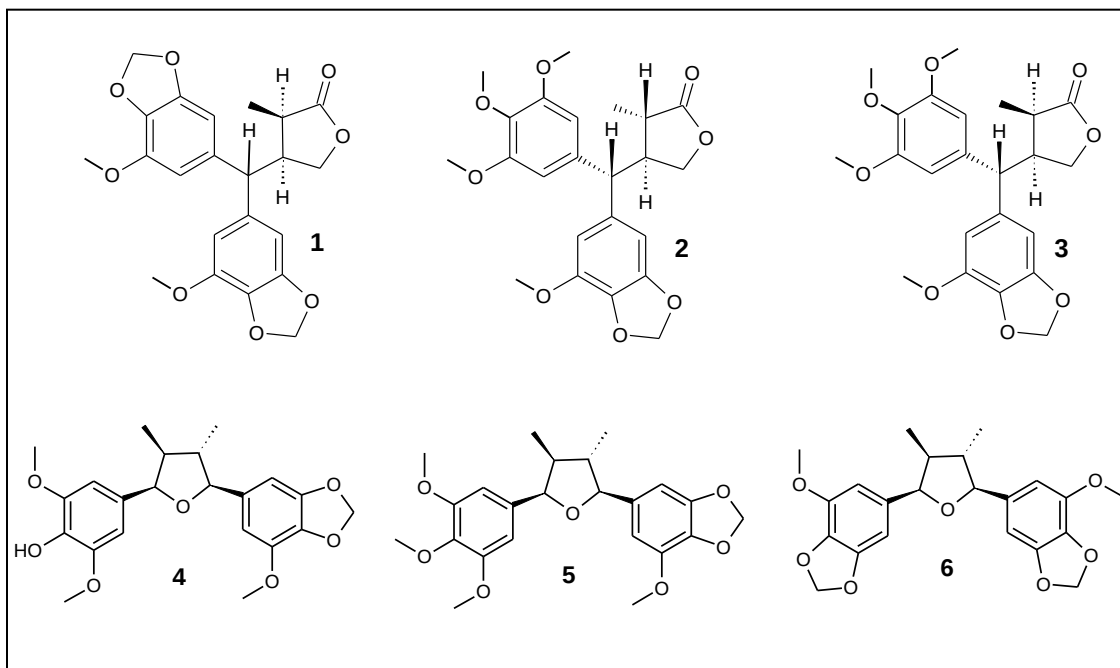


5.3. Estudo da dinâmica metabólica sazonal de lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de *Peperomia blanda*

5.3.1. Considerações gerais

O estudo de dinâmica metabólica tem como objetivo o monitoramento de seis substâncias, três lignanas tetraidrofurânicas e três secolignanas (Figura 34, p. 81), que são encontradas em partes aéreas e raízes de *P. blanda*, durante um período de dois anos.

Figura 34: Estruturas químicas das lignanas isoladas de *Peperomia blanda* que foram alvos nas análises de dinâmica metabólica sazonal da espécie.



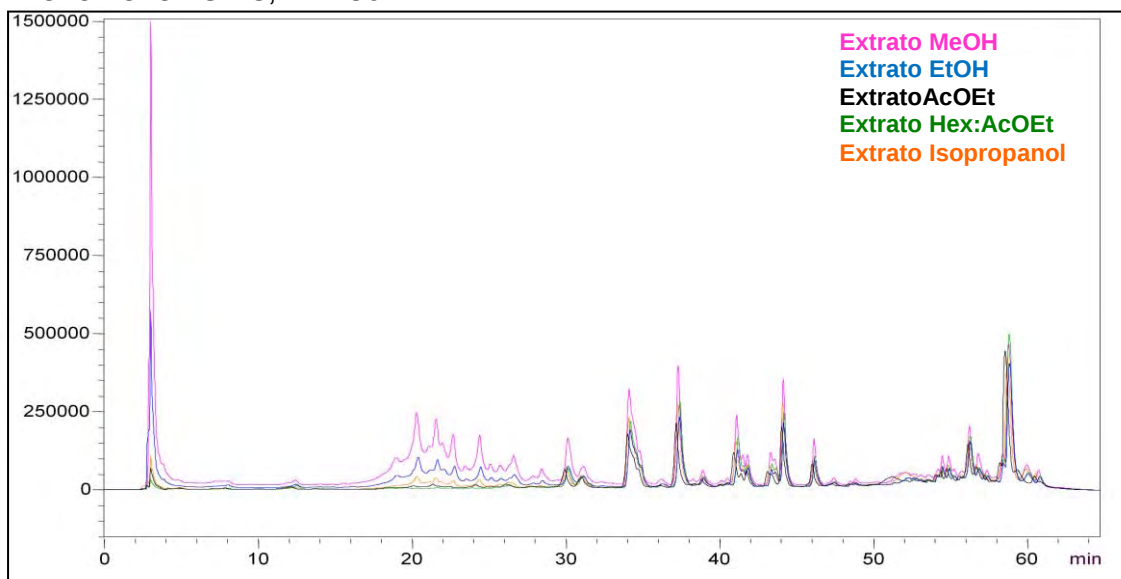
A estratégia experimental envolveu cinco etapas que estão discutidas nos itens a seguir.

5.3.2. Preparo das amostras

5.3.2.1. Determinação do melhor solvente extrator e número de extrações

As lignanas de baixas ou médias polaridades podem ser extraídas com diferentes solventes orgânicos que, da mesma forma, sejam de média polaridade. No entanto, o tipo de solvente pode, muitas vezes, influenciar a seletividade extrativa destas substâncias, sendo importante esta investigação para uma extração eficiente (WILLFÖR et al., 2003). Os experimentos para extração das lignanas de *Peperomia blanda* foi realizado com diferentes solventes de polaridade média, de acordo com a faixa de polaridade das substâncias de interesse, a partir da mesma massa inicial de material vegetal seco e moído. Os resultados mostraram que apesar de todos os solventes extraírem a maior parte das substâncias de forma semelhante, o metanol mostrou-se mais eficiente na extração das lignanas de interesse. As análises foram realizadas por CLAE (condições descritas no item 4.2.3, p. 33) e as bandas cromatográficas referentes às lignanas apresentaram tempo de retenção (t_r) entre 30 e 50 minutos (Figura 35, p. 82).

Figura 35: Perfis cromatográficos dos extratos de partes aéreas de *P. blanda* realizados com diferentes solventes. Condição cromatográfica: gradiente de 5 a 100% de MeOH em 65 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex C-18, λ = 250 nm.



As áreas dos cromatogramas entre os tempos de retenção (tr) de 30 e 50 minutos foram calculadas e estão dispostas na tabela 10. Este intervalo foi escolhido por contemplar os picos cromatográficos das lignanas em estudo.

Tabela 10: Valores de área total dos cromatogramas com tempo de retenção (tr) entre 30 e 50 minutos, em função dos solventes utilizados para extração.

Solvente	Área do cromatograma com tr entre 30 e 50 minutos
Metanol	128862814
Etanol	78569831
Acetato de etila	88631471
Hexano:Acetato de etila	100236545
Isopropanol	89873652

De acordo com os resultados obtidos, dentre os sistemas de solventes testados, o que apresentou melhor resultado para uma extração quantitativa foi o metanol, pois concentra a maior área relativa às substâncias de interesse.

5.3.2.2. Avaliação da eficiência da extração

Uma vez selecionado o solvente para extração, foi então determinado o número de extrações ótimo que deveria ser realizado para cada material vegetal seco e moído.

Considerando o mesmo procedimento de extração para as partes aéreas e raízes de *P. blanda* (item 4.2.3.1, p. 34), foi possível observar a partir dos resultados dispostos na figura 36 (p. 84) e nas tabelas 11 e 12 (p. 84 e 85), que três extrações são suficientes para extração quantitativa das lignanas de interesse para o estudo de dinâmica metabólica. Os quatro extratos secos foram pesados a fim de determinar a quantidade extraída em cada etapa. Posteriormente, cada extrato foi analisado por CLAE-DAD. Considerando as massas acumuladas e a quarta extração como limite, observou-se uma alta eficiência nas três primeiras extrações, de cerca de 98%, tanto para as partes aéreas quanto para as raízes. A última extração apresenta os picos referentes à maioria dos padrões com baixa intensidade, além de apresentar quantidades muito reduzidas de extratos, próximas do erro da balança utilizada.

Figura 36: Cromatogramas de três extrações seguidas das partes aéreas (PA) e raízes (R) de *Peperomia blanda*. Condição cromatográfica: gradiente de 10 a 100% de MeOH em 70 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex C-18, λ = 250 nm.

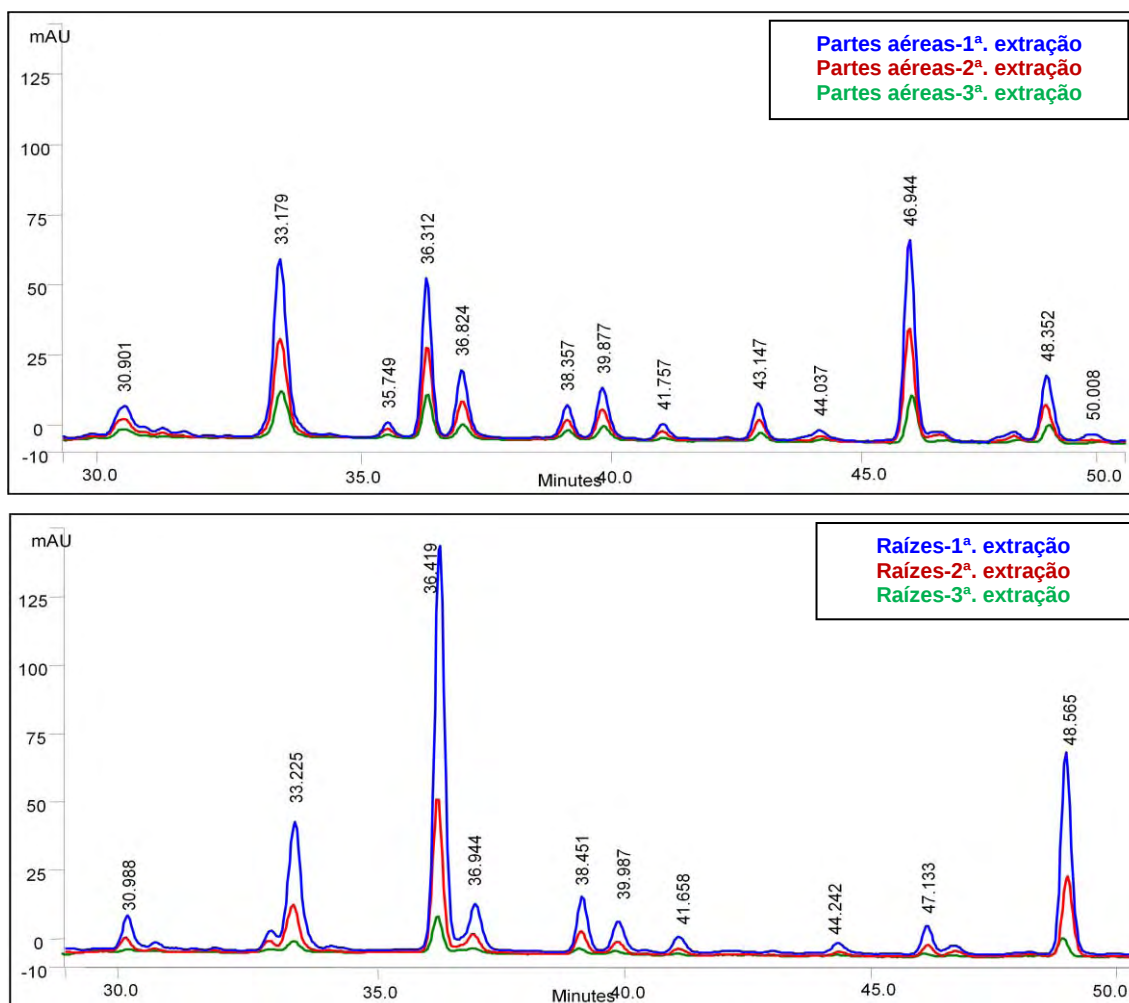


Tabela 11: Rendimento dos extratos metanólicos das partes aéreas de *Peperomia blanda* obtidos em três extrações sequenciais e em suas triplicatas.

	replicata 1 (mg)	replicata 2 (mg)	replicata 3 (mg)	Médias (mg)	Desvio padrão	CV (%)
extração 1	28,1	27,7	28,1	27,97	0,19	0,67
extração 2	3,9	3,7	4,0	3,87	0,12	3,23
extração 3	1,0	1,1	1,0	1,03	0,05	4,56
extração 4	0,5	0,4	0,5	0,47	0,05	10,10
Total	33,5	32,9	33,6	33,33	0,31	0,93

Tabela 12: Rendimento dos extratos metanólicos das raízes de *Peperomia blanda* obtidos em três extrações seqüenciais e em suas triplicatas.

	replicata 1 (mg)	replicata 2 (mg)	replicata 3 (mg)	Médias (mg)	Desvio padrão	CV (%)
extração 1	8,0	8,3	8,2	8,17	0,12	1,53
extração 2	1,9	1,7	1,8	1,80	0,08	4,54
extração 3	0,8	0,7	0,8	0,77	0,05	6,15
extração 4	0,1	0,1	0,2	0,13	0,05	35,36
Total	10,8	10,8	11	10,87	0,09	0,87

O cálculo do coeficiente de variação em relação às quantidade dos extratos das partes aéreas e das raízes obtidas nas extrações realizadas, mostrou um valor total que foi inferior à 1 %, sugerindo que o método de extração mostra reprodutibilidade.

O coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) são medidas de dispersão empregada para estimar a precisão dos experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média (MOHALLEM *et al.*, 2008). O CV pode ser expresso como na equação 1:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Onde s é o desvio padrão absoluto e $\bar{x}$ é a média das áreas dos picos cromatográficos. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani, 2004). Para a ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

5.3.2.3. *Limpeza dos extratos.*

Foram testadas técnicas para o preparo das amostras com o objetivo de avaliar a forma mais eficaz de recuperar os compostos de interesse, eliminando o máximo de impurezas ou substâncias que poderiam prejudicar as análises do estudo de variabilidade metabólica. Outro objetivo foi encontrar um procedimento fácil e eficiente para o grande volume de amostras (48 extratos) a serem analisadas. Para este teste foram preparados três extratos metanólicos (triplicata) como mencionado no item 4.2.3 (p. 33), que foram ressuspensos em 2 mL de metanol cada um e este volume foi dividido em duas alíquotas de 1 mL cada. Cada alíquota foi submetida a um procedimento de limpeza: extração em fase sólida (EFS) ou extração líquido-líquido (ELL) com solventes de diferentes polaridades, sendo considerada a fração extraída com acetato de etila.

As quantidades em massa das alíquotas iniciais e após os procedimentos de preparo das amostras estão descritos na tabela 13:

Tabela 13: Quantidades dos extratos obtidas após procedimentos de extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL).

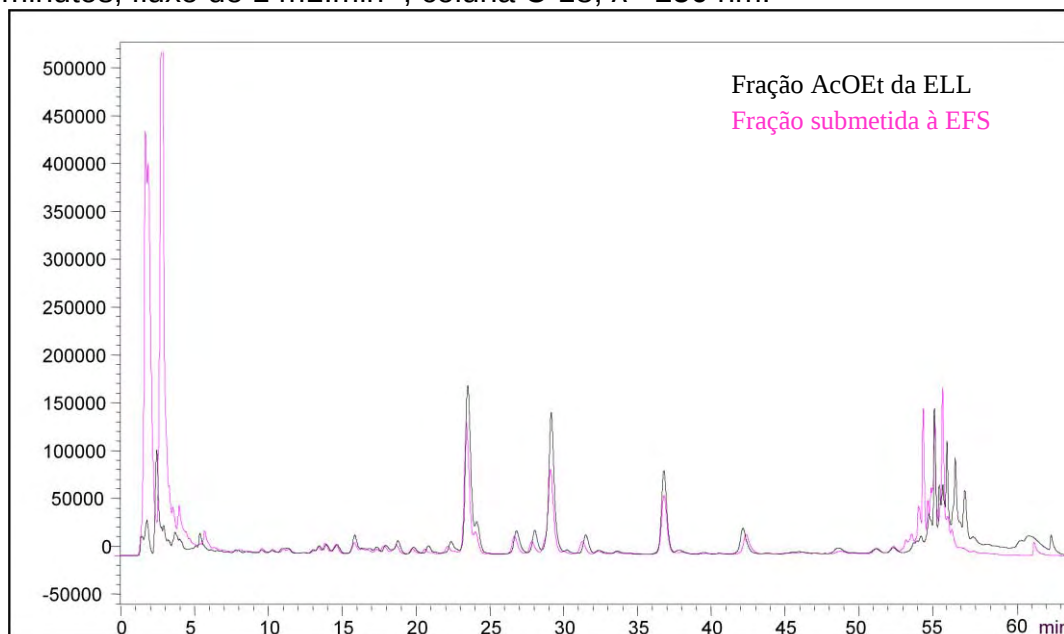
	Massa inicial do extrato (mg)	Massa após EFS (mg)	Massa após ELL (mg)
Extrato 1	53,8	38,0	40,4
Extrato 2	50,4	39,5	39,2
Extrato 3	51,2	40,2	40,9

Estas amostras foram analisadas por CLAE. Após comparação das áreas dos picos que apresentam tempo de retenção entre 10 e 50 minutos dos cromatogramas, fica claro que a ELL é mais eficiente, resultando em maior recuperação das substâncias de interesse, bem como na obtenção de um extrato livre de interferentes (Tabela 14 e Figura 37, p. 87).

Tabela 14: Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos com tempo de retenção entre 10 e 50 minutos, amostras submetidas à procedimentos de extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL).

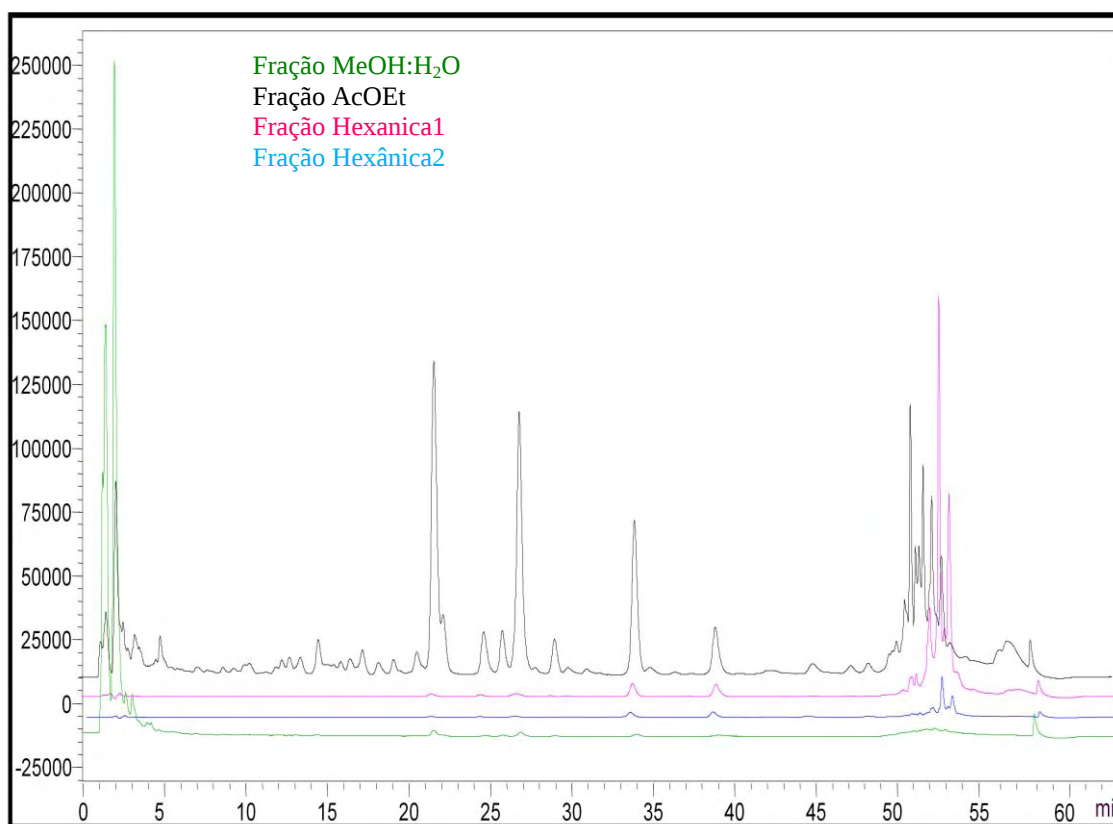
	EFS	ELL
Extrato 1	133589615	165752128
Extrato 2	136568923	159987589
Extrato 3	128889633	171589212
Médias	133016057	165776309
Desvios padrão	3871641	5800849
CV (%)	2,91	3,50

Figura 37: Comparação entre a fração AcOEt da ELL e da amostra submetida à EFS. Condição de análise: gradiente de 10 a 100% de MeOH em 70 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹, coluna C-18, λ = 250 nm.



A técnica de extração líquido-líquido também apresentou grande reprodutibilidade, como pode ser visto pelos baixos valores de CV entre as extrações. Mostra também que é bastante eficiente, como observado nos cromatogramas dispostos na figura 38 (p. 88), pois concentra as substâncias de interesse apenas na fração AcOEt.

Figura 38: Comparação entre os cromatogramas das frações resultantes da extração líquido-líquido. Condição de análise: gradiente de 10 a 100% de MeOH em 70 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹, coluna C-18, λ = 250 nm.



Desta forma, a extração líquido-líquido foi selecionada como a técnica de preparação das amostras para posterior análise por CLAE-DAD.

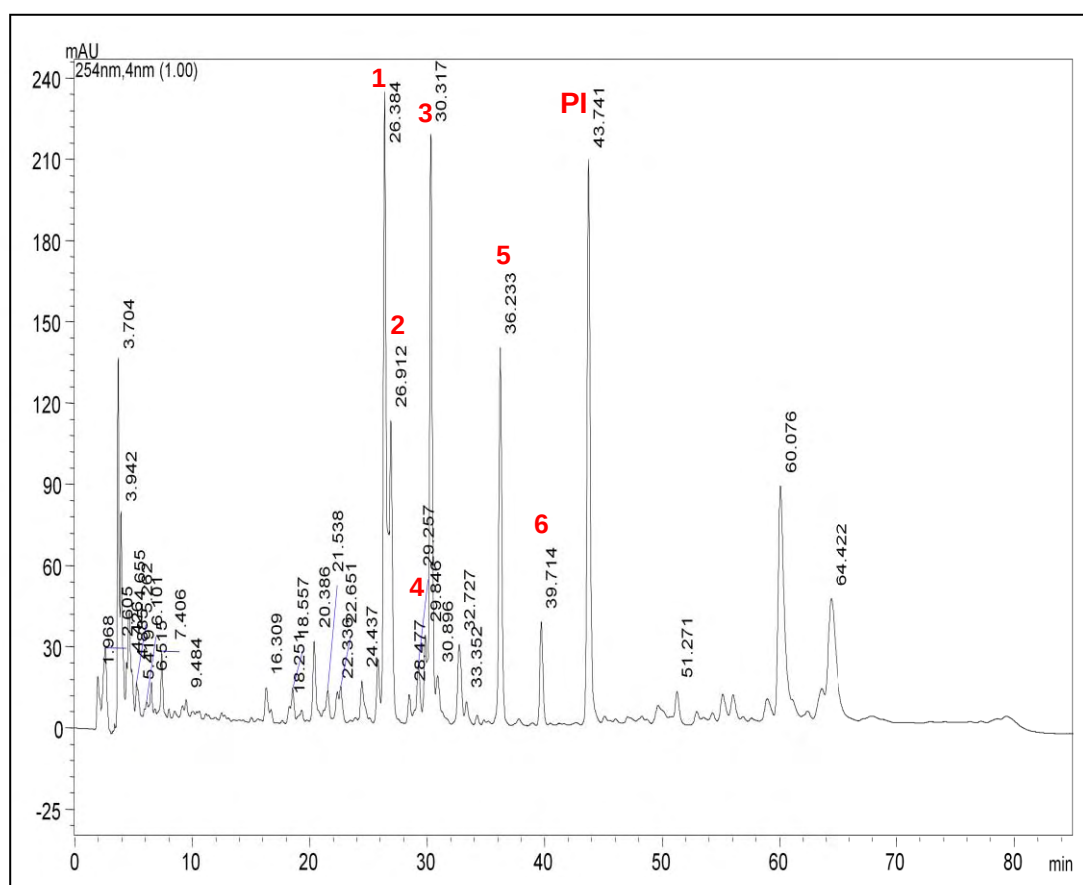
5.3.2.4. *Uso de padrão interno*

A adição de padrão interno (PI) se faz necessária para a correção de erros inerentes a etapa de preparo/extração da amostra, além de permitir correção nos tempos de retenção (*tr*) dos analitos. A utilização da razão entre a área do pico analisado e a área do PI corrige possíveis erros do processamento da amostra, uma vez que o PI é adicionado no início do processo, juntamente com o solvente extrator. Do mesmo modo, utilizando a relação entre os *tr* do analito e do PI pode-se corrigir eventuais desvios dos *tr*.

Um padrão interno considerado ideal deve ser similar às substâncias a serem quantificadas, ter tempo de retenção próximo a estas, não reagir com

nenhum componente da matriz, não fazer parte da amostra e apresentar tempo de retenção diferente das demais substâncias presentes na amostra (RIBANI et al., 2004). Considerando isto, quatro lignanas foram avaliadas para a padronização interna: sesamina, burchelina, licarina A e canelina B (Figura 18, p. 44), nas mesmas condições de análise das matrizes. A substância que melhor se adequou aos requisitos necessários foi a licarina A que apresentou tempo de retenção bastante diferente das substâncias originais da matriz (Figura 39, p. 89). A adição de um padrão interno no procedimento de extração das amostras auxilia na avaliação da recuperação das amostras (discutido no item 5.3.4.6, p. 115). Conhecendo-se a concentração inicial adicionada do padrão interno, pode-se calcular sua recuperação após os procedimentos de preparo, análise e quantificação, o que pode ser considerado para as substâncias contidas na matriz.

Figura 39: Partes aéreas de *Peperomia blanda* após procedimentos de extração com metanol contendo padrão interno ELL. Condição cromatográfica: 20% a 100% de ACN, vazão 1 mL.min⁻¹, 250 nm.



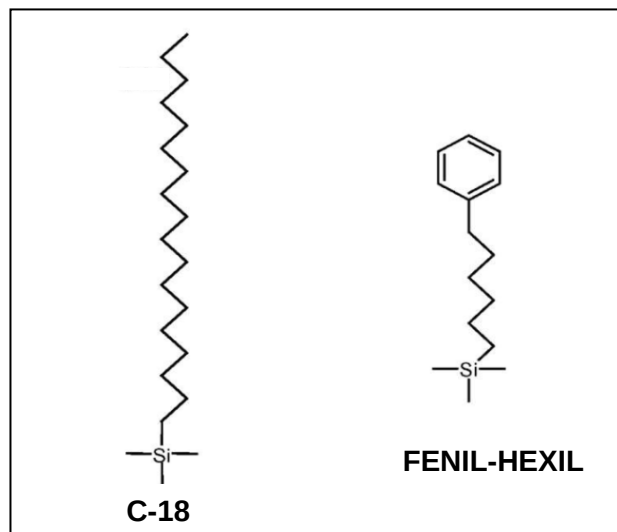
5.3.3. Desenvolvimento do método cromatográfico

5.3.3.1. Teste para melhor coluna cromatográfica

Não existe uma “coluna universal” apropriada para qualquer tipo de separação. O sucesso da separação depende, em grande parte, da estrutura química da fase estacionária, fator determinante de sua seletividade. As fases estacionárias funcionalizadas são usadas para casos especiais de separação, principalmente quando o grupo octadecil por si só não apresenta resolução satisfatória em condições pré-estabelecidas. Estas fases modificadas trabalham basicamente pelo mesmo efeito hidrofóbico com água contida na fase móvel assim como as fases reversas normais, porém oferecem interações complementares com compostos analisados. Estas interações adicionais podem alterar a seletividade e melhorar a resolução de substâncias específicas em relação à fase estacionária C18 (NOWIK *et al.*, 2011).

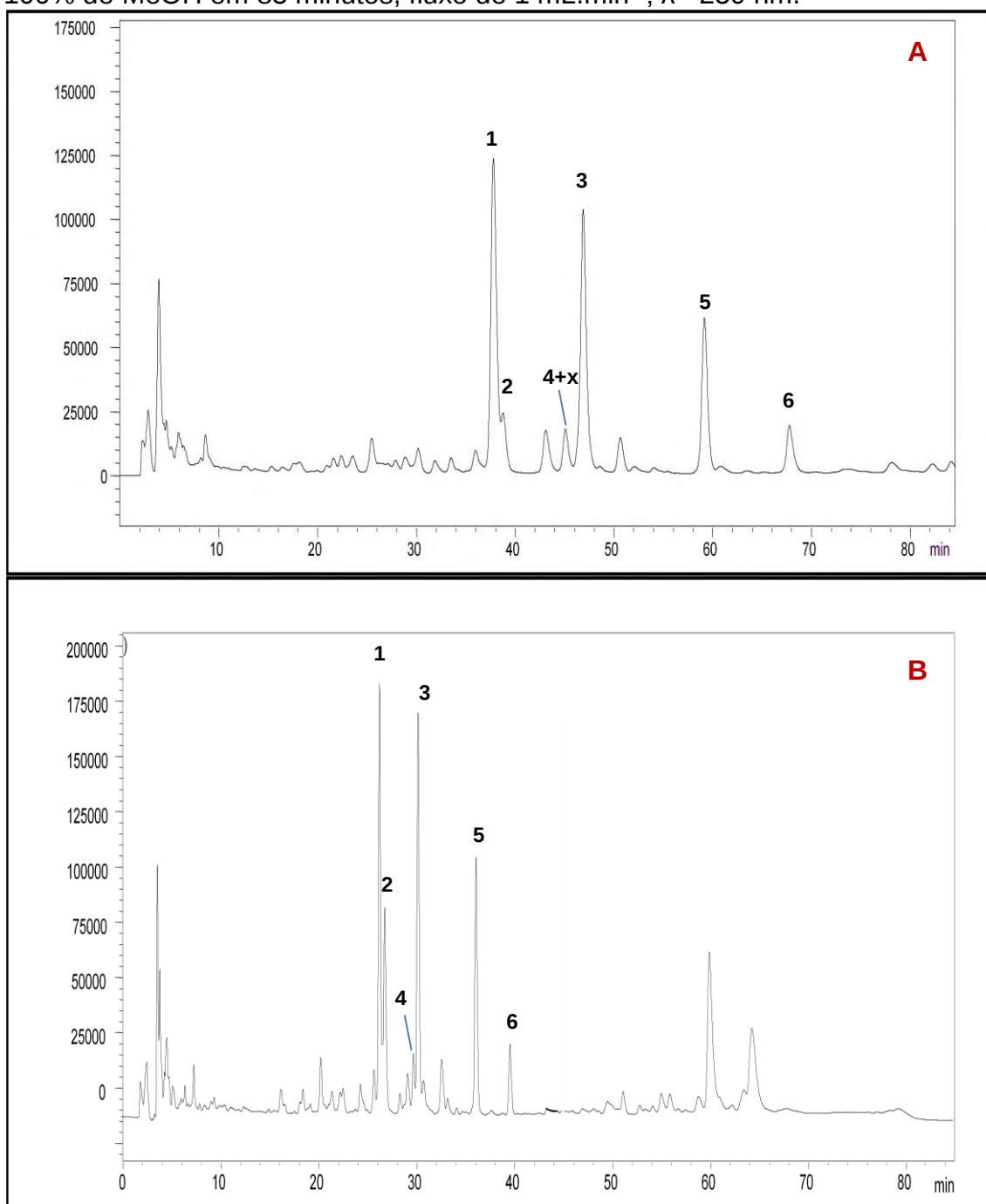
No caso das amostras estudadas, algumas substâncias como os diastereoisômeros **2** e **3**, apresentaram dificuldade para obtenção de resolução cromatográfica satisfatória. Com isso, uma coluna com fase estacionária funcionalizada com o grupo fenil-hexil foi escolhida para testar sua seletividade frente a estas substâncias em relação à coluna com fase estacionária C-18 (figura 40, p. 90).

Figura 40: Fases estacionárias testadas para análises de extratos de *Peperomia blanda*.



A identificação das substâncias no cromatograma do extrato foi realizada por semelhança dos tempos de retenção com dos seus padrões, analisados nas mesmas condições. Os cromatogramas obtidos com as duas colunas testadas mostrou uma melhor resolução dos picos quando o extrato é analisado em coluna com fase estacionária fenil-hexil (Figura 41, p. 91).

Figura 41: Comparação entre os cromatogramas obtidos utilizando (A) coluna C-18 e (B) coluna fenil-hexil. Condição de análise: gradiente de 10 a 100% de MeOH em 85 minutos, fluxo de 1 mL.min⁻¹, λ = 250 nm.



A característica principal da coluna com grupo fenil-hexil para melhor interação com as lignanas são as interações do tipo π - π aromáticas que podem ser diferenciadas de acordo com a suas disposições espaciais.

5.3.3.2. Seleção das condições cromatográficas

Na otimização de métodos de análise por cromatografia, uma das metas é o equilíbrio entre o menor tempo de análise e uma melhor resolução cromatográfica (ARAGÃO et al., 2009). A resolução, R_s , é a medida quantitativa da separação de dois picos adjacentes, calculada a partir da equação 2:

$$R_s = 2Dt / (tw_1 + tw_2) \quad (2)$$

onde: Dt é a medida da separação dos máximos de dois picos adjacentes; e tw_1 e tw_2 são as larguras das bases dos picos, obtidas tangenciando-se as gaussianas até que interceptem a linha base. Quanto maior o valor de R_s , melhor será a separação entre picos de substâncias que eluem seguidamente. Deste modo a resposta analítica para estudos de otimização do método, pode ser considerada a resolução (ARAGÃO et al., 2009).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR ou RSM, de *Response Surface Methodology*), é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. Sua aplicação permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A. Fase móvel e tempo de análise

Os parâmetros fator de retenção (k) e seletividade (α) são determinados pelas condições que afetam a retenção ou o equilíbrio de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, isto é, composição da fase móvel, composição da fase estacionária (coluna) e temperatura. Mudanças na fase móvel e estacionária geralmente afetarão k e α simultaneamente, mas terão menor efeito sobre o número de pratos teóricos (N). O N depende diretamente do tipo e do comprimento da coluna, da vazão da fase móvel e do tamanho das partículas. A retenção da amostra (k) pode ser controlada variando a força de eluição do solvente da FM (Snyder e Kirkland, 1979).

Com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica obtida nos experimentos preliminares, inicialmente propôs-se um método para avaliar a influência do tempo e de diferentes proporções entre metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) na fase orgânica da fase móvel, visando variar a força de eluição e a seletividade da fase móvel.

Na otimização das variáveis fase móvel e tempo de análise, utilizou-se o planejamento experimental em estrela e o fator resposta foi a resolução dos picos cromatográficos das seis substâncias de interesse. As resoluções foram calculadas para todos os picos de interesse e a média das menores resoluções de todos os picos foi considerada a resposta final de cada cromatograma. Estas respostas estão apresentadas na tabela 15 e foram utilizadas para o cálculo do ótimo da condição cromatográfica relacionando proporção de ACN na fase orgânica da fase móvel e tempo de análise (TA).

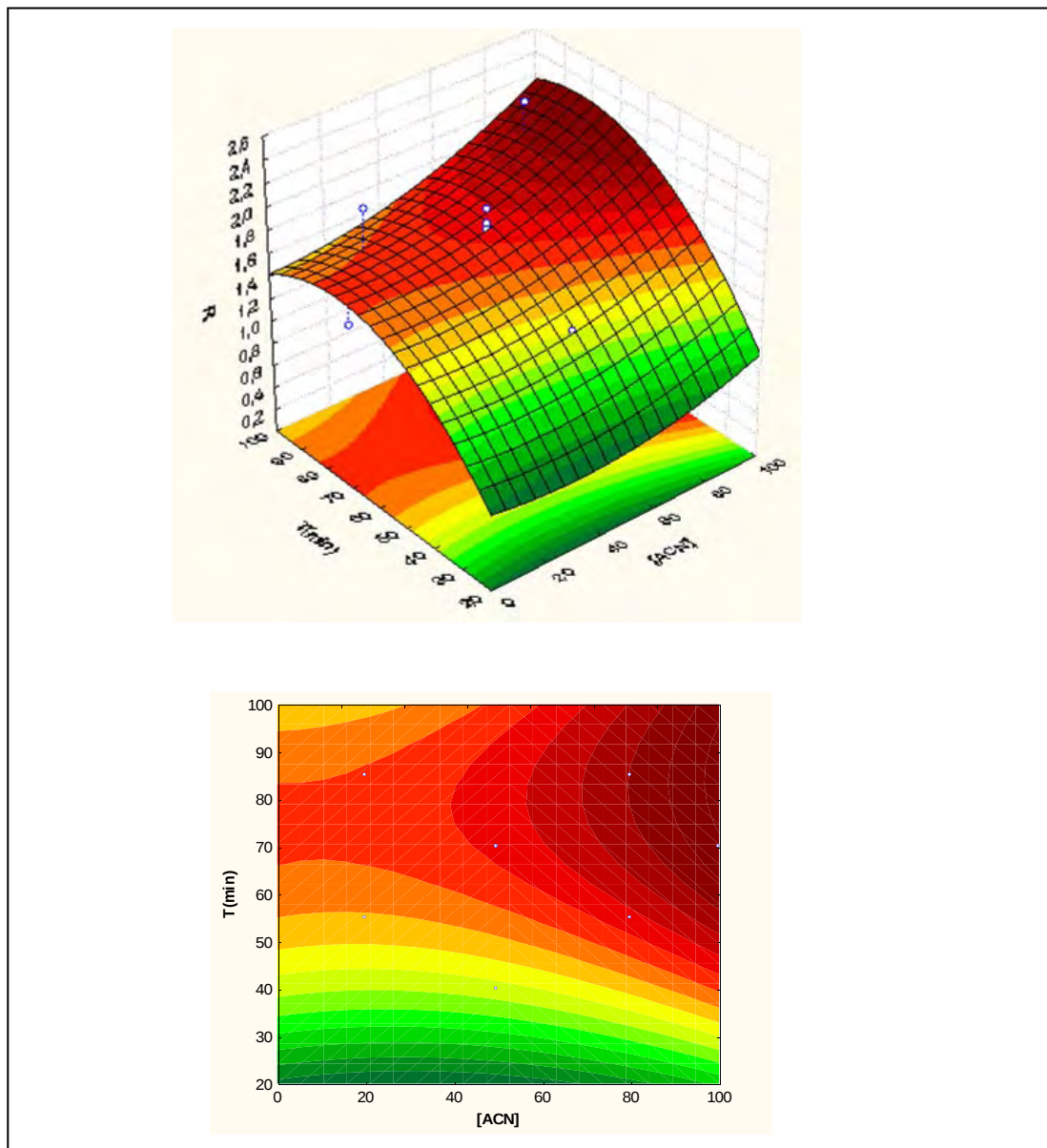
Tabela 15: Resolução dos picos em função dos experimentos do planejamento em estrela.

ACN % (Código)	Tempo (min)	Substâncias						Média
		1	2	3	4	5	6	
0 (-1,4)	70 (0)	1,15	1,15	1,85	1,70	1,90	2,75	1,75
20 (-1)	55 (-1)	1,15	1,15	0,00	0,00	4,40	4,15	1,81
20 (-1)	85 (+1)	1,30	1,30	1,15	1,30	4,70	5,00	2,46
50 (0)	40 (-1,4)	0,75	0,80	0,00	0,00	4,20	3,90	1,61
* 50 (0)	70 (0)	1,00	1,00	0,00	0,00	4,75	4,55	1,89
		1,00	1,00	0,00	0,00	4,80	4,55	1,89
		1,00	0,95	0,00	0,00	4,80	4,50	1,88
50 (0)	100 (+1,4)	1,00	1,00	0,00	0,50	5,85	1,60	1,66
80 (+1)	55 (-1)	0,90	0,90	0,50	0,00	5,10	5,10	2,08
80 (+1)	85 (+1)	1,10	0,80	0,90	1,35	6,30	6,15	2,77
100 (+1,4)	70 (0)	0,95	0,95	0,85	0,65	5,35	5,75	2,42

* Ponto central em triplicata

Como resultado, obteve-se a superfície de resposta apresentado a seguir (Figura 42, p. 95).

Figura 42: Superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos no planejamento experimental para otimização da proporção de ACN na fase orgânica em função do tempo de análise.



A equação que descreve a curvatura da superfície de resposta apresentada é:

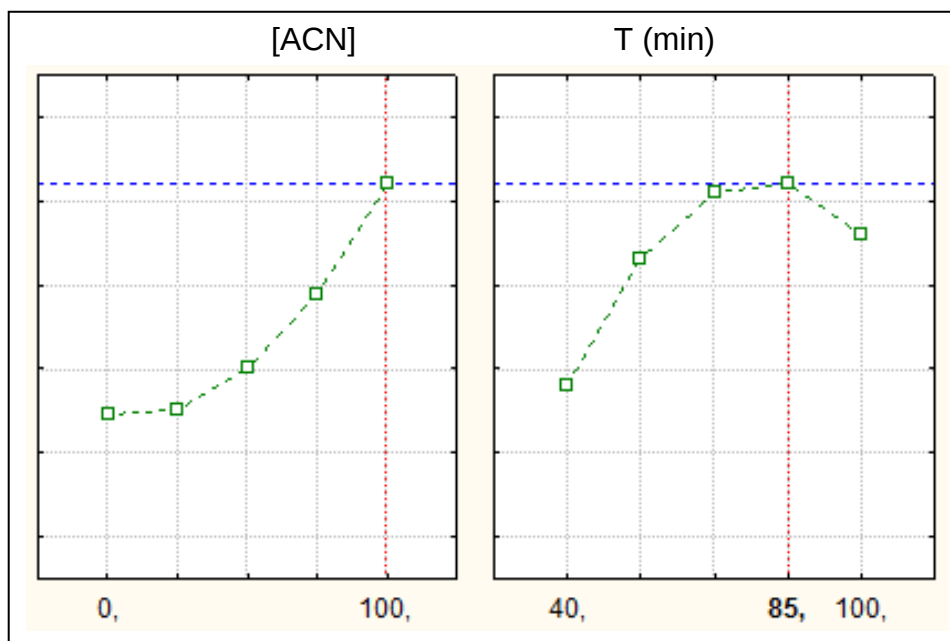
$$R = -0,157 - 0,0054 \cdot ACN + 0,0477 \cdot T + 6,7276 \cdot 10^{-5} \cdot ACN \cdot ACN + 6,1111 \cdot 10^{-5} \cdot ACN \cdot T - 0,0003 \cdot T \cdot T$$

Onde R é a resolução em cada ponto da equação, ACN é a porcentagem de acetonitrila e T é o tempo de análise correspondente.

De acordo com a superfície de resposta gerada a partir do planejamento experimental, a melhor resolução dos picos de interesse está relacionada à

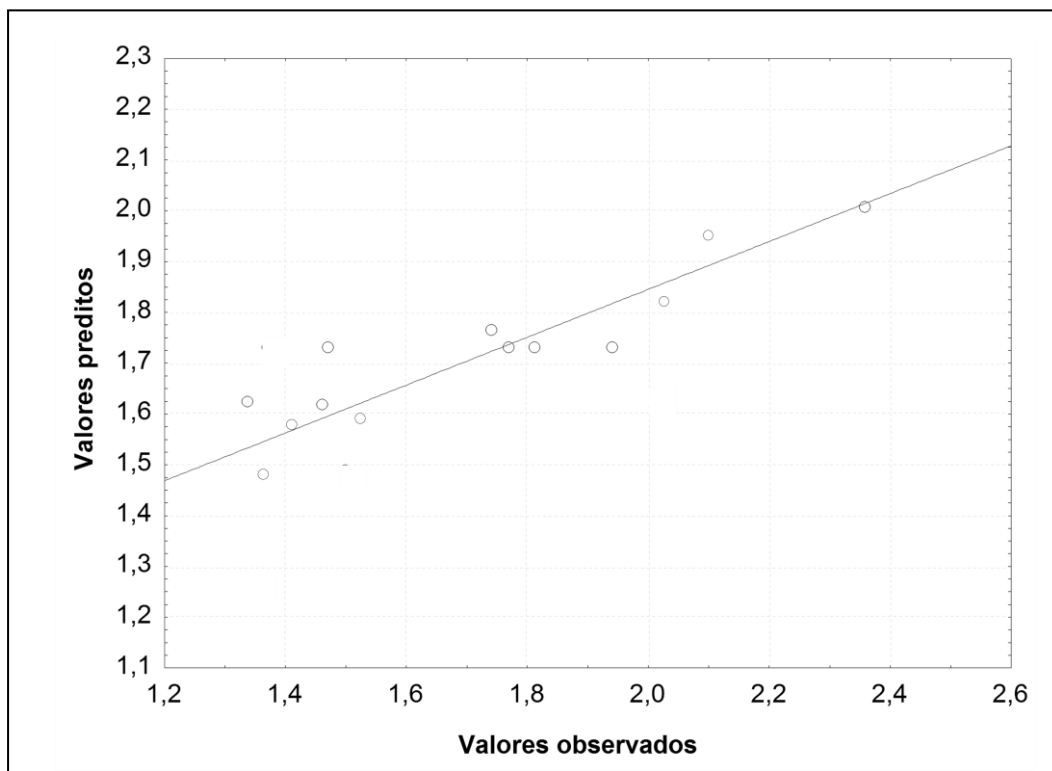
região de coloração vermelho intenso. O ótimo desta região foi determinado pela utilização do programa Statística 8.0 e corresponde a 100% de ACN da fase orgânica em um tempo de gradiente de 85 minutos (Figura 43, p. 96).

Figura 43: Valores ótimos de porcentagem de ACN e de tempo de análise determinados pelos resultados dos experimentos do planejamento estatístico.



O ajuste do modelo estatístico utilizado também é calculado a partir do programa Statística 8.0, que mostra a relação entre os valores tidos como ideais e os valores obtidos experimentalmente. A análise deste gráfico mostra boa proximidade entre os pontos (dados experimentais) e a reta (resultados ideais), mostrando que os resultados são satisfatórios (Figura 44, p. 97).

Figura 44: Comparação entre os valores preditos e observados no planejamento estatístico para avaliação do ajuste do modelo utilizado.



B. Temperatura e vazão da fase móvel

Além do tempo e das fases estacionária e móvel, que têm grande influência sobre os valores de fator de retenção (k) e seletividade (α), outros parâmetros podem ser ajustados para melhorar a separação cromatográfica. Dentre eles, temperatura e vazão da fase móvel.

A temperatura tem influência sobre o equilíbrio entre o soluto e as fases móvel e estacionária, afetando diretamente o fator de retenção (k). Um aumento de 1°C na temperatura da coluna geralmente diminui o fator de retenção de 1 a 2%. Uma mudança em k pode resultar também em uma mudança em α . Dessa forma, a temperatura é um parâmetro útil para se obter mudanças no espaçamento entre picos e melhorar a resolução (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010).

Se mesmo após o ajuste de k e α a resolução necessitar ser melhorada, um aumento em N é uma opção. O aumento do número de pratos teóricos (N)

pode ser alcançado aumentando-se o comprimento da coluna ou otimizando a vazão e aumentando o tempo de análise (Leme, 2011).

A fim de avaliar a influência desses parâmetros e selecionar as condições que propiciassem a melhor separação cromatográfica, utilizou-se um planejamento fatorial 3^2 , sendo as variáveis, temperatura da coluna cromatográfica e vazão da fase móvel. O volume de amostra injetado foi fixado em 30 μL .

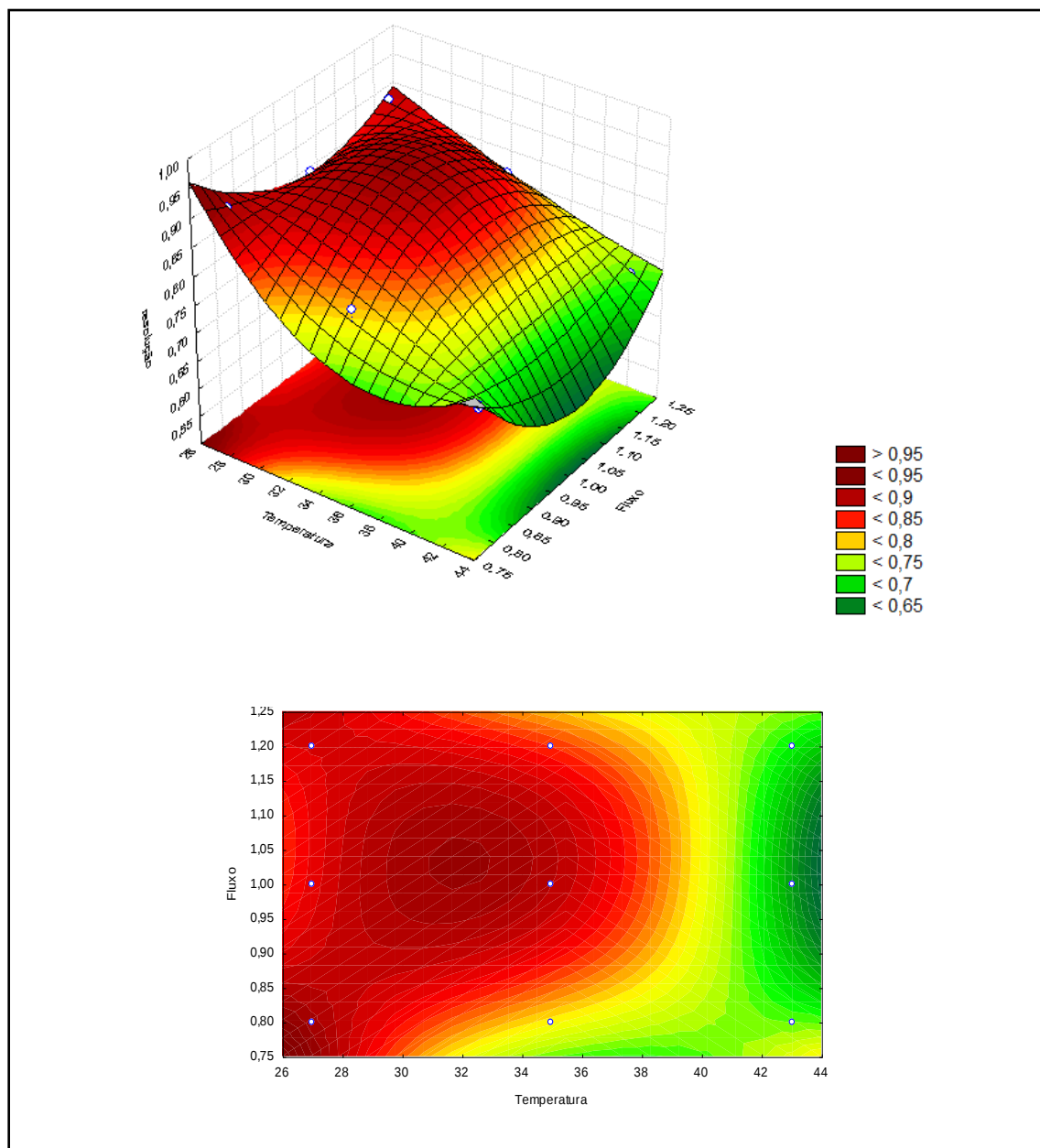
Neste planejamento, utilizou-se mais uma vez como fator resposta a resolução total do cromatograma em cada condição. Esta resolução foi calculada a partir da média das menores resoluções dos picos das substâncias de interesse, para cada cromatograma, e estão dispostas na tabela 16 (p. 98).

Tabela 16: Resolução dos picos em função dos experimentos do planejamento fatorial 3^2 .

Temperatura °C (Código)	Vazão $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Código)	Substâncias						Média
		1	2	3	4	5	6	
43 (+1)	0,8 (-1)	1,05	1,10	1,00	0,80	1,80	1,85	1,27
43 (+1)	1 (0)	0,85	0,85	0,85	0,90	1,90	2,25	1,27
43 (+1)	1,2 (+1)	0,85	0,95	1,05	0,45	2,00	1,80	1,18
35 (0)	0,8 (-1)	0,90	0,45	1,10	1,10	2,35	2,25	1,36
35 (0)	1 (0)	1,05	0,80	1,10	1,10	1,10	1,15	1,05
		1,00	0,80	1,05	1,15	1,05	1,20	1,04
		1,00	0,85	1,10	1,10	1,10	1,15	1,05
35 (0)	1,2 (+1)	0,75	0,95	1,05	0,65	0,90	1,05	0,89
27 (-1)	0,8 (-1)	0,70	0,65	0,70	0,60	2,25	1,90	1,13
27 (-1)	1 (0)	1,00	1,20	0,60	0,45	2,00	2,05	1,22
27 (-1)	1,2 (+1)	1,00	1,05	1,15	0,60	2,25	2,95	1,50

Utilizando o planejamento fatorial 3^2 e o modelo de interação linear quadrática do programa *Statistica 8.0*, obteve-se a superfície de resposta apresentada na figura 45 (p. 99).

Figura 45: Superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos nos experimentos de otimização da temperatura da coluna em função da vazão da fase móvel.



A equação que descreve a curvatura da superfície de resposta apresentada é:

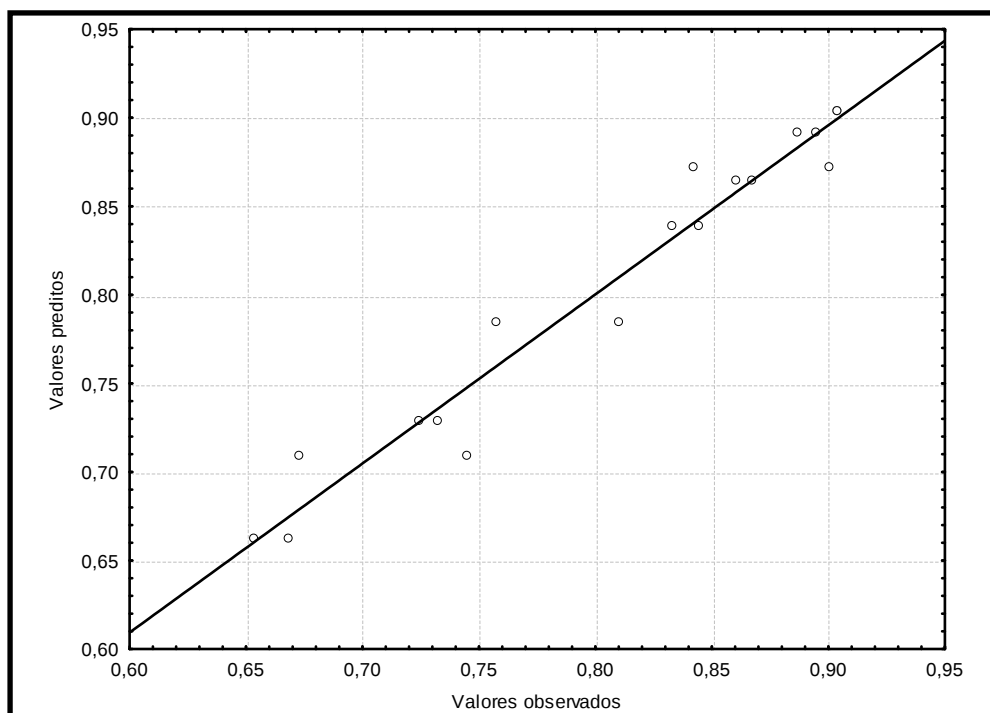
$$R = 56,264 - 3,324 \cdot V + 0,048 \cdot V^2 - 110,954 \cdot T + 53,575 \cdot T^2 + 6,679 \cdot V \cdot T - 3,228 \cdot V \cdot T^2 - 0,097 \cdot T \cdot V^2 + 0,047 \cdot V^2 \cdot T^2$$

Onde R é a resolução em cada ponto da equação, V é a vazão da fase móvel e T é a temperatura de análise correspondente.

De acordo com a superfície de resposta gerada a partir dos resultados experimentais do planejamento fatorial, a melhor resolução dos picos de interesse está relacionada à região de coloração vermelho intenso. Neste experimento observam-se dois valores ótimos, um deles com valores de 32°C e vazão da fase móvel de 1,1 mL.min⁻¹ e outro de 27°C e vazão de 0,8 mL.min⁻¹.

Observa-se que o modelo estatístico utilizado apresentou-se bastante ajustado, uma vez que os valores experimentais estão bem próximos dos preditos, como mostra a figura 46 (p. 100).

Figura 46: Comparação entre os valores preditos e observados no planejamento estatístico para avaliação do ajuste do modelo utilizado.



C. Teste das condições selecionadas.

A partir do planejamento estatístico, as condições experimentais otimizadas foram:

- FASE MÓVEL: 100% de ACN em relação ao MeOH;
- TEMPO DE ANÁLISE: 85 minutos
- TEMPERATURA DA COLUNA: 27°C ou 32°C
- VAZÃO DA FASE MÓVEL: 0,8 mL.min⁻¹ ou 1,1 mL.min⁻¹.

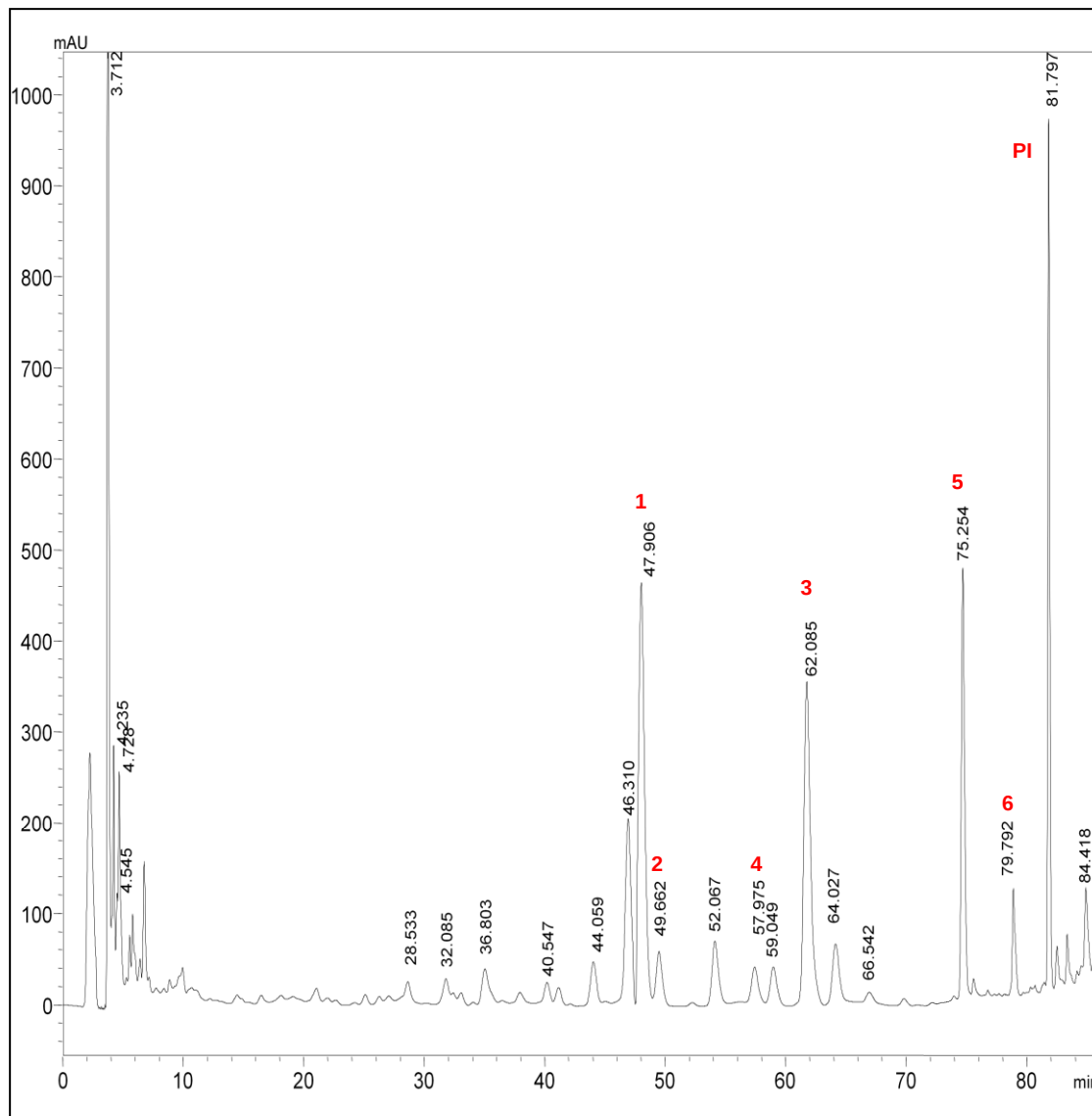
Todas as condições pré-estabelecidas foram testadas e mostraram ótima resolução dos picos de interesse. As condições com a temperatura de 27°C e vazão de 0,8 mL.min⁻¹ apresentaram melhores resoluções para os diastereoisômeros **1** e **2**. A temperatura de 27°C também apresenta vantagem operacional por estar próxima da temperatura ambiente da sala onde está alojado o cromatógrafo, não havendo problemas com variações significativas na temperatura do forno da coluna. A condição final do gradiente está descrita na tabela 17 (p. 102).

Tabela 17: Condição cromatográfica final otimizada por planejamento experimental.

Tempo de análise (min)	% do solvente orgânico (ACN)	Temperatura da coluna (°C)	Vazão da FM (mL/min)
0	20	27	0,8
85	100		

Além do tempo de gradiente de análise, devem ser considerados 10 minutos para limpeza da coluna com 100% de ACN e 15 minutos na condição inicial (20% de ACN) para condicionamento da coluna precedendo a análise da próxima amostra. O cromatograma utilizando as condições otimizadas está apresentado na figura 47 (p. 102).

Figura 47: Cromatograma de extrato de partes aéreas de *P. blanda* sob condições otimizadas no planejamento experimental, com identificação das lignanas e do padrão interno (registrado a 250 nm).



Comparando-se este cromatograma final com o cromatograma obtido inicialmente (figura 35, p. 82), pode-se concluir que o preparo da amostra e as condições cromatográficas otimizadas foram fundamentais para a resolução satisfatória de todos os picos de interesse.

As resoluções dos picos correspondentes às substâncias de interesse foram calculadas novamente após o cromatograma final (Tabela 18, p. 103).

Tabela 18: Tempo de retenção e resolução dos picos cromatográficos dos padrões analisados.

Substâncias	Tempo de retenção	Resolução 1	Resolução 2
1	47,906	1,25	1,35
2	49,662	1,35	2,95
3	62,085	2,40	1,50
4	59,049	1,45	2,40
5	75,254	1,30	1,30
6	79,792	2,50	1,90
PI	81,797	1,25	1,30

A análise do cromatograma (Figura 47, p. 102) e das resoluções dos picos referentes às lignanas de interesse (Tabela 18, p. 103) mostra que o método otimizado oferece resolução satisfatória para quantificação das substâncias e determinação da dinâmica metabólica destas.

5.3.4. Validação do método cromatográfico

Para este estudo foram adotadas as normas exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). O guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos descritos nesta resolução sugere a classificação das análises segundo a finalidade do estudo.

O presente estudo é classificado como categoria 1, ou seja, testes quantitativos para a determinação de compostos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Para cada categoria é exigido um conjunto de parâmetros, sendo que para a categoria 1 os parâmetros são: especificidade ou seletividade, robustez, linearidade e intervalo, precisão (repetibilidade) e exatidão.

5.3.4.1. Seletividade

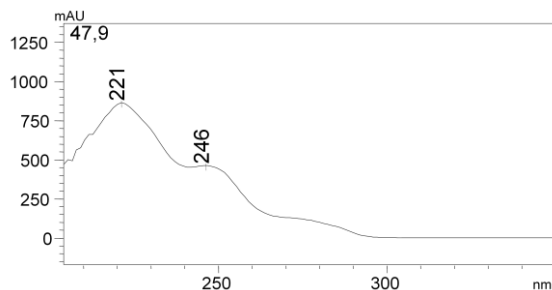
A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Ela é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma delas é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico correspondente à substância em análise com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Sendo assim, após a preparação de extratos de partes aéreas e raízes de *P. blanda* e analisados nas condições cromatográficas otimizadas, os picos referentes às seis lignanas de interesse no estudo de dinâmica metabólica anual foram avaliados quanto a pureza com auxílio do detector com arranjo de diodos (DAD). Todos apresentaram pureza acima de 98%. Seus espectros no UV foram comparados aos dos padrões das mesmas substâncias purificadas e observou-se alta similaridade entre eles (Tabelas 19 e 20, p.105 e 106).

Tabela 19: Espectros no UV dos picos referentes aos padrões das secolignanas **1**, **2** e **3** e comparação com os respectivos picos observados no cromatograma do extrato.

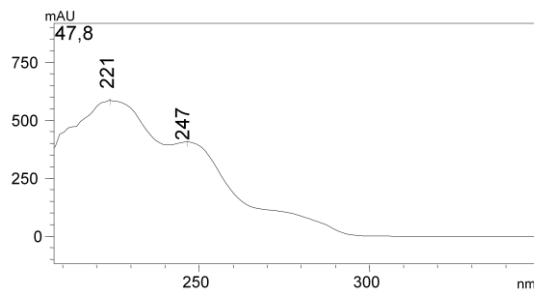
Substância 1

Padrão



Máximos em 221, 246 e 280 nm.

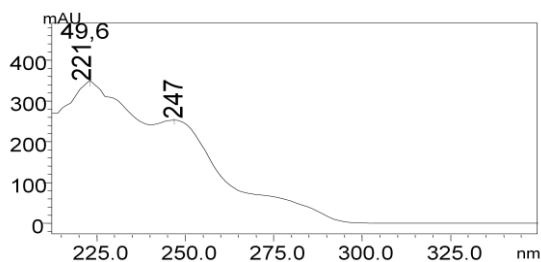
Extrato



Máximos em 221, 247 e 280 nm.

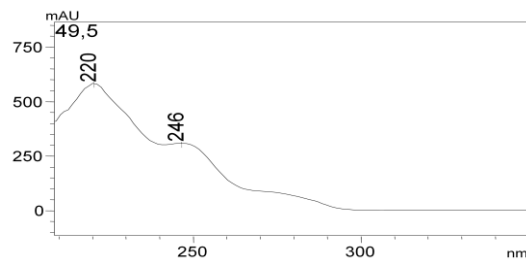
Substância 2

Padrão



Máximos em 221, 247 e 276 nm.

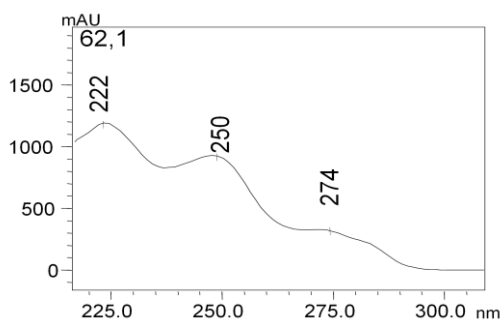
Extrato



Máximos em 220, 246 e 279 nm

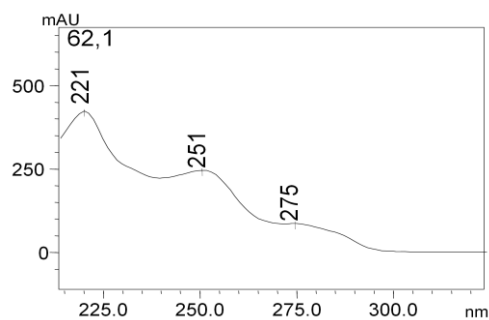
Substância 3

Padrão



Máximos em 222, 250 e 274 nm.

Extrato

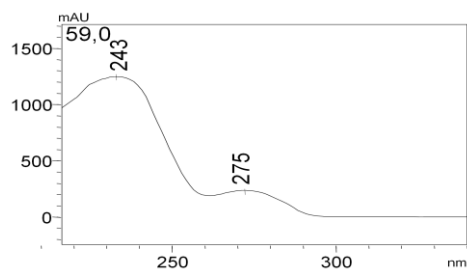


Máximos em 220, 251 e 275 nm.

Tabela 20: Espectros no UV dos picos referentes aos padrões das lignanas tetraidrofurânicas **4**, **5** e **6** e comparação com seus respectivos picos observados no cromatograma do extrato.

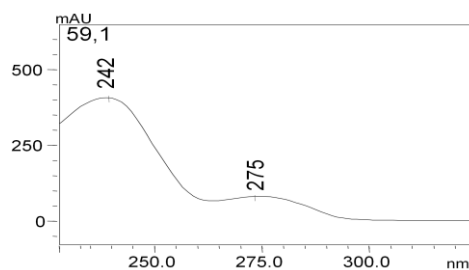
Substância 4

Padrão



Máximos em 243, 275 nm.

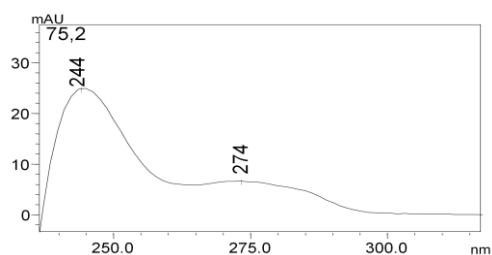
Extrato



Máximos em 242, 275 nm.

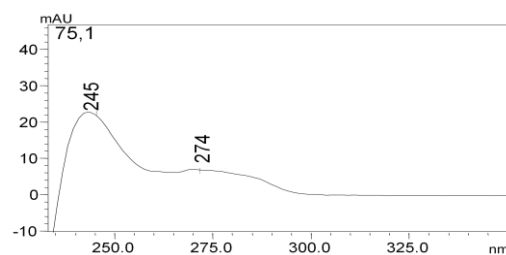
Substância 5

Padrão



Máximos em 244, 274 nm.

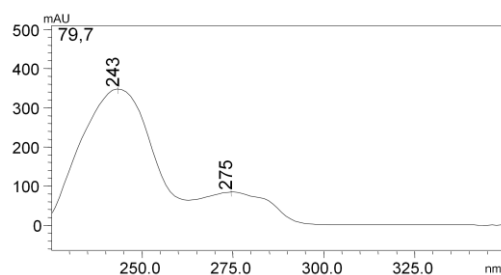
Extrato



Máximos em 245, 274 nm.

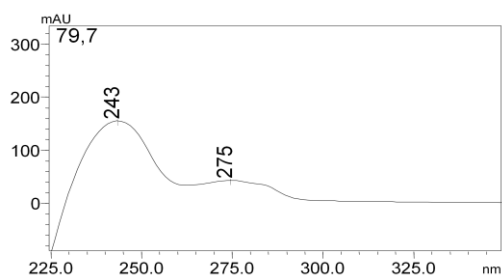
Substância 6

Padrão



Máximos em 243, 275 nm.

Extrato



Máximos em 243, 275 nm.

5.3.4.2. Robustez

A robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas, variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Neste experimento foi proposto avaliar a temperatura da coluna cromatográfica e a composição inicial da fase móvel, uma vez que estes fatores estão sujeitos constantemente à variações externas.

Dentro dos limites estabelecidos ($+2^{\circ}\text{C}$ ou -2°C na temperatura da coluna e $+2\%$ ou -2% de ACN na condição inicial da análise), não houveram mudanças significativas nos tempos de retenção e nas resoluções dos picos das substâncias de interesses (Tabelas 21 e 22, p. 107 e 108).

Tabela 21: Comparação entre os tempos de retenção das secolignanas **1-3** e lignanas tetraidrofurânicas **4-6** em diferentes condições de temperatura da coluna cromatográfica.

Substâncias	25°C Média (tr/min)	29°C Média (tr/min)	Média total	Desvio padrão	CV (%)
1	47,939	47,409	47,674	0,37477	0,79
2	49,655	49,238	49,447	0,29486	0,60
3	62,115	61,601	61,858	0,36345	0,59
4	59,102	58,799	58,951	0,21425	0,36
5	75,313	74,985	75,149	0,23193	0,31
6	79,782	79,127	79,455	0,46315	0,58
PI	81,881	81,412	81,647	0,33163	0,41

Tabela 22: Comparação entre os tempos de retenção das secolignanas **1-3** e lignanas tetraidrofurânicas **4-6** em diferentes concentrações de ACN na fase móvel inicial.

Substâncias	18% ACN Média (tr/min)	22% ACN Média (tr/min)	Média total	Desvio padrão	CV (%)
1	47,911	47,598	47,755	0,22132	0,46
2	49,133	48,981	49,057	0,10748	0,22
3	62,751	62,379	62,565	0,26304	0,42
4	59,503	59,184	59,344	0,22557	0,38
5	75,305	75,014	75,160	0,20577	0,27
6	79,147	78,978	79,063	0,11950	0,15
PI	82,047	81,977	82,012	0,04950	0,06

5.3.4.3. Avaliação da estabilidade da amostra

Este item não é contemplado pela RE 899 da ANVISA, no entanto para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período de tempo razoável, dependendo da necessidade de uso (dias, semanas ou meses) (RIBANI et al., 2004).

Considerando-se que grande número de extratos serão avaliados, é necessário garantir que as amostras finais não sofrerão nenhum tipo de alteração e, por isso, este parâmetro foi avaliado. Com isso, após o preparo de três extratos como descrito no item 4.2.3, as amostras foram analisadas imediatamente após o preparo e depois de 6, 24 e 72 horas de estocagem à temperatura ambiente. Como resultado, não foram verificadas alterações significativas nas áreas totais relativas aos picos das substâncias analisadas do extrato das partes aéreas, mesmo após estocagem nos períodos pré-determinados (Tabela 23, p. 109). A resolução dos picos também não sofreu alteração que pudesse comprometer os processos de quantificação.

Tabela 23: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da somatória das áreas dos picos das substâncias de interesse dos extratos analisados após diferentes tempos de estocagem, à temperatura ambiente.

Tempo	Extrato 1	Extrato 2	Extrato 3
0	37173588	39925981	39715874
6 horas	36912577	37207458	39914774
24 horas	37155841	37227155	36795473
72 horas	39454893	39985123	36752115
Média	37674225	38586429	38294559
Desvio padrão	1193070	1581132	1757994
CV (%)	3,17	4,10	4,59

5.3.4.4. Linearidade e intervalo

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito, num intervalo especificado.

Inicialmente foi avaliado o comportamento da absorbância no detector UV-DAD das classes de lignanas frente a suas concentrações, comparadas pelas áreas dos picos dos padrões. Este teste mostrou que as lignanas da mesma classe apresentam absorbâncias similares na mesma concentração (Tabelas 24 e 25, p. 109 e 110).

Tabela 24: Comparação entre as áreas dos picos das secolignanas **1-3**, em duas concentrações diferentes.

	Áreas	
	Concentração 0,1 mg.mL⁻¹	Concentração 1,0 mg.mL⁻¹
1	638445	6411289
2	644587	6451911
3	631256	6325477
Média	638096	6396226
Desvio Padrão	6672,35	64548,95
CV (%)	1,05	1,01

Tabela 25: Comparação entre as áreas dos picos das lignanas tetraidrofurânicas **4-6**, em duas concentrações diferentes.

	Áreas	
	Concentração 0,1 mg.mL⁻¹	Concentração 1,0 mg.mL⁻¹
4	1400111	14251368
5	1388741	14125896
6	1367892	13987422
Média	1385581	14121562
Desvio Padrão	16340,25	132026,36
CV (%)	1,18	0,93

Estes resultados mostraram que eram necessárias apenas três curvas analíticas, sendo uma para cada classe de lignanas e uma para o padrão interno, a licarina A (Figuras 48, 49 e 50, p. 111 e 112).

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido pelo gráfico que relaciona a resposta do equipamento em função das várias concentrações dos analitos. O modelo linear de regressão assume que a variável aleatória x é conhecida e a variável dependente y é desconhecida. A partir dos mínimos quadrados calculam-se as estimativas do coeficiente angular e do intercepto da curva de regressão resultante. Este modelo é utilizado para prever os valores de y a partir dos valores de x , que no caso são: y = concentração e x = área.

A linearidade da curva de calibração é determinada pelo ensaio de amostras que possuem concentrações de analito dentro da faixa de trabalho pretendida.

Após realizar as diluições, foram obtidas as curvas analíticas representando as concentrações das substâncias em função da área do pico cromatográfico correspondente. As curvas foram plotadas no programa Microsoft Excel 2007.

Figura 47: Curva analítica obtida para a classe das secolignanas realizada com o padrão da substância **1**.

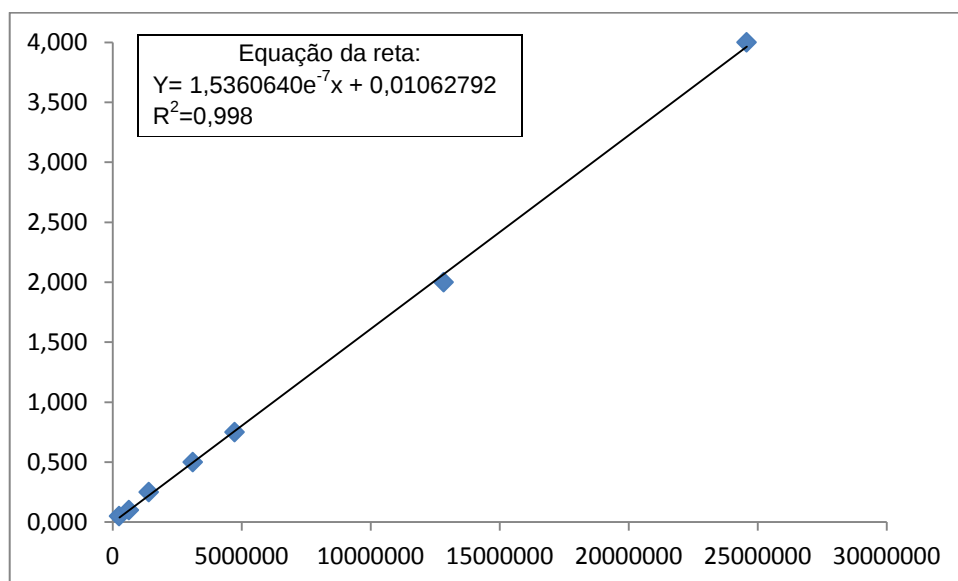


Figura 48: Curva analítica obtida para a classe das lignanas tetraidrofurânicas, realizada com o padrão da substância **5**.

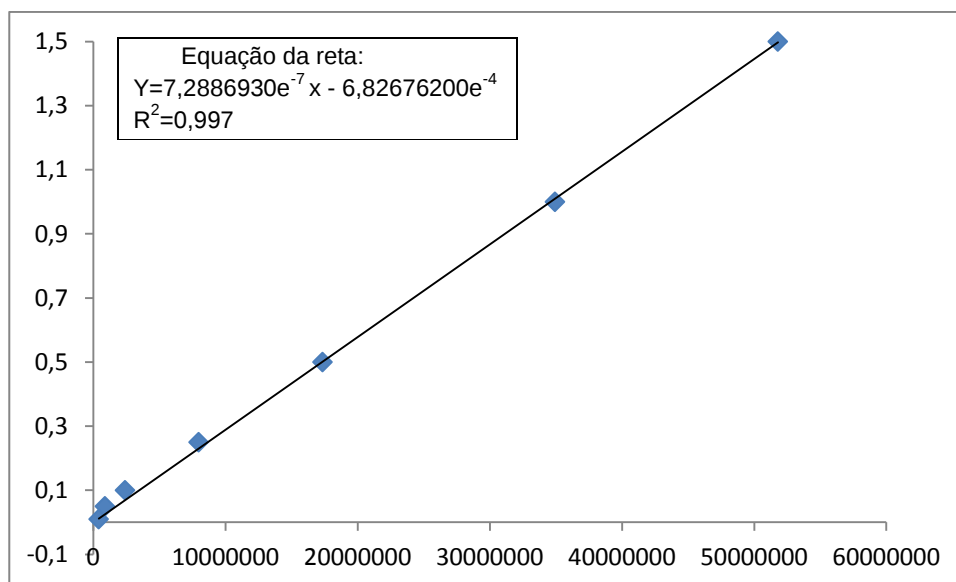
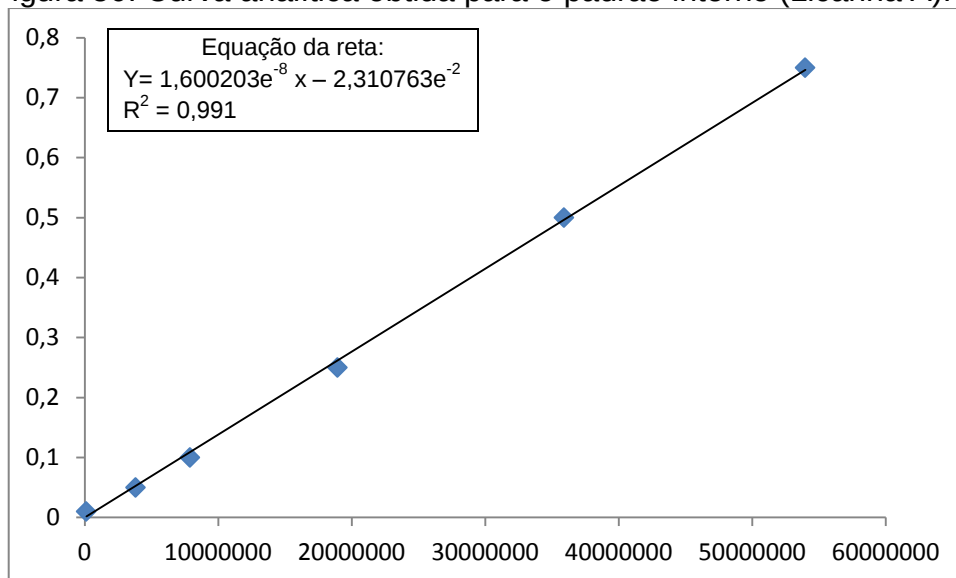


Figura 50: Curva analítica obtida para o padrão interno (Licarina A).



Para a classe das secolignanas, o coeficiente de correlação foi de 0,998, para a classe das lignanas tetraidrofurânicas, o coeficiente de linearidade foi de 0,997 e para o padrão interno (licarina A) o coeficiente de linearidade foi de 0,991. Estes coeficientes, acima de 0,99, como determina a ANVISA, mostraram que o método apresenta linearidade nos intervalos das concentrações analisadas para cada substância.

5.3.4.5. Precisão

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e compreende a repetibilidade, a precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribani et al, 2004). A precisão pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão absoluto, através do intervalo de confiança da média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido como coeficiente de variação (CV):

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo

procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária mede a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes. (RIBANI et al, 2004).

A ANVISA sugere que estes parâmetros sejam verificados a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (RIBANI et al, 2004).

A. Repetitividade

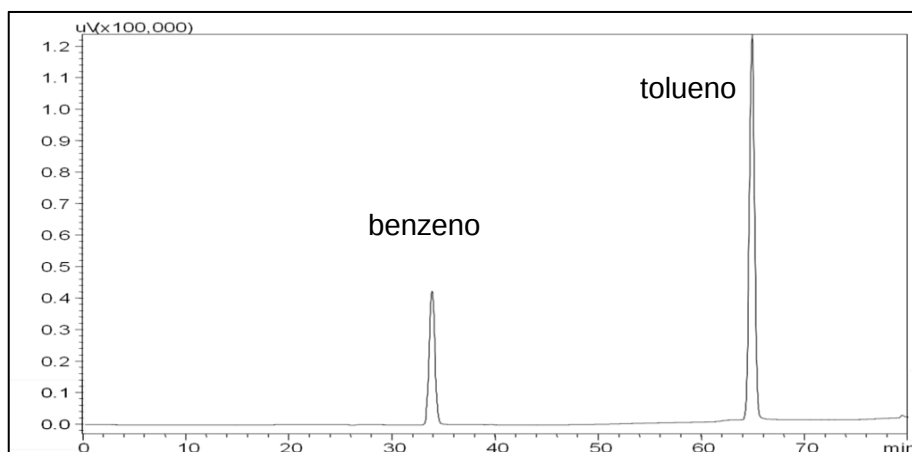
A repetitividade foi avaliada analisando-se uma amostra de padrões de benzeno e tolueno na concentração de 0,1% (v/v) por seis vezes e calculando-se os valores dos coeficientes de variação entre elas. O uso de padrões no lugar do extrato vegetal foi preferido nesta análise para simplificar a matriz e inserir maior confiabilidade aos resultados. Os valores de tempo de retenção e das áreas relativas aos picos cromatográfico dos padrões em estudo estão descritos na tabela 26.

Tabela 26: Médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual calculados para os picos cromatográficos referentes aos padrões benzeno e tolueno analisados no mesmo dia.

Replicata	Benzeno		Tolueno	
	t_r	Área Rel. (%)	t_r	Área Rel. (%)
1	34,056	38,42	65,242	60,01
2	34,099	38,97	65,136	58,79
3	34,184	37,77	65,029	59,14
4	34,222	38,41	64,984	58,87
5	34,154	38,39	64,899	60,06
6	34,201	37,51	65,122	60,11
Média	34,153	38,25	65,069	59,50
SD	0,0638	0,52	0,1224	0,63
CV(%)	0,19	1,37	0,19	1,06

Os resultados indicam baixos valores de coeficientes de variação percentual em relação ao tempo de retenção dos padrões e das áreas relativas de cada um, o que demonstra uma boa repetibilidade da análise e de precisão do equipamento utilizado.

Figura 51: Cromatograma dos padrões benzeno e tolueno. Condição cromatográfica do método otimizado: 20 a 100% de ACN, 85 minutos, vazão 0,8 mL.min⁻¹, temperatura da coluna 27°C, λ 250 nm.



B. Precisão intermediária

A precisão intermediária avaliou os mesmos padrões, benzeno e tolueno, usados nos testes de repetibilidade. Nesse experimento, a mistura dos padrões foi analisada por seis dias consecutivos. A análise dos resultados apresentou baixos valores de CV, corroborando a precisão intermediária do método (Tabela 27, p. 115)

Tabela 27: Dados de médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual das análises da mistura de padrões benzeno e tolueno em análises de dias diferentes.

DIAS	Benzeno		Tolueno	
	t_r	Área Rel. (%)	t_r	Área Rel. (%)
1	34,815	38,98	63,987	58,25
2	34,469	38,01	63,873	59,02
3	34,357	38,35	64,141	59,94
4	34,647	39,37	64,584	58,44
5	34,791	37,71	64,099	60,41
6	34,997	39,25	64,514	58,04
Média	34,679	38,61	64,200	59,02
SD	0,237	0,69	0,287	0,97
CV(%)	0,684	1,78	0,447	1,64

5.3.4.6. Exatidão e recuperação da amostra

A exatidão foi avaliada em termos da recuperação. A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento das amostras, extração e análise, expressa em porcentagem da quantidade final em relação à quantidade inicial conhecida de um analito. A porcentagem de recuperação foi obtida pelo valor da relação entre o teor médio determinado experimentalmente e a concentração teórica correspondente após a adição do analito, multiplicada por 100 (LEMOS et al., 2011).

A recuperação R , (ou fator de recuperação), é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A informação de recuperação pode ser estimada em CRM (materiais de referência certificados), quando a quantidade de substância é previamente conhecida, ou por um composto *substituto* (“surrogate”). O substituto é definido como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste, cujo comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse (RIBANI et al., 2004). Este último método foi selecionado e para isso, quantidade conhecida de licarina A (PI), que não faz parte da matriz original, mas apresenta as características desejadas, foi adicionada em todas as amostras estudadas, e em seguida manipuladas

conforme procedimento de preparo da amostra (item 4.2.3, p. 33). A recuperação foi expressa em porcentagem do teor encontrado após quantificação da amostra final em relação à quantidade de PI adicionada inicialmente na matriz.

A exatidão do método foi determinada pela obtenção da porcentagem de recuperação média avaliada em todas as amostras. Os valores de recuperação da licarina A encontram-se nas tabelas 28 à 31 (p. 116-118).

Tabela 28: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das partes aéreas de *P. blanda* coletada na Ripasa.

MESES DE COLETA	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (mg.mL ⁻¹)	RECUPERAÇÃO (%)
Set/2006	12512075	0,177	88,56
Nov/2006	12144615	0,171	85,62
Jan/2007	12393922	0,175	87,61
Mar/2007	12153742	0,171	85,69
Mai/2007	13340729	0,190	95,19
Jul/2007	13038289	0,186	92,77
Set/2007	13908813	0,199	99,73
Nov/2007	12402272	0,175	87,68
Jan/2008	12186643	0,172	85,95
Mar/2008	12150316	0,171	85,66
Mai/2008	12475785	0,177	88,27
Jul/2008	12806533	0,182	90,91
Média	12626145	0,179	89,47
Desvio padrão	553710	0,009	4,43
CV (%)	4,39	4,95	4,95

Tabela 29: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das raízes de *P. blanda* coletada na Ripasa.

MESES DE COLETA	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (mg.mL ⁻¹)	RECUPERAÇÃO (%)
Set/2006	12200195	0,172	86,06
Nov/2006	12333197	0,174	87,12
Jan/2007	12676494	0,180	89,87
Mar/2007	12169525	0,172	85,81
Mai/2007	12638399	0,179	89,57
Jul/2007	14223710	0,205	102,25
Set/2007	13041936	0,186	92,79
Nov/2007	12285325	0,173	86,74
Jan/2008	12570072	0,178	89,02
Mar/2008	13038548	0,186	92,77
Mai/2008	12882524	0,183	91,52
Jul/2008	12612412	0,179	89,36
Média	12722695	0,180	90,24
Desvio padrão	559787	0,009	4,48
CV (%)	4,40	4,96	4,96

Tabela 30: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das partes aéreas de *P. blanda* coletada na casa de vegetação.

MESES DE COLETA	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (mg.mL ⁻¹)	RECUPERAÇÃO (%)
Set/2006	12586675	0,178	89,15
Nov/2006	13051325	0,186	92,87
Jan/2007	12678813	0,180	89,89
Mar/2007	13059269	0,186	92,93
Mai/2007	12986348	0,185	92,35
Jul/2007	12698411	0,180	90,05
Set/2007	12789933	0,182	90,78
Nov/2007	12119275	0,171	85,41
Jan/2008	12157971	0,171	85,72
Mar/2008	12722887	0,180	90,24
Mai/2008	12963783	0,184	92,17
Jul/2008	14125784	0,203	101,47
Média	12828373	0,182	91,09
Desvio padrão	512758	0,008	4,10
CV (%)	4,00	4,50	4,50

Tabela 31: Valores de recuperação de amostra em função do padrão interno licarina A para os extratos das raízes de *P. blanda* coletada na casa de vegetação.

MESES DE COLETA	ÁREA	CONCENTRAÇÃO (mg.mL ⁻¹)	RECUPERAÇÃO (%)
Set/2006	12542653	0,178	88,80014
Nov/2006	12866045	0,183	91,3876
Jan/2007	12927529	0,184	91,87954
Mar/2007	12079885	0,170	85,09753
Mai/2007	12108545	0,171	85,32684
Jul/2007	12725308	0,181	90,26157
Set/2007	12152982	0,171	85,68238
Nov/2007	12286686	0,174	86,75214
Jan/2008	13709793	0,196	98,13844
Mar/2008	12528558	0,177	88,68737
Mai/2008	12231287	0,173	86,3089
Jul/2008	12980350	0,185	92,30216
Média	12594968,42	0,178	89,22
Desvio padrão	479027,46	0,008	3,83
CV (%)	3,80	4,30	4,30

A determinação da recuperação do analito foi realizada pela sua quantificação na matriz em estudo, pelo emprego de um padrão analítico. O grau de recuperação variou de 85 a 102%, o que está dentro das especificações esperadas. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 e 120%, (RIBANI et al., 2004)

A exatidão do método foi corroborada pelos valores dos coeficientes de variação abaixo de 5%.

5.3.4.7. Análise das matrizes

Após determinação dos procedimentos de extração e preparo de amostras, bem como o desenvolvimento e validação de um método cromatográfico satisfatório, o processo de quantificação das lignanas foi iniciado.

As amostras de partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda* selecionadas foram submetidas às extrações com metanol, seguida das extrações líquido-

líquido. Após suas análises por CLAE-DAD, cada lignana foi quantificada com auxílio das curvas analíticas (figuras 48, 49 e 50, p. 111 e 112).

Para aumentar a confiabilidade do método, foram realizadas análises em triplicata de injeção a cada 8 amostras. A ordem de injeção das amostras foi aleatória. Os valores de CV em relação às áreas totais dos cromatogramas foram calculados e estão dispostos na tabela 32.

Tabela 32: Média, desvio padrão e coeficiente de variação entre as triplicatas de injeção ao longo das análises das amostras .

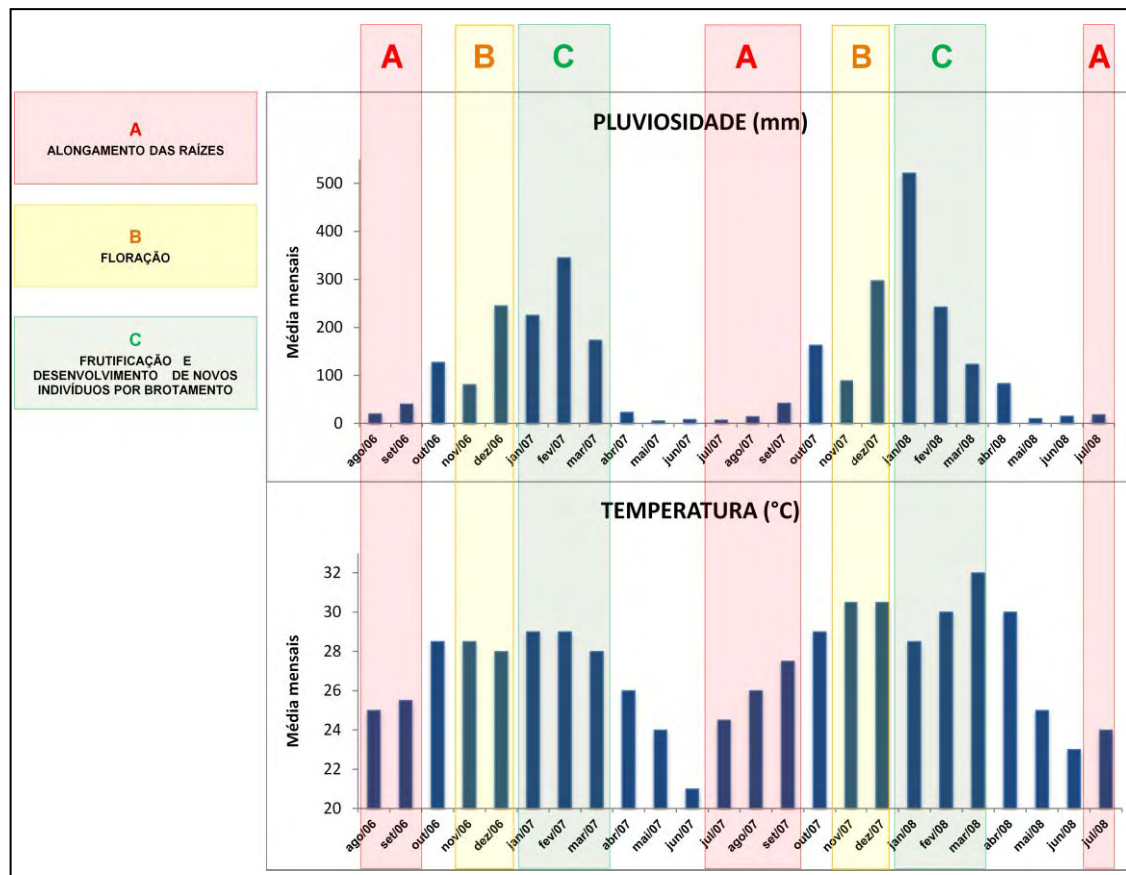
	ÁREAS			MÉDIA	DESVIO PADRÃO	CV (%)
	REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3			
set/07 1 R	311504256	313471236	309947440	311640977	1765872	0,57
jan/08 1 CV	285477133	283921004	289988416	286462184	3151367	1,10
nov/07 2 CV	330254177	335987784	335784117	334008692	3253100	0,97
nov/06 2 CV	339514712	340799920	334847110	338387247	3132470	0,93
mai/08 2 R	251712588	257147001	253363229	254074272	2786108	1,10
jul/08 1 CV	241178936	242522677	245258741	242986784	2079122	0,86

Os baixos valores da constante de variação corroboraram a precisão do equipamento ao longo de todas as análises.

A discussão sobre a dinâmica anual de cada classe está nos itens a seguir. Na tentativa de entender se fatores climáticos ou fenotípicos da espécie estavam ligados às variações das lignanas em questão, estes dados foram coletados durante todo o período estudado, nas duas populações.

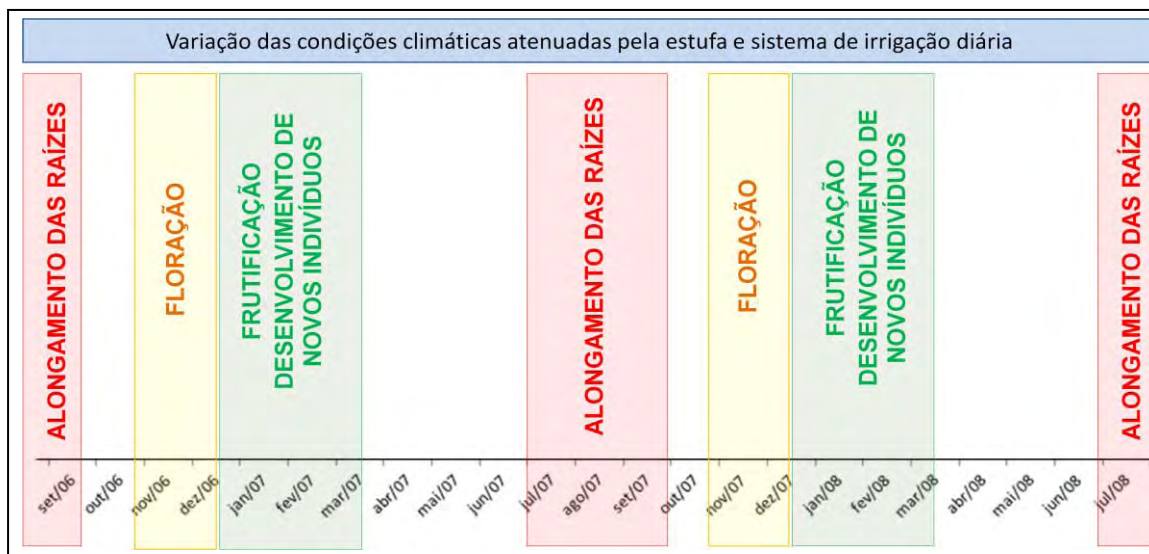
Os valores de pluviosidade e temperatura foram coletados e fornecidos pela empresa Ripasa, responsável pela reserva florestal. Algumas características dos indivíduos analisados, como época de floração, frutificação ou morfologia das espécies também foram observados durante as coletas e estão resumidos na figura 52 (p. 119).

Figura 52: Dados meteorológicos do local de coleta (Ripasa) e fenotípicos das espécies coletadas.



Para comparação com os indivíduos coletados na casa de vegetação, as características fenotípicas também foram coletadas no mesmo período (figura 53, p.121), no entanto os dados climáticos não possuem variações tão grandes em comparação ao ambiente natural. A casa de vegetação possui sistema de estufa, com cobertura e irrigação diária, diminuindo consideravelmente grandes variações, principalmente em relação à disponibilidade de água.

Figura 53: Dados fenotípicos das espécies coletadas na casa de vegetação durante o período de coleta.

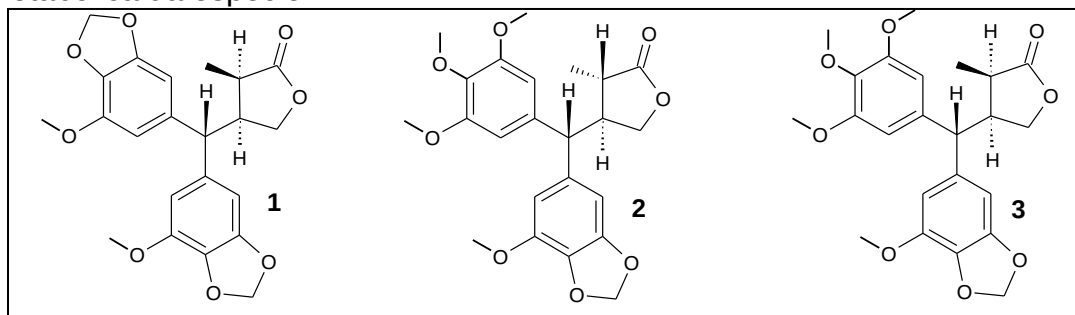


Para os indivíduos da casa de vegetação, o alongamento das raízes observado entre os meses de julho a outubro foi muito menor que o observado para plantas da Ripasa, já que a disponibilidade de água na casa de vegetação é constante durante todo o ano. Os períodos de floração, frutificação e desenvolvimento de novos indivíduos por brotamento a partir das raízes das plantas em ambiente controlado não apresentaram alterações em relação as plantas em ambiente natural.

A. Secolignanas

As estruturas químicas das secolignanas avaliadas quanto ao perfil metabólico sazonal de *Peperomia blanda* estão na figura 54 (p. 122).

Figura 54: Secolignanas de *P. blanda* avaliadas no estudo da variação metabólica da espécie.



Os teores dessas substâncias nas soluções analisadas por CLAE e o teor por grama de material vegetal seco foram calculados a partir da curva analítica (Figura 48, p. 111), e estão nas tabelas 33 à 36 (p. 122, 123 e 124).

Tabela 33: Teores das substâncias **1-3** calculados nas soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas coletadas na Ripasa.

PARTES AÉREAS - RIPASA						
	1		2		3	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	2,295	11,476	0,519	2,596	2,470	12,352
nov/06	2,531	12,654	0,535	2,676	2,327	11,633
jan/07	1,681	8,404	0,273	1,365	2,097	10,484
mar/07	1,636	8,182	0,328	1,640	2,057	10,287
mai/07	1,474	7,372	0,321	1,607	1,826	9,131
jul/07	1,914	9,569	0,644	3,219	2,604	13,022
set/07	2,245	11,224	0,418	2,090	1,995	9,974
nov/07	2,339	11,697	0,688	3,441	2,774	13,872
jan/08	1,431	7,154	0,288	1,440	1,651	8,257
mar/08	0,810	4,052	0,169	0,844	1,016	5,078
mai/08	1,110	5,552	0,436	2,180	1,395	6,975
jul/08	1,242	6,210	0,477	2,386	1,940	9,698

Tabela 34: Teores das substâncias **1-3** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas coletadas na casa de vegetação.

PARTES AÉREAS – CASA DE VEGETAÇÃO						
	1		2		3	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	2,058	10,290	0,615	3,073	1,980	9,901
nov/06	2,441	12,204	0,547	2,733	2,322	11,608
jan/07	1,974	9,872	0,421	2,105	2,043	10,213
mar/07	1,203	6,016	0,333	1,665	1,049	5,244
mai/07	1,654	8,272	0,425	2,126	1,430	7,152
jul/07	1,856	9,281	0,650	3,948	2,081	10,405
set/07	2,320	11,599	0,550	2,749	1,419	7,095
nov/07	2,748	13,741	0,366	1,828	2,199	10,996
jan/08	2,080	10,399	0,378	1,889	2,301	11,507
mar/08	1,494	7,469	0,424	2,119	1,529	7,647
mai/08	1,256	6,281	0,395	1,973	1,516	7,579
jul/08	1,730	8,648	0,572	2,861	1,360	6,799

Tabela 35: Teores das substâncias **1-3** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas coletadas na Ripasa.

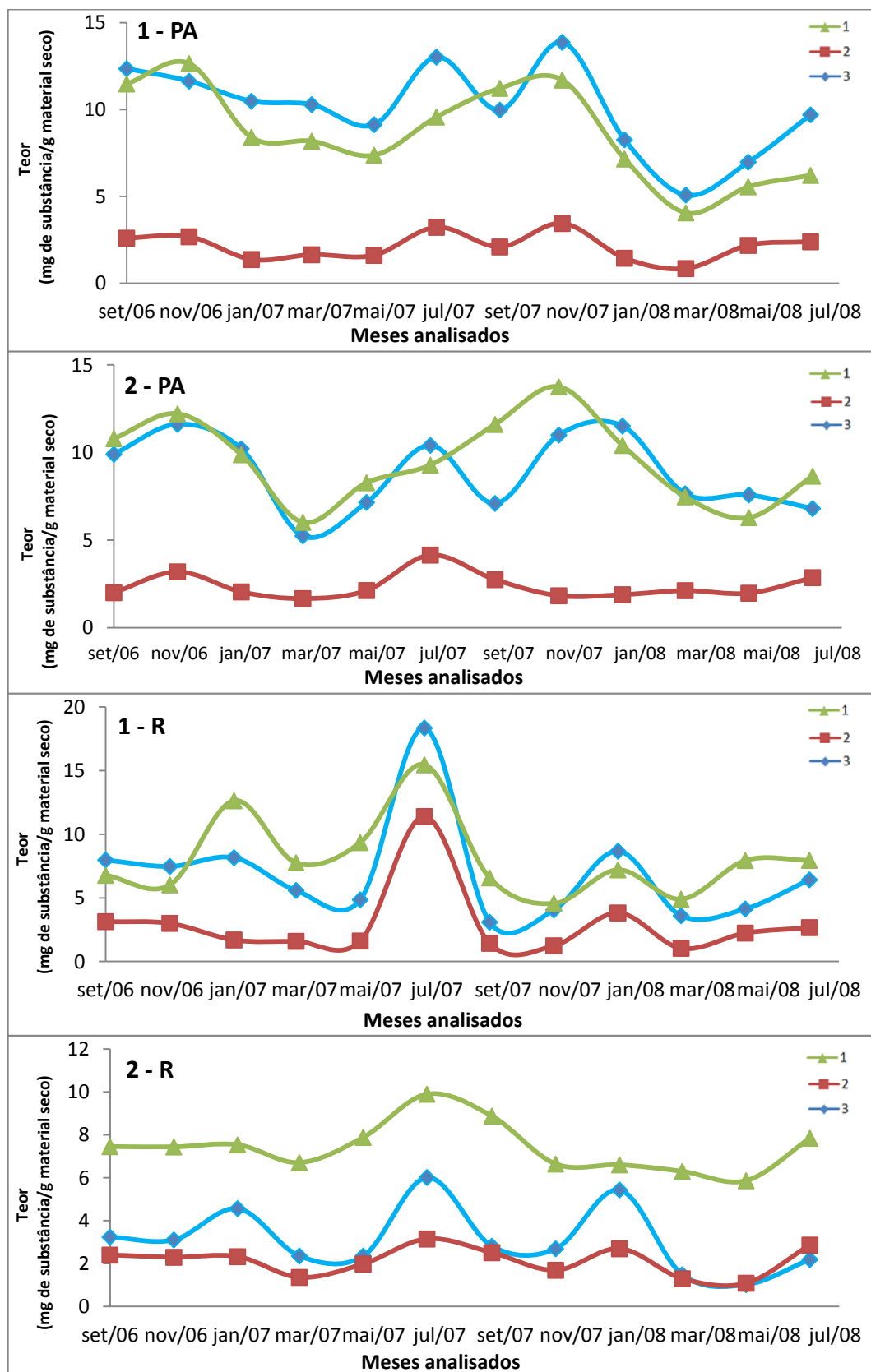
RAÍZES - RIPASA						
	1		2		3	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	1,355	6,776	0,628	3,138	1,596	7,978
nov/06	1,205	6,025	0,600	3,002	1,494	7,471
jan/07	2,527	12,633	0,340	1,699	1,631	8,157
mar/07	1,552	7,759	0,319	1,594	1,117	5,586
mai/07	1,869	9,344	0,323	1,617	0,971	4,853
jul/07	3,091	15,455	2,279	11,394	3,669	18,345
set/07	1,315	6,576	0,287	1,437	0,619	3,096
nov/07	0,913	4,564	0,248	1,242	0,811	4,055
jan/08	1,441	7,204	0,764	3,820	1,735	8,674
mar/08	0,981	4,904	0,209	1,045	0,721	3,605
mai/08	1,588	7,938	0,448	2,240	0,828	4,138
jul/08	1,590	7,950	0,534	2,670	1,285	6,423

Tabela 36: Teores das substâncias **1-3** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas coletadas na casa de vegetação.

RAÍZES – CASA DE VEGETAÇÃO						
	1		2		3	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	1,491	7,453	0,480	2,401	0,648	3,241
nov/06	1,488	7,440	0,460	2,298	0,622	3,108
jan/07	1,507	7,537	0,465	2,327	0,913	4,565
mar/07	1,341	6,707	0,272	1,361	0,472	2,358
mai/07	1,577	7,885	0,397	1,985	0,472	2,358
jul/07	1,979	9,897	0,630	3,150	1,203	6,017
set/07	1,775	8,875	0,502	2,510	0,563	2,815
nov/07	1,328	6,642	0,339	1,694	0,539	2,695
jan/08	1,321	6,605	0,539	2,696	1,087	5,435
mar/08	1,260	6,298	0,260	1,300	0,298	1,488
mai/08	1,173	5,865	0,218	1,089	0,205	1,024
jul/08	1,569	7,843	0,573	2,867	0,439	2,193

Os gráficos a seguir ilustram a dinâmica média encontrada ao longo do período selecionado (Figura 55, p. 125).

Figura 55: Variação metabólica das peperominas **1-3** em partes aéreas (PA) e raízes (R) de *P. blanda* coletadas na Ripasa (1) e casa de vegetação (2).



A análise dos resultados apresentados demonstra que o perfil metabólico durante os ciclos anuais apresentou-se bastante semelhante ao longo do período.

A análise das raízes de *Peperomia blanda* mostra grande acúmulo destas lignanas no mês de julho, que correspondendo ao período de seca e é observado o alongamento das raízes da espécie. O maior acúmulo foi observado nas raízes de espécies coletados na reserva florestal. O mês de julho de 2007 correspondeu à época de maior seca durante o período analisado, com pluviosidade média abaixo de 10 mm, coincidindo com a época de maior alongamento observado para as raízes. O alongamento das raízes parece ocorrer na busca de água pela espécie, além das predisposições genéticas. A relação com a grande produção destas lignanas nesta época sugere que elas estão envolvidas, entre outras funções, na composição estrutural de *P. blanda*, tal como a lignificação. A diminuição brusca consecutiva pode sinalizar o consumo destas substâncias para produção de lignina. Outro pico de acúmulo das lignanas em raízes, porém menos intenso, corre no mês de janeiro, justamente o período que inicia o brotamento de novos indivíduos a partir destes órgãos. Mais uma vez estes resultados sugerem que as peperominas podem estar relacionadas a funções estruturais ou na proteção contra possíveis predadores, parasitas ou doenças que possam prejudicar ou dificultar o desenvolvimento da nova planta.

No mês de julho observou-se também um aumento no acúmulo das substâncias **2** e **3** nas partes aéreas, que pode estar relacionado a outras funções neste órgão como na proteção contra predadores ou doenças. O maior acúmulo das peperominas **1-3** em partes aéreas se dá nos meses próximos de novembro, época de desenvolvimento das flores. As flores nesta espécie ocorrem no ápice da planta podem chegar a 20 % do tamanho da planta. O surgimento do novo órgão pode estar relacionado ao aumento da produção destes metabólitos. Este fato sugere, mais uma vez, a função estrutural destas lignanas, porém sem descartar outras funções biológicas importantes como a proteção da espécie.

Em relação a quantidade total relativa das peperominas, em todas as amostras, a substância **2** ocorre em menor teor, principalmente em partes aéreas. As substâncias **1** e **3** ocorrem sempre em teores similares, exceto em

raízes de plantas coletadas na casa de vegetação, onde o acúmulo da substância **3** é menor.

Em relação a produção dos diastereoisômeros **2** e **3**, as análises mostram que há uma produção preferencial do isômero **3**, com configuração *cis* no anel butirolactônico em todos os meses analisados.

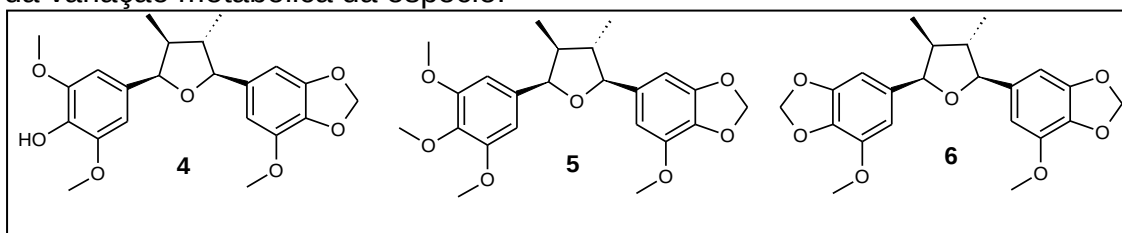
Estes resultados sugerem portanto, que a produção destas lignanas é influenciada pelas características climáticas, principalmente a disponibilidade de água, que refletem na morfologia da espécie e que, entre outras funções biológicas ou ecológicas, a importância na parte estrutural da espécie é bastante pronunciada. De fato, fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, foram previamente relatados, tendo como causa principal o estresse hídrico que, conseqüentemente, levam a alterações no metabolismo secundário (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Em relação às diferenças entre as populações estudadas, apesar da semelhança no ritmo de produção das secolignanas, observa-se um teor muito maior destas lignanas nas raízes de plantas coletadas em ambiente natural. O teor encontrado nestes órgãos chega a ser duas ou três vezes maior em relação às espécies coletadas na casa de vegetação.

B. Lignanas tetraidrofurânicas

As estruturas químicas das três lignanas tetraidrofurânicas avaliadas no perfil metabólico de *Peperomia blanda* estão na figura 56 (p. 127).

Figura 56: Lignanas tetraidrofurânicas de *P. blanda* avaliadas no estudo da variação metabólica da espécie.



Assim como para as secolignanas, os teores das lignanas tetraidrofurânicas foram calculados tanto para as soluções analisadas por CLAE quanto por grama de material vegetal seco, a partir da curva analítica (Figura 49, p. 111), e estão indicados nas tabelas 37-40 (p. 128 e 129).

Tabela 37: Teores das substâncias **4-6** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas de *P. blanda* coletada na Ripasa.

PARTES AÉREAS - RIPASA						
	4		5		6	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	0,136	0,681	0,539	2,696	0,187	0,935
nov/06	0,128	0,638	0,568	2,840	0,179	0,895
jan/07	0,103	0,518	0,499	2,496	0,133	0,668
mar/07	0,083	0,415	0,421	2,107	0,099	0,496
mai/07	0,086	0,432	0,341	1,704	0,073	0,365
jul/07	0,059	0,299	0,402	2,011	0,131	0,653
set/07	0,127	0,637	0,410	2,052	0,145	0,725
nov/07	0,117	0,587	0,516	2,580	0,133	0,664
jan/08	0,077	0,385	0,349	1,746	0,081	0,407
mar/08	0,037	0,184	0,285	1,425	0,050	0,253
mai/08	0,082	0,411	0,318	1,593	0,135	0,674
jul/08	0,051	0,255	0,371	1,857	0,127	0,635

Tabela 38: Teores das substâncias **4-6** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de partes aéreas secas de *P. blanda* coletada na casa de vegetação.

PARTES AÉREAS – CASA DE VEGETAÇÃO						
	4		5		6	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	0,254	1,268	0,628	3,142	0,316	1,579
nov/06	0,155	0,776	0,711	3,555	0,301	1,507
jan/07	0,159	0,797	0,591	2,955	0,188	0,943
mar/07	0,099	0,496	0,298	1,489	0,155	0,777
mai/07	0,092	0,461	0,349	1,747	0,162	0,810
jul/07	0,069	0,347	0,320	1,601	0,119	0,597
set/07	0,093	0,464	0,578	2,890	0,151	0,754
nov/07	0,238	1,192	0,685	3,428	0,236	1,183
jan/08	0,120	0,603	0,619	3,097	0,146	0,732
mar/08	0,107	0,534	0,364	1,820	0,112	0,560
mai/08	0,079	0,399	0,528	2,642	0,146	0,731
jul/08	0,093	0,467	0,535	2,674	0,148	0,740

Tabela 39: Teores das substâncias **4-6** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas de *P. blanda* coletada na Ripasa.

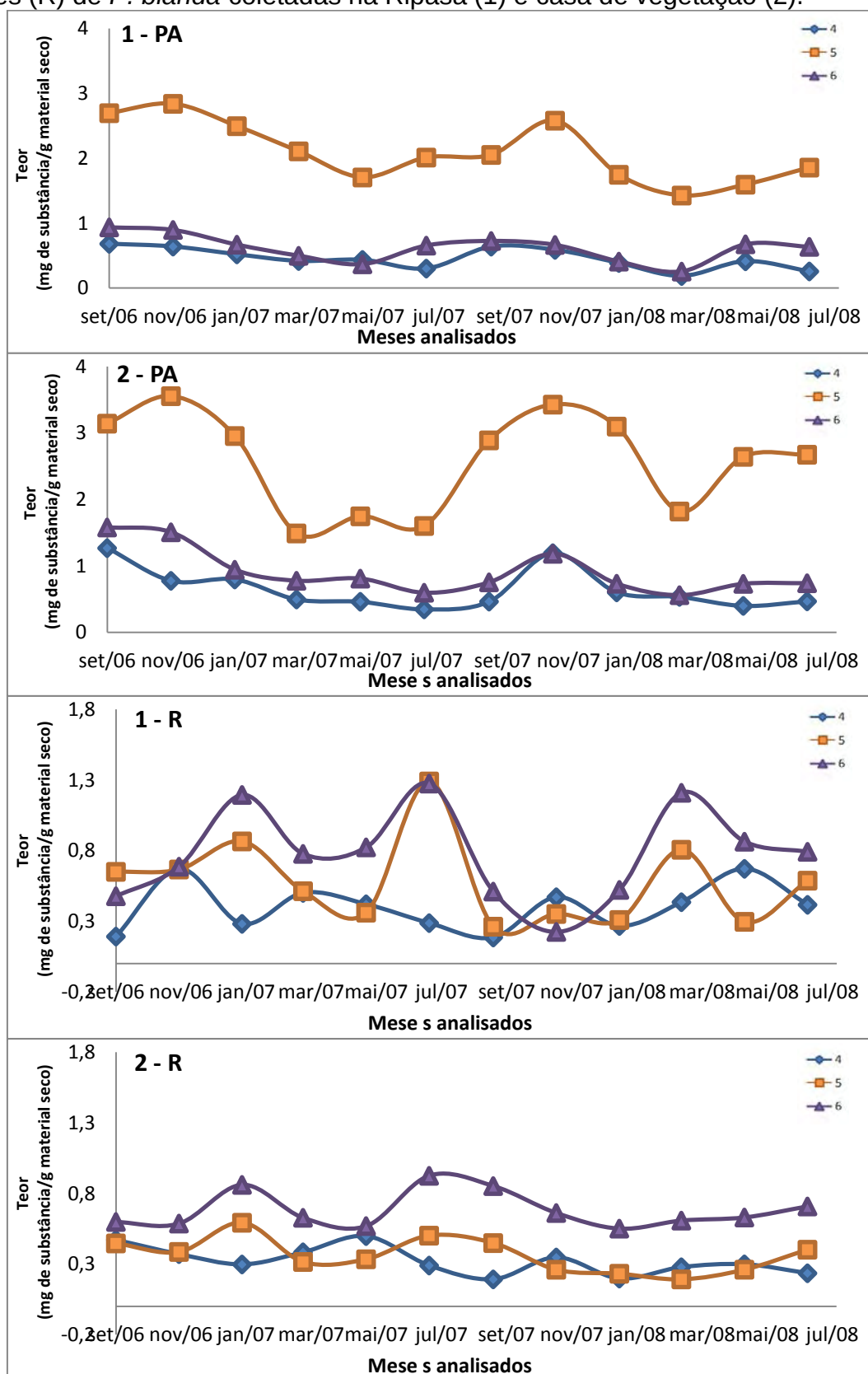
RAÍZES - RIPASA						
	4		5		6	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	0,038	0,192	0,130	0,650	0,095	0,477
nov/06	0,134	0,670	0,133	0,667	0,137	0,687
jan/07	0,056	0,281	0,173	0,865	0,238	1,194
mar/07	0,100	0,501	0,102	0,513	0,155	0,777
mai/07	0,084	0,420	0,072	0,361	0,165	0,823
jul/07	0,057	0,287	0,258	1,290	0,255	1,275
set/07	0,037	0,185	0,052	0,262	0,102	0,510
nov/07	0,094	0,470	0,070	0,352	0,045	0,225
jan/08	0,053	0,267	0,062	0,309	0,104	0,522
mar/08	0,087	0,435	0,161	0,806	0,242	1,210
mai/08	0,134	0,671	0,059	0,296	0,173	0,863
jul/08	0,083	0,416	0,117	0,587	0,158	0,792

Tabela 40: Teores das substâncias **4-6** calculados para as soluções analisadas por CLAE e por grama de raízes secas de *P. blanda* coletada na casa de vegetação.

RAÍZES – CASA DE VEGETAÇÃO						
	4		5		6	
	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta	Solução mg.mL ⁻¹	mg/g de planta
set/06	0,094	0,471	0,089	0,446	0,119	0,598
nov/06	0,074	0,370	0,077	0,386	0,117	0,587
jan/07	0,059	0,297	0,118	0,592	0,172	0,860
mar/07	0,077	0,383	0,063	0,315	0,125	0,627
mai/07	0,099	0,498	0,067	0,334	0,114	0,569
jul/07	0,058	0,289	0,100	0,501	0,185	0,925
set/07	0,038	0,191	0,089	0,448	0,170	0,852
nov/07	0,069	0,346	0,052	0,260	0,132	0,661
jan/08	0,039	0,197	0,046	0,231	0,110	0,551
mar/08	0,055	0,277	0,038	0,191	0,121	0,608
mai/08	0,059	0,298	0,052	0,260	0,125	0,630
jul/08	0,047	0,234	0,080	0,401	0,141	0,708

Os gráficos a seguir ilustram a dinâmica média encontrada ao longo do período selecionado (Figura 57, p. 130).

Figura 57: Variação metabólica das lignanas **4-6** em partes aéreas (PA) e raízes (R) de *P. blanda* coletadas na Ripasa (1) e casa de vegetação (2).



A análise das lignanas tetraidrofurânicas mostrou que o acúmulo das mesmas apresentam similaridade à dinâmica de produção da secolignanas. O acúmulo das substâncias **5** e **6** foi bastante expressivo nos meses de julho em raízes das duas populações de *P. blanda*. Um aumento nos teores de todas as substâncias também foi notado nos meses de novembro nas partes aéreas da espécie. Uma das diferenças existentes no metabolismo desta classe em comparação às peperominas está relacionada, principalmente, com as quantidades encontradas de cada classe. O acúmulo de lignanas tetraidrofurânicas apresenta-se menor em todas as amostras analisadas.

O perfil de produção das lignanas tetraidrofurânicas em raízes de *P. blanda* mostrou-se diferenciado entre as substâncias avaliadas desta classe, tanto em indivíduos coletados na Ripasa quanto nos coletados na casa de vegetação. Neste órgão, as substâncias **2** e **3** apresentam aumento de acúmulo nos meses de janeiro e julho, que coincide com o período de baixos teores da substância **1**. Observando as estruturas destas lignanas (Figura 56, p. 127), este acúmulo diferenciado possui um embasamento biossintético no qual a substâncias **1** seria a precursora para a produção da substância **2** e **3**. A hidroxila do anel aromático (posição C-4'/C-4'') pode sofrer oxidação e originar o grupo metoxila ou ainda, o grupo *orto*-hidroximetoxi do sistema aromático pode sofrer ciclização oxidativa e gerar o grupo metilenodioxílico (DEWICK, 2002). Os resultados observados sugerem que a substância **1** é aparentemente consumida para aumento da produção de **2** e **3** em raízes de *P. blanda*. No entanto, para confirmação das suposições biossintéticas discutidas quanto às etapas de oxidação dos substituintes aromáticos, é necessário um estudo enzimático direcionado às substâncias analisadas nos diferentes órgãos da planta.

De forma geral, assim como para as peperominas, a produção das lignanas tetraidrofurânicas pode ser uma resposta quanto à disponibilidade hídrica, e à formação de novos órgãos como flores e brotos.

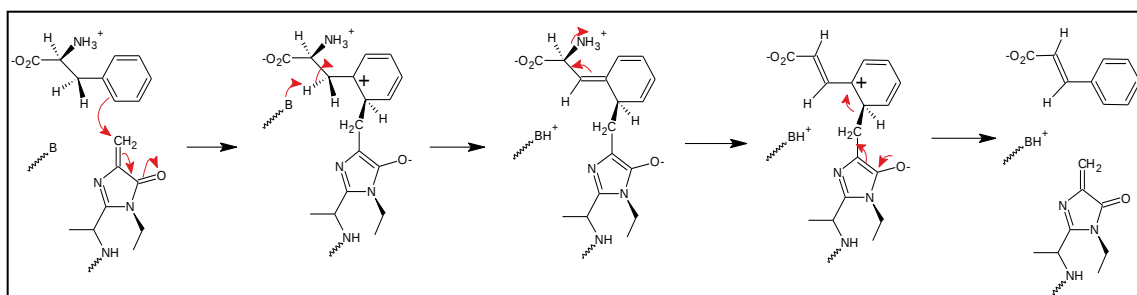
Em relação a diferentes populações coletadas em ambiente natural na reserva da Ripasa e em ambiente com condições controladas, observou-se diferenças quanto aos teores das lignanas nas raízes, que apresentou maior acúmulo em plantas coletadas em ambientes naturais, e nas partes aéreas mostrou maior acúmulo em plantas coletadas na casa de vegetação.

5.4. Estudo biossintético das lignanas de *Peperomia blanda*.

5.4.1. Estudo comparativo da enzima PAL em espécies de Piperaceae

A fenilalanina amônia liase (PAL) é a enzima que inicia a sequência de reações na biossíntese das lignanas, assim como dos demais produtos naturais formados pela via fenilpropanoídica. Esta enzima é responsável pela etapa de *trans*-desaminação da *L*-fenilalanina e formação do ácido *trans*-cinâmico (Figura 58, p. 132).

Figura 58: Mecanismo de reação da *trans*-desaminação da *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (Rettig et al., 2000).



A otimização das condições catalíticas desta enzima é de extrema importância e pode sugerir as melhores condições para as demais enzimas envolvidas na rota. Isto se torna mais interessante levando-se em consideração que a enzima PAL ocorre em maior abundância por estar vinculada a produção dos precursores de todas as substâncias derivadas da via fenilpropanoídica. Além disso, o substrato utilizado nesta etapa é *L*-fenilalanina, um reagente relativamente mais acessível e estável. O estudo das condições ótimas reacionais e das etapas de purificação e análise dos produtos formados *in vitro* foi então iniciado com esta enzima. Uma vez que espécies de Piperaceae são tradicionalmente estudadas pelo grupo de pesquisa e que estas espécies acumulam metabólitos da via fenilpropanoídica, optou-se por realizar estes experimentos não somente com a espécie *Peperomia blanda*, mas também outras espécies de Piperaceae com o objetivo de comparar a atividade

enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL) em espécies dos gêneros mais importantes desta família.

Para isso, foi realizado um planejamento experimental com o objetivo de determinar o melhor pH e temperatura para as reações catalíticas da PAL em três espécies de Piperaceae. Os resultados foram analisados no programa Statística 8,0, utilizando como resposta as áreas dos picos cromatográficos referentes ao ácido *trans*-cinâmico formado nas conversões da *L*-fenilalanina para cada condição experimental.

A escolha do tampão extrator foi feita baseando-se em dados da literatura. Esses dados mostram que geralmente a PAL é extraída de espécies vegetais e de microrganismos utilizando tampão borato (CUNHA *et al.*, 1996; GEETHA *et al.*, 2005). Com isso, esse tampão foi selecionado como extrator da PAL das folhas das espécies selecionadas. Foram adicionados ao tampão extrator, substâncias para garantir a estabilidade da proteína, tais como, agentes quelantes, antioxidantes e para a complexação de substâncias fenólicas. Para inibir a atividade das proteases, os experimentos foram realizados a baixa temperatura, e nenhum outro agente inibidor de proteases foi utilizado.

Após a extração e clarificação do extrato bruto de *Piper tuberculatum*, *Peperomia obtusifolia* e *Peperomia blanda*, foram determinadas as concentrações protéicas dos mesmos, pelo método de Bradford modificado. A curva padrão foi obtida utilizando uma solução de albumina bovina (fração V), obtendo-se assim as equações necessárias para quantificação das proteínas nas frações em análise. As concentrações protéicas totais dos extratos brutos das espécies estão indicadas na tabela 41.

Tabela 41: Concentração protéica total dos extratos brutos no estudo comparativo da PAL de diferentes espécies de Piperaceae.

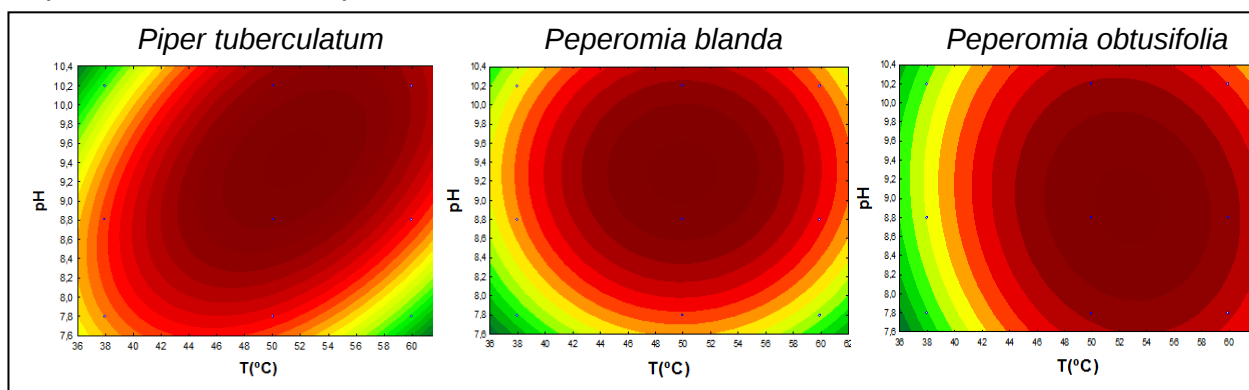
Espécie	[proteína] mg/mL
<i>Piper tuberculatum</i>	0,25
<i>Peperomia blanda</i>	0,23
<i>Peperomia obtusifolia</i>	0,51

Como pode ser observado, a maior concentração de proteínas totais à partir da mesma massa inicial de material vegetal é encontrada na espécie *Peperomia obtusifolia*. Para dar continuidade as reações enzimáticas, as concentrações de proteínas foram ajustadas para 0,2 mg/mL.

Após a incubação do substrato *L*-fenilalanina em todas as condições pré-estabelecidas no planejamento experimental, foram adicionados 25 μ L de HCl (6M) para inativar a enzima. A solução final foi centrifugada e analisada por CLAE. A reação foi acompanhada pela observação do aparecimento da banda do ácido *trans*-cinâmico em 8,5 minutos e o tempo de incubação com melhor conversão do substrato foi de 24 horas. A identificação das bandas foi realizada por comparação do tempo de retenção destas com o tempo de retenção dos respectivos padrões comerciais injetados nas mesmas condições cromatográficas.

Todas as conversões das reações enzimáticas foram verificadas utilizando curva de calibração para o produto da reação. Como resultado, foram calculados os valores ótimos de atividade enzimática relativa à temperatura e pH para cada espécie separadamente, sendo que todas apresentaram valores semelhantes (Figura 59, p. 134).

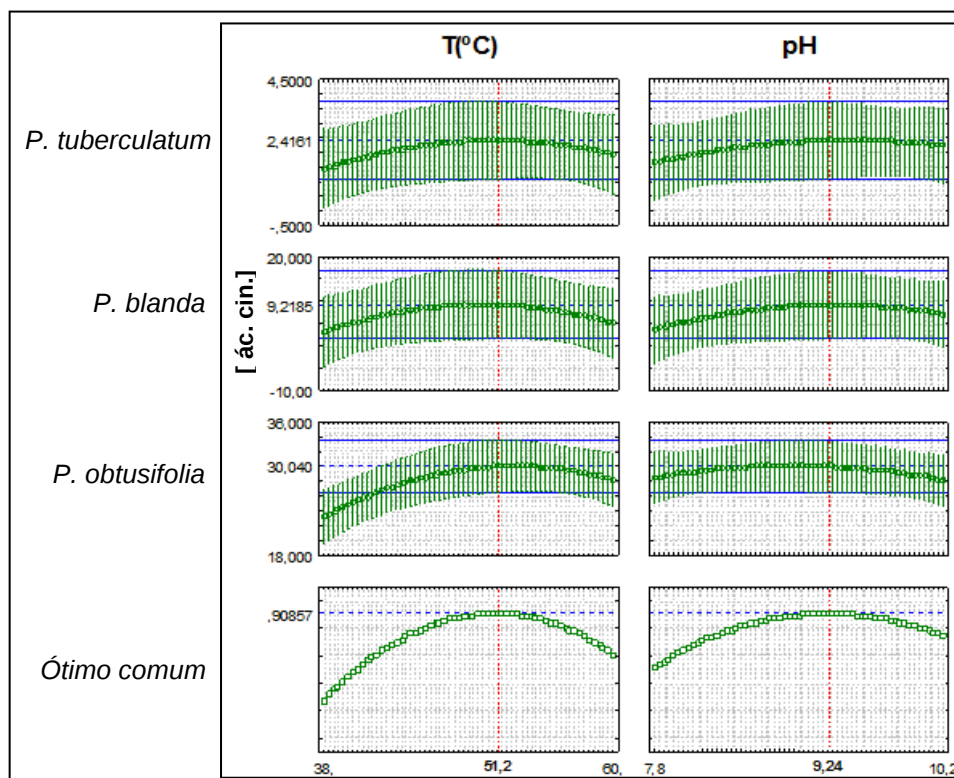
Figura 59: Superfície de resposta do experimento de otimização das condições reacionais da enzima PAL para as espécies *Piper tuberculatum*, *Peperomia blanda* e *Peperomia obtusifolia*.



O programa estatístico também permite encontrar um valor ótimo comum a todas as espécies, considerando todas as variáveis. Esse valor foi de temperatura igual à 51°C e pH 9,2 do tampão borato (Figura 60, p. 135). Estes

dados são bastante interessantes pois não há relatos na literatura de atividade da enzima PAL em temperatura e pH tão elevados como os apresentados por este estudo. Geralmente observa-se para esta enzima protocolos que utilizam pH próximo de 8,8 e temperaturas não superiores à 30°C (CHENG E BREEN, 1991; KOVÁČIK et al., 2007).

Figura 60: Condições ótimas para atividade enzimática da PAL das três espécies de Piperaceae e o valor ótimo comum calculado estatisticamente.



As reações enzimáticas utilizando os extratos brutos das espécies selecionadas foram novamente realizadas nas condições otimizadas. Os resultados confirmaram serem estas as condições para as melhores conversões da *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. Na tabela 42 (p. 136) encontra-se a porcentagem de conversão para cada espécie nas condições otimizadas que foram calculadas com base na estequiometria da reação e quantificação do ácido *trans*-cinâmico formado em relação à concentração inicial de *L*-fenilalanina adicionada (150µL de uma solução 10 mM, ou seja, 247,5 µg) .

Tabela 42: Porcentagem de conversão da *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico em cada espécie analisada nas condições reacionais otimizadas.

Espécie	Conversão (%)
<i>Peperomia blanda</i>	69
<i>Peperomia obtusifolia</i>	51
<i>Piper tuberculatum</i>	58

A análise dos resultados mostra que a maior taxa de conversão ocorreu na espécie *Peperomia blanda*, partindo da mesma massa de material vegetal. Considerando o metabolismo secundário das espécies selecionadas, a atividade observada para a PAL é justificável. A espécie *P. blanda* possui como constituintes principais do seu metabolismo secundário as lignanas e flavonóides (FELIPPE, 2008; FELIPPE et al., 2008, 2011 e 2012; VELOZO et al., 2009), que são derivados da via fenilpropanídica, sendo esperada que a atividade catalítica da PAL seja pronunciada nesta. Os principais componentes do metabolismo secundário de *P. tuberculatum* pertencem à classe das amidas, cujas rotas biossintéticas utilizam a via dos fenilpropanóides (MOTA et al., 2009; COTINGUIBA et al. 2009). Dentre os metabólitos presentes na espécie *P. obtusifolia*, que são derivados da via fenilpropanoídica, estão alguns flavonóides, porém não são os constituintes majoritários da espécie, justificando a menor atividade da PAL (MOTA et al., 2011).

Com o objetivo de concentrar a enzima PAL e aumentar a atividade observada, novos extratos enzimáticos das três espécies estudadas foram obtidos e fracionados com sal de amônio. Estas frações foram submetidas à dosagem protéica, utilizando o método de Bradford (Tabela 43, p.137).

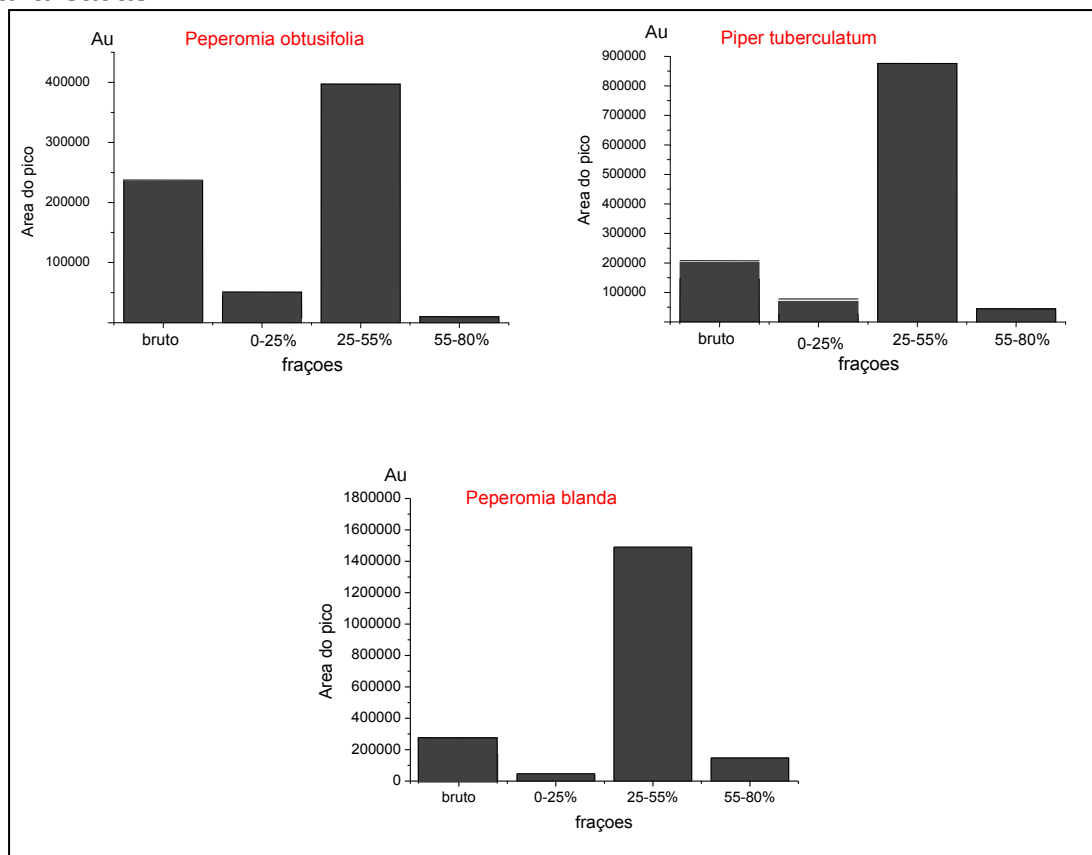
Tabela 43: Concentração protéica total das frações resultantes da precipitação salina dos extratos brutos das espécies de Piperaceae.

Espécie	Fração	[proteína] mg/mL
<i>P. tuberculatum</i>	0-25 %	1,31
<i>P. tuberculatum</i>	25-55%	2,43
<i>P. tuberculatum</i>	55-80%	3,57
<i>P. blanda</i>	0-25 %	0,44
<i>P. blanda</i>	25-55%	1,47
<i>P. blanda</i>	55-80%	1,58
<i>P. obtusifolia</i>	0-25 %	0,36
<i>P. obtusifolia</i>	25-55%	0,73
<i>P. obtusifolia</i>	55-80%	0,97

Após determinação da concentração de proteínas nas frações, estas foram diluídas para 0,2 mg/mL e dessalinização em coluna de Sephadex G-100. As frações foram submetidas aos ensaios enzimáticos utilizando os valores ótimos reacionais encontrados para os extratos brutos. Os produtos das reações foram analisados por CLAE e o ácido *trans*-cinâmico foi quantificado.

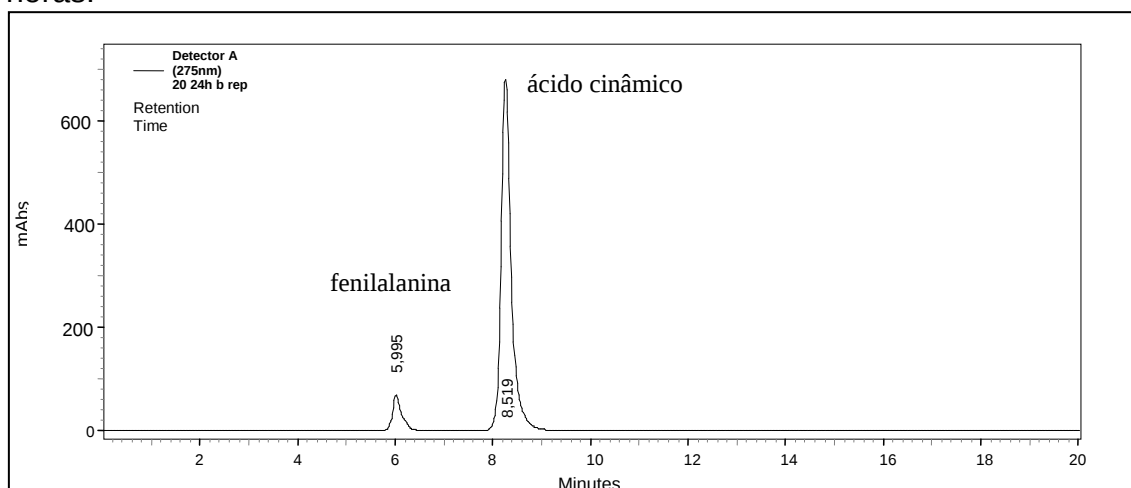
A figura 61 (p. 138) compara a conversão do precursor *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico nos extratos brutos e nas frações obtidas após etapas de precipitação fracionada para cada espécie. A precipitação fracionada mostrou-se uma técnica bastante eficiente na concentração da PAL, uma vez que a atividade se concentrou predominantemente em apenas uma fração, correspondente a saturação com sal de amônio na faixa de 25% a 55%. Além disso, foi possível observar que a espécie *P. blanda* apresenta a melhor conversão da *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico após fracionamento por precipitação salina do extrato enzimático (89%). Para *P. tuberculatum*, a conversão apresentada foi de aproximadamente 75% e para *P. obtusifolia* apresentada foi de aproximadamente 67%.

Figura 61: Conversão da *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico após fracionamento por precipitação salina nas três espécies de Piperaceae analisadas.



O cromatograma referente à melhor conversão encontrada para *P. blanda* está demonstrado na figura 62.

Figura 62: Cromatograma obtido após a incubação de *L*-fenilalanina com a fração enzimática com 25-55% de saturação (amostra dessalinizada) de *P. blanda*. Condições reacionais: T = 51°C, pH = 9,2 e tempo de incubação de 24 horas.



A enzima PAL representa uma das poucas enzimas não-hidrolíticas que possuem muitas aplicações comerciais, como no tratamento de alguns tipos de neoplasmas, e na conversão de excessos de *L*-fenilalanina no sangue de fenilcetonúricos.

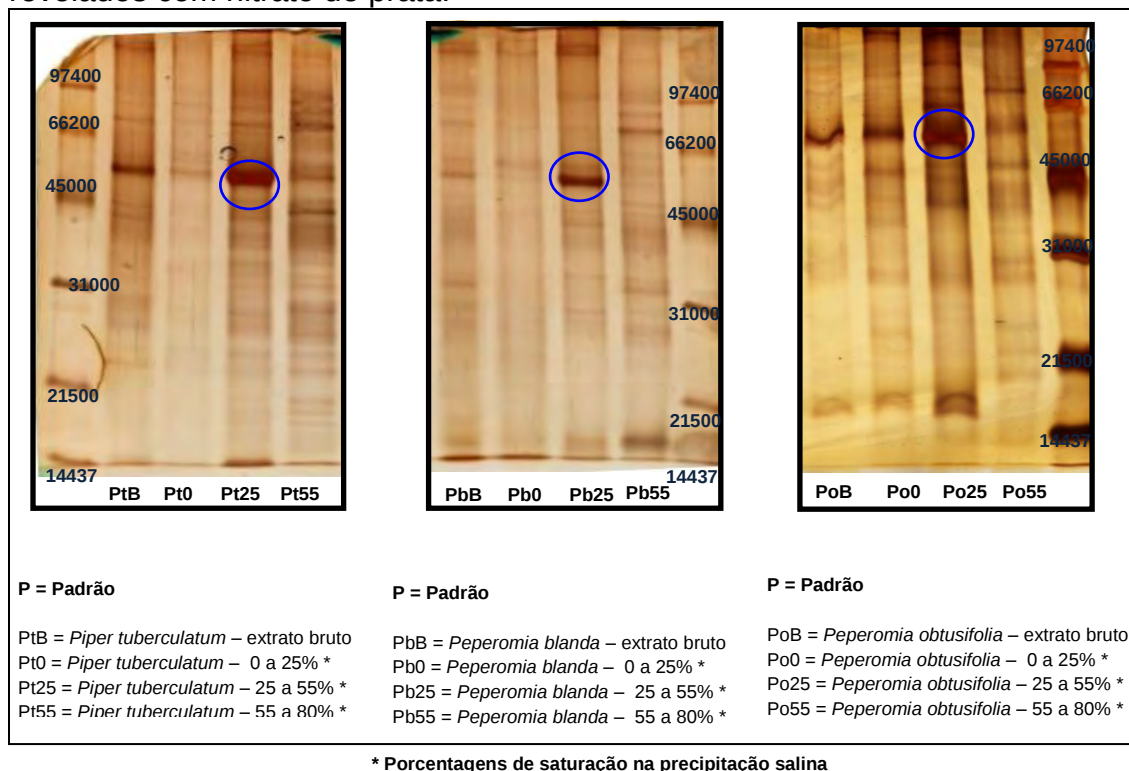
Os resultados apresentados contribuem sobremaneira com informações sobre a termoestabilidade da enzima PAL de espécies de Piperaceae, trazendo novas alternativas para a indústria, principalmente no ramo alimentício, bem na síntese de derivados de C_6C_3 via Química Verde.

5.4.2. Eletroforese monodimensional dos extratos e frações enzimáticas das espécies estudadas.

A análise do perfil proteico dos extratos brutos e frações enzimáticas das espécies avaliadas foram realizadas por eletroforese monodimensional. As amostras foram tratadas, como descrito no item 4.3.3.2 (p. 52), para retirada de interferente, e aplicadas ao gel de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

A comparação dos géis revelados com prata mostrou que as frações identificadas como mais ativas de todas as espécies (25-55% de saturação), apresentam uma banda proeminente entre 45.000 e 66.200 daltons (Figura 63, p. 140). A PAL é descrita na literatura como uma enzima tetramérica, com intervalo de pesos molecular entre 150000 Da a 330000 Da (HAO et al., 1996). No entanto, o gel apresentado foi realizado com a enzima desnaturada, e a banda visualizada em aproximadamente 52000 Da é referente a um monômero da enzima. Seu tetrâmero mostraria, portanto, um peso molecular de aproximadamente 208000 Da, compatível com o peso molecular geralmente atribuído à essa enzima.

Figura 63: Géis de poliacrilamida em uma dimensão obtidos dos extratos e das frações preparadas por precipitação fracionada de espécies de Piperaceae, revelados com nitrato de prata.

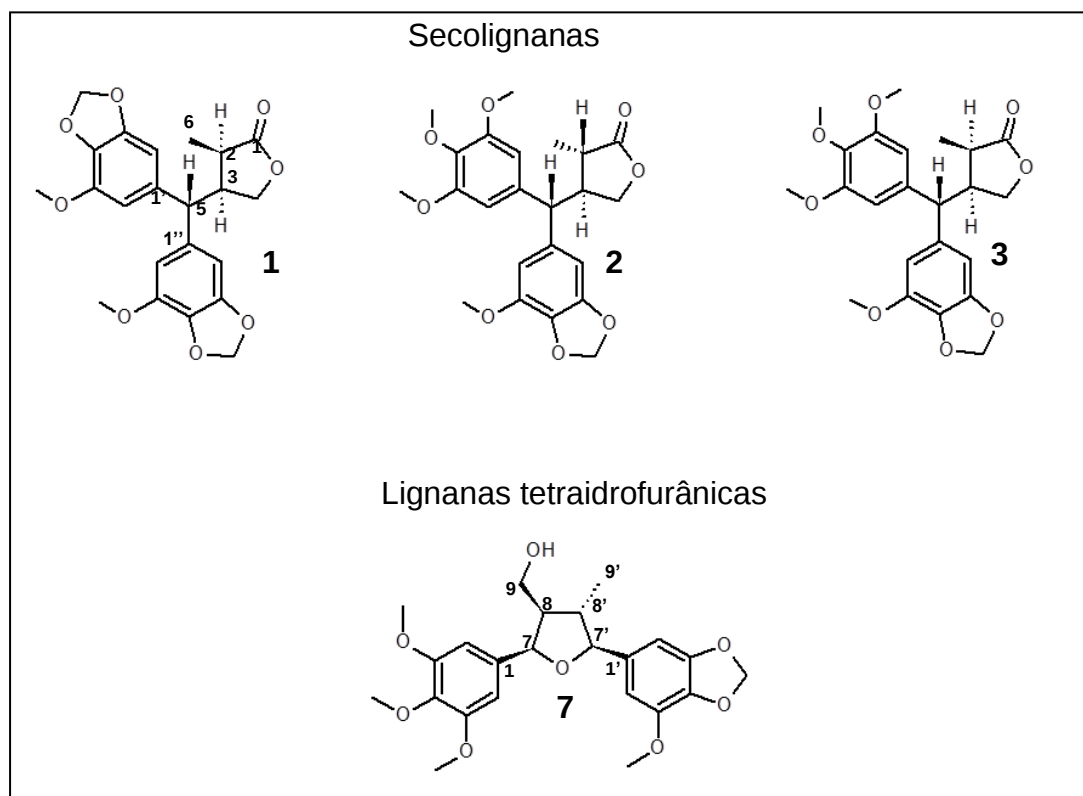


5.4.3. Estudo da dimerização de fenilpropanóides para formação das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas de *Peperomia blanda*.

O estudo fitoquímico previamente realizado de *P. blanda* revelou como constituintes principais de seus extratos de média polaridade, as secolignanas e as lignanas tetraidrofurânicas (FELIPPE, 2008).

Do ponto de vista biossintético, as secolignanas não apresentam relatos de estudo das suas vias de formação, despertando o interesse da avaliação de seus precursores diretos. Quanto à lignanas tetraidrofurânicas, o interesse biossintético foi direcionado a uma substância com aparente formação a partir de acoplamento cruzado entre álcool sinapílico e o *E*-5-metoxisoeugenol (Figura 64, p. 141) (FELIPPE et al., 2008).

Figura 64: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Peperomia blanda* alvos dos estudos biossintético.



O estudo da dimerização de monômeros C₆-C₃ em extratos enzimáticos de *Peperomia blanda* tem como principal objetivo a confirmação das rotas biossintéticas propostas para formação das lignanas tetraidrofurânicas com oxidação em C-9 (**7**) e das peperominas **1-3** encontradas na espécie.

Até final da década de 1990, acreditava-se que as lignanas, de um modo geral, eram derivadas unicamente do acoplamento oxidativo do álcool coniferílico, formando o pinoresinol de diversas formas enantioméricas. Estudos biossintéticos demonstraram que o pinoresinol poderia sofrer etapas de oxidação, metilação, e redução para produzir lignanas como a (+)-eudesmina, extraída de *Magnolia kobus* (MIYAUCHI; OZAWA, 1998). Outros trabalhos desenvolveram o estudo da biossíntese de lignanas do gergelim (*Sesamum indicum*), onde foi estabelecido que lignanas contendo o grupo metilenodioxifenílico como o (+)-piperitol, a (+)-sesamina e a (+)-sesamolina são biossintetizadas a partir do (+)-pinoresinol (KATO et al., 1997). No entanto, outros estudos ocorreram ao longo da última década mostrando que não apenas o álcool coniferílico seria o precursor direto das lignanas do tipo 8-8'. A primeira comprovação de que um outro propenilfenol poderia estar

diretamente envolvido na biossíntese de lignanas foi demonstrada na biossíntese do (+)-conocarpano em *Piper regnellii* a partir do *p*-hidroxipropenilbenzeno (SARTORELLI et al., 2001).

Com base nesses conhecimentos e nas classes de substâncias isoladas de *P. blanda*, a biogênese para a formação da lignana tetraidrofurânica com rara etapa de oxidação na posição 9 indica que os precursores envolvidos podem ser o álcool sinápico e o *E*-5-metoxisoeugenol (Figura 65, p. 142). Etapas de oxidação na posição 7, e reações posteriores de redução seriam responsáveis pelo fechamento do anel furânico, que levariam à lignana oxidada (Figura 66, p. 142).

Figura 65: Precursores das reações enzimáticas para a biossíntese da lignana tetraidrofurânica com oxidação em C-9 e secolignanas.

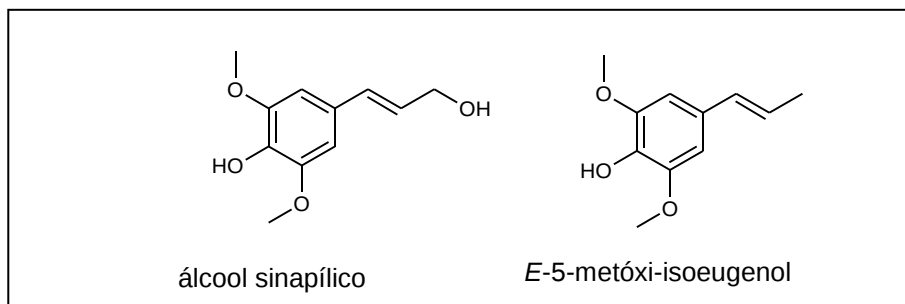
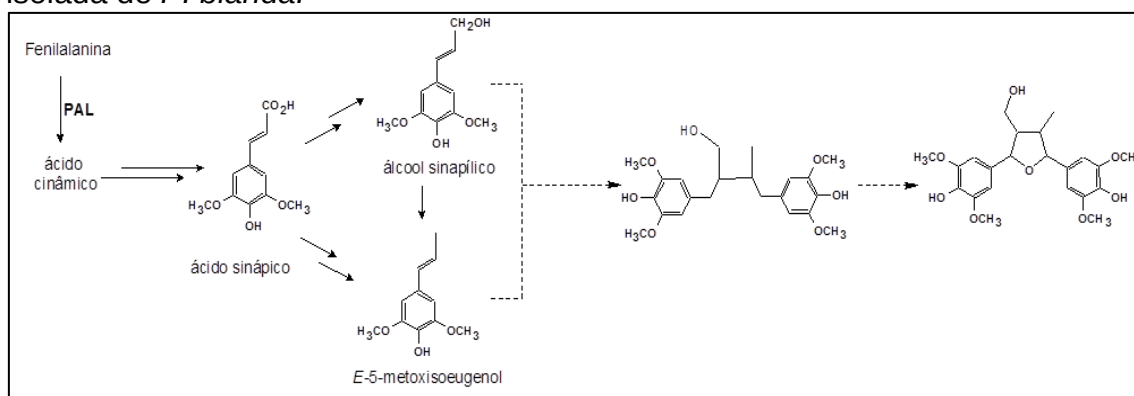


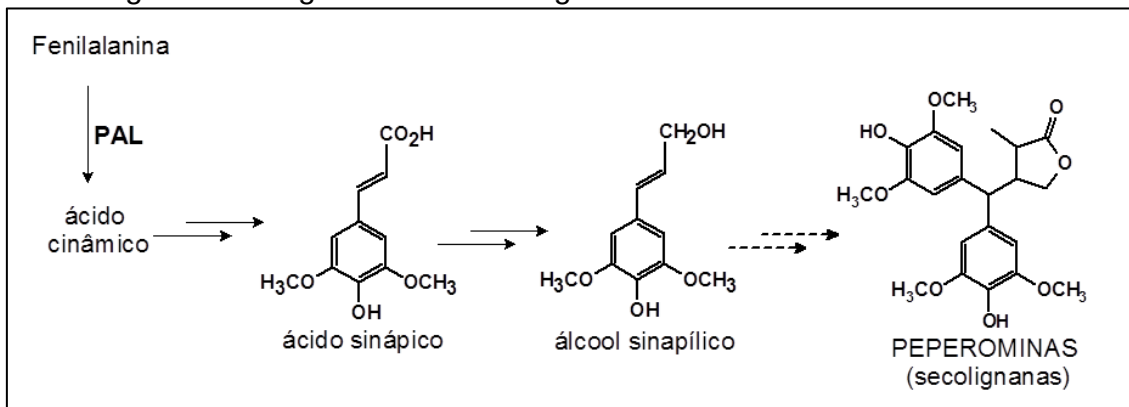
Figura 66: Biogênese da lignana tetraidrofurânica com oxidação em C-9 isolada de *P. blanda*.



A biogênese sugerida para as peperominas propõe primeiramente a formação do siringaresinol pelo acoplamento de duas unidades de álcool

sinapílico, (RAHMAN et al., 2007) com posterior formação das secolignanas. (Figura 67, p. 143)

Figura 67: Biogênese das secolignanas de *P. blanda*.



5.4.4. Síntese dos precursores.

A. Álcool sinápico

A síntese do álcool sinápico foi realizada seguindo o protocolo descrito por Ludley e Ralph (1996), uma reação rápida e de alto rendimento. Esta reação envolve a redução do sinapaldeído no álcool correspondente pelo uso do reagente redutor NaBH_4 em atmosfera inerte (N_2). O produto foi imediatamente analisado por CCDC e RMN de ^1H (Figura 68-70, p. 144 e 145), obtendo-se um espectro com sinais em δ 6,49 (d, $J = 16,0$ Hz) e δ 6,19 (dt, $J = 6,0$ e $16,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios da dupla ligação em *trans*, H-7 e H-8, respectivamente, e um sinal em δ 4,18 (dd, $J = 1,5$ e $6,0$) correspondente aos hidrogênios carbinólicos. A diminuição do sinal do aldeído em δ 9,6 (reagente inicial) mostra que a reação de redução ocorre com alto rendimento. No entanto, a análise por CCDC no dia posterior, mostrou que o composto é bastante instável, tendo uma parte degradada após este período.

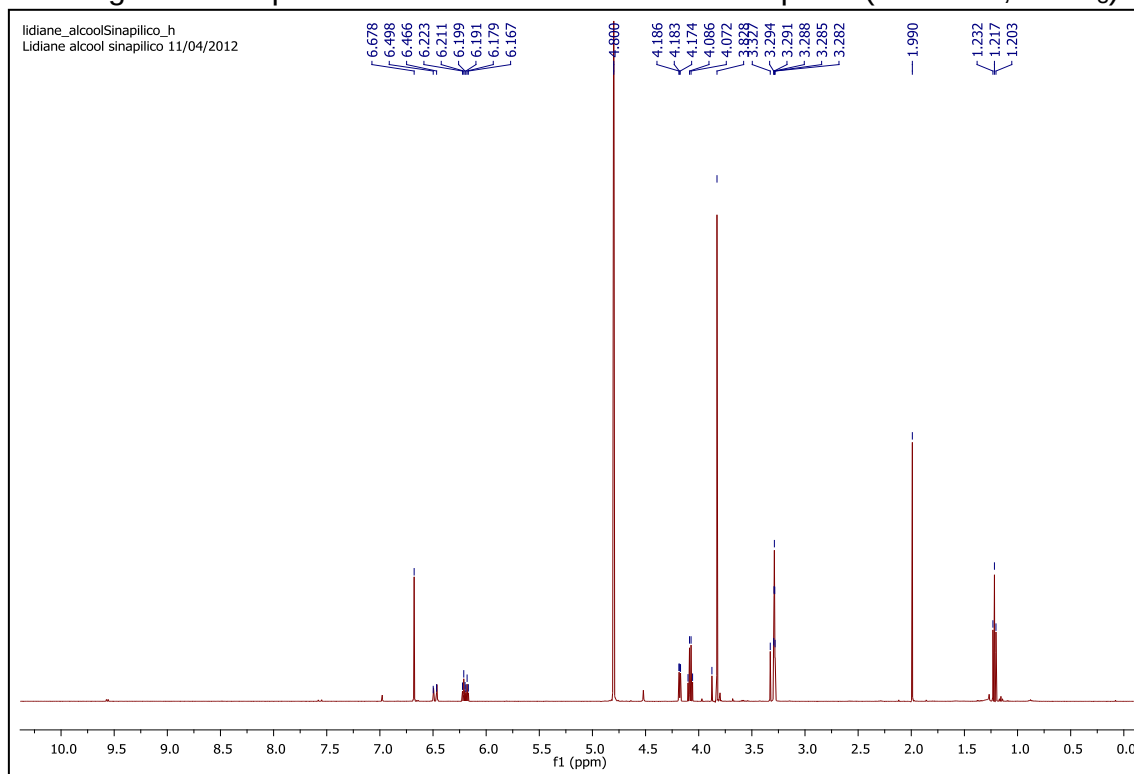
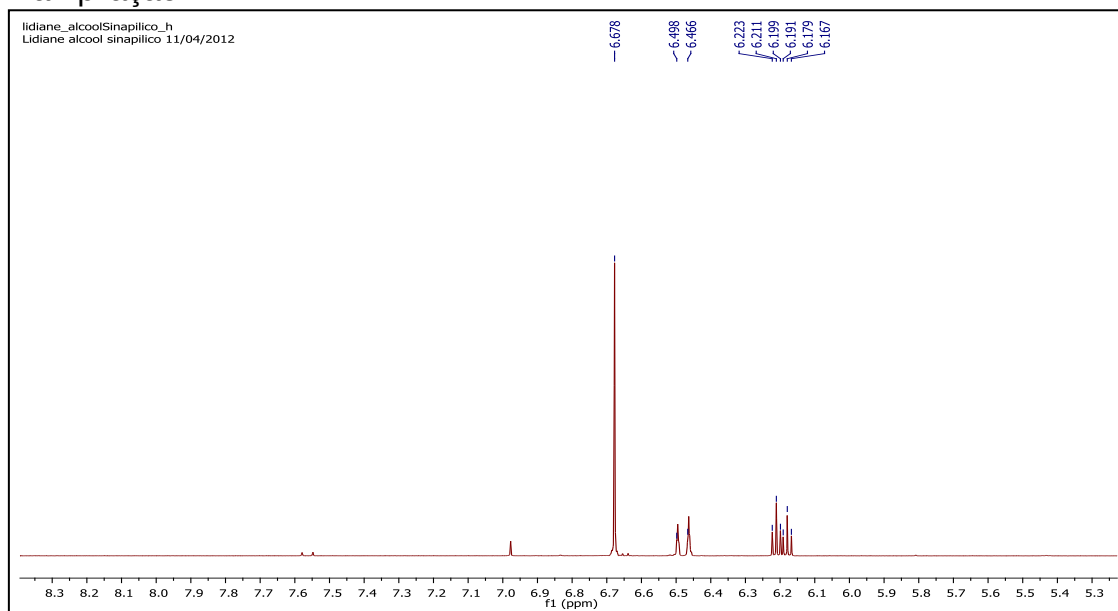
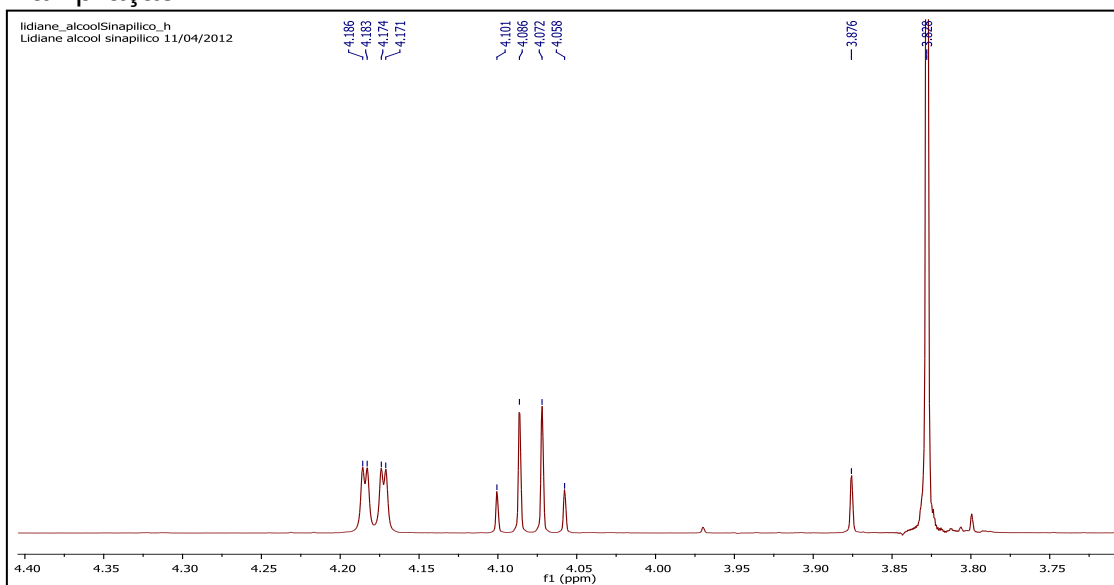
Figura 68: Espectro de RMN de ^1H do álcool sinapílico (500 MHz, CDCl_3)Figura 69: Espectro de RMN de ^1H do álcool sinapílico (500 MHz, CDCl_3) – ampliação.

Figura 70: Espectro de RMN de ^1H do álcool sinapílico (500 MHz, CDCl_3) – ampliação.



B. *E*-5-metóxi-isoeugenol

Como o *E*-5-metóxi-isoeugenol não é disponível comercialmente, foram pesquisadas metodologias para sua síntese. A metodologia escolhida para preparação deste composto utilizou o cloreto de paládio II como catalizador da reação de isomerização da ligação dupla do reagente alílico, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, como descrito por Curti e colaboradores (2006), com algumas modificações quanto ao tempo de reação.

O espectro de RMN de ^1H do produto formado mostra sinais em δ 6,29 (dd, $J = 1,5$ e $15,5$ Hz) e em δ 6,10 (dq, $J = 6,5$ e $15,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios vinílicos conjugados com o anel aromático. Os valores das constantes de acoplamento corroboram a presença da ligação dupla na configuração *E*. O sinal em δ 1,83 (dd, $J = 1,5$ e $6,5$ Hz) foi atribuído aos hidrogênio do grupo metílico da posição 9. Os sinais de hidrogênio alílicos em δ 5,00 do reagente (Figura 71 - 73, p. 146 e 147) não foram observados, sugerindo que o reagente foi consumido. No entanto, foram observados outros sinais de menor intensidade sugerindo a presença de subprodutos de redução com o paládio. Com isso. O produto foi purificado por CC de sílica

(Hex:AcOET, 8:2), antes de seu uso nas reações enzimáticas. A pureza e estabilidade do produto desejado foram acompanhada por placas CCDC.

Figura 71: Espectro de RMN de ^1H do *E*-5-metóxi-isoeugenol (500 MHz, metanol- d_4)

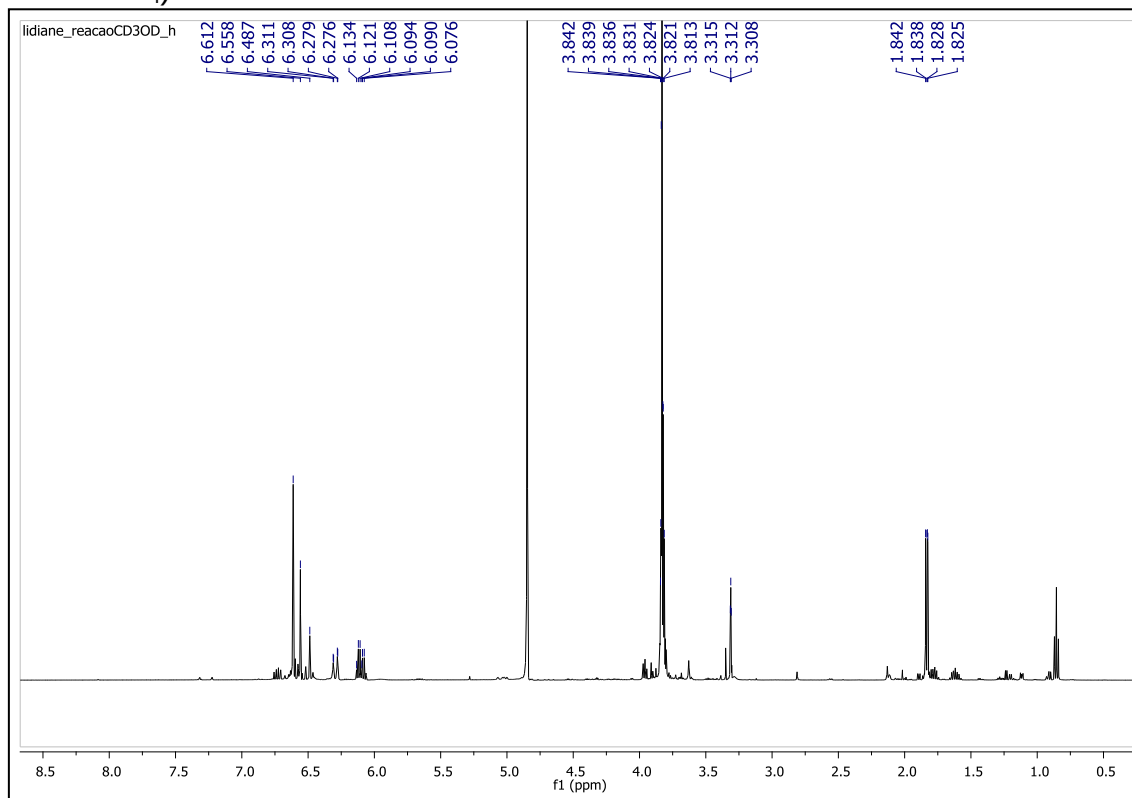


Figura 72: Espectro de RMN de ^1H do *E*-5-metóxi-isoeugenol – ampliação.

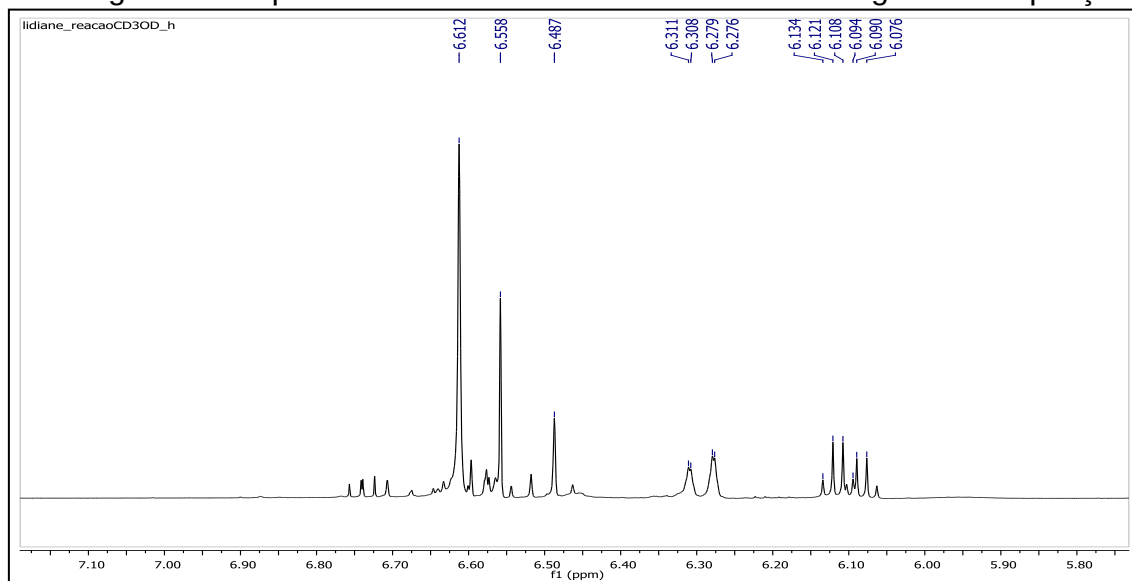
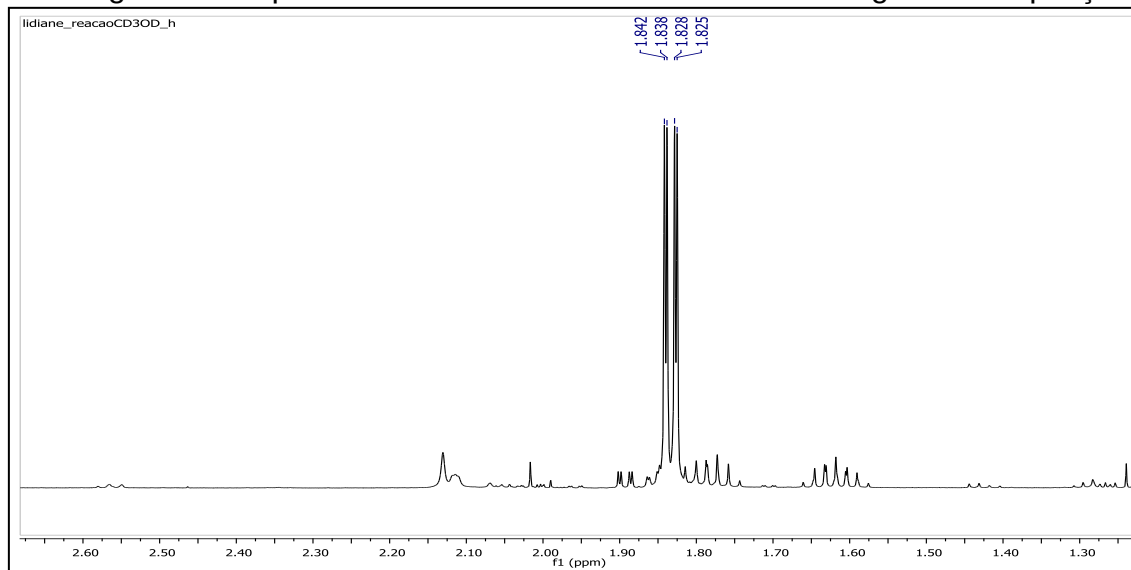


Figura 73: Espectro de RMN de ^1H do *E*-5-metóxi-isoeugenol – ampliação.

5.4.5. Ensaio enzimático *in vitro*

O trabalho de Sartorelli e colaboradores (2001) que descreveu a biossíntese do (+)-conocarpano em *Piper regnellii* mostrou que a enzima envolvida nesta rota foi encontrada na fração protéica extraída das membranas celulares das folhas de *P. regnellii* (fração microssomal). Da mesma forma, outros estudos corroboraram a presença da enzima responsável pelo acoplamento oxidativo de fenilpropanóides no sistema enzimático do citocromo P-450 (MOLOG et al., 2001; KIM et al., 2009). Com isso, optou-se, inicialmente, pela extração das enzimas microssomais das folhas de *Peperomia blanda* e incubação do extrato insolúvel com o álcool sinapílico e com o *E*-5-metóxi-isoeugenol na presença do NADPH e H_2O_2 . No entanto, a análise destas reações por CLAE e CLAE-EM, não mostraram a formação dos produtos.

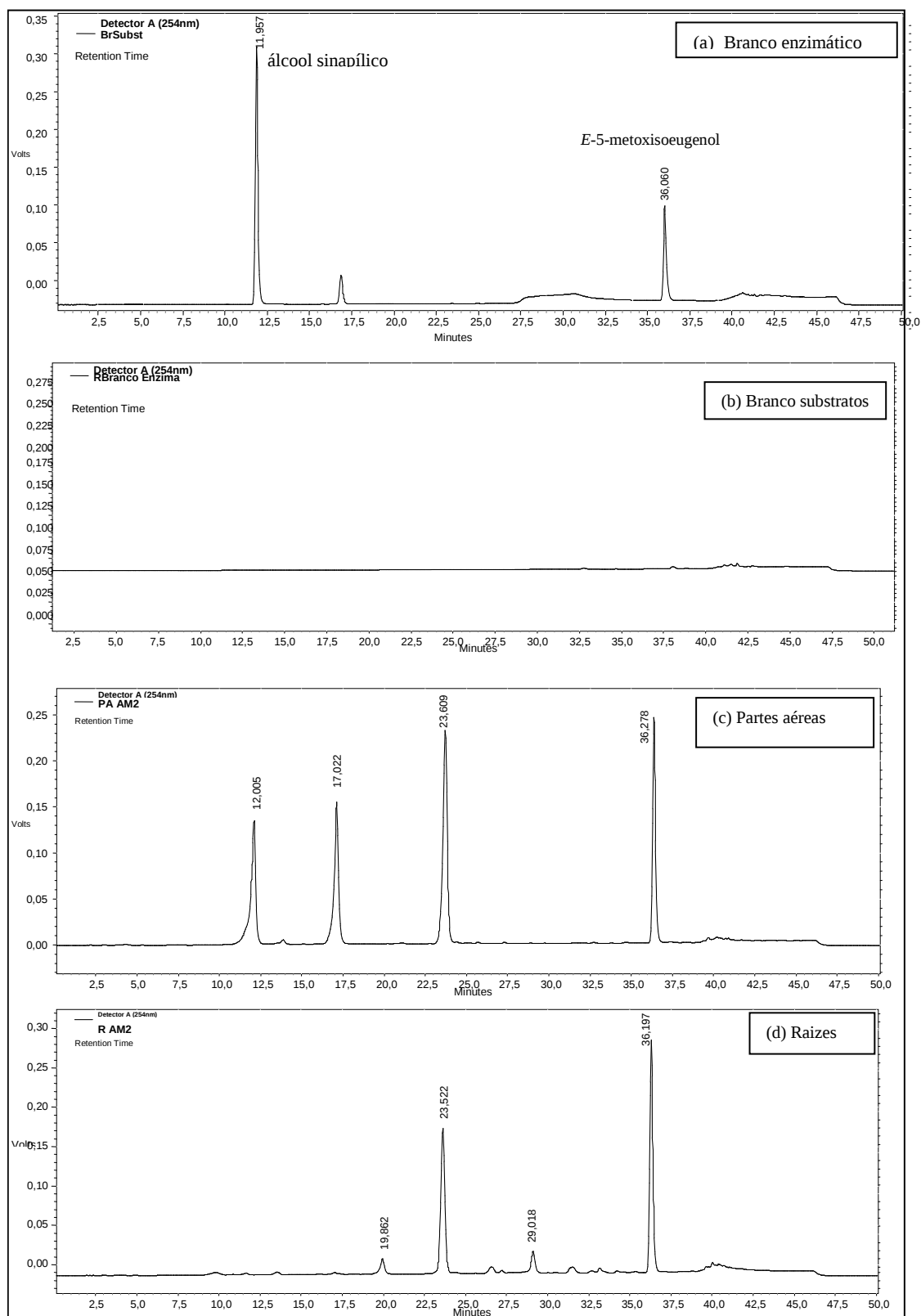
Optou-se então por um protocolo de extração e concentração de enzimas microssomais e solúveis das raízes e das partes aéreas de *P. blanda*. As partes aéreas e raízes utilizadas neste experimento foram coletadas no mês de julho, uma vez que os estudos prévios de dinâmica metabólica mostraram grande acúmulo das lignanas nesta época do ano em ambos os órgãos da espécie.

Após precipitação salina das enzimas extraídas, a concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Bradford. As concentrações finais foram ajustadas para $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e as soluções resultantes foram utilizadas nas reações enzimáticas *in vitro*.

A análise dos resultados das reações enzimáticas utilizando a fração microsomal de partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda* não evidenciou a formação de produtos. No entanto, a análise dos resultados da incubação das frações solúveis do extrato enzimático com os precursores, mostrou o aparecimento de bandas cromatográficas, sugerindo a formação de produtos. A maior concentração de produtos formados foi observada em reações com enzimas de raízes (Figura 74, p. 149).

Os picos cromatográficos em aproximadamente 11,9 e 36,0 minutos (Figura 74, p. 149) são referentes aos substratos, álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugeol, respectivamente, que foram identificados por comparação do tempo de retenção de seus padrões analisados sob mesma condição. O pico em 17 minutos refere-se a um produto de degradação do álcool sinapílico, que é bastante lábil. Outro pico bastante intenso em 23,6 minutos aparece tanto nas reações com enzimas das raízes quanto das partes aéreas. Alguns picos de menor intensidade aparecem apenas nas reações que utilizam as enzimas de raízes de *P. blanda*. É importante destacar que, nas reações com enzimas extraídas das raízes, ocorre o consumo total do álcool sinapílico.

Figura 74: Cromatogramas das reações enzimáticas utilizando (a) branco reacional (sem adição de enzimas), (b) branco dos substratos (sem adição dos substratos), (c) reação com enzimas extraídas das partes aéreas e (d) das raízes, juntamente com os substratos e cofatores.



A incubação dos precursores com o extrato enzimático solúvel das raízes foram novamente realizadas e submetidas à análise por CLAE-DAD-EM, com ionização por *eletrospray* (modo positivo), com o objetivo de identificar os produtos formados (Figuras 75-79, p. 151 e 152). A análise dos espectros sugeriu a formação dos produtos esperados. As estruturas químicas propostas e suas respectivas massas molares estão demonstradas na tabela abaixo (tabela 44).

Tabela 44: Tempo de retenção, relação massa/carga (m/z) e estruturas dos reagentes e dos produtos formados sugeridos pela análise dos espectros de massa.

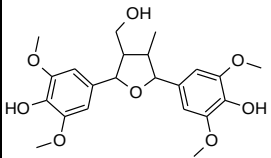
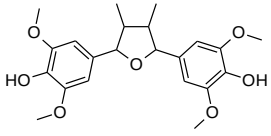
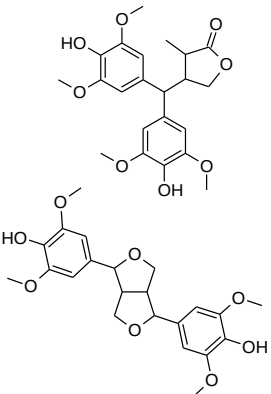
Tempo de retenção (minutos)	m/z	Massa e fórmula molecular	Estrutura
23,0	$[M+H]^+ = 421$ $[M-H_2O]^+ = 403$ $[M+Na]^+ = 443$	420 $C_{22}H_{28}O_8$	
42,0	$[M+H]^+ = 405$ $[M+Na]^+ = 427$	404 $C_{22}H_{28}O_7$	
34,6 40,1	$[M+H]^+ = 419$ $[M+Na]^+ = 441$ $[M+H]^+ = 419$	418 $C_{22}H_{26}O_8$	

Figura 75: Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM da reação dos precursores álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol com enzimas da fração solúvel extraída das raízes de *P. blanda*.

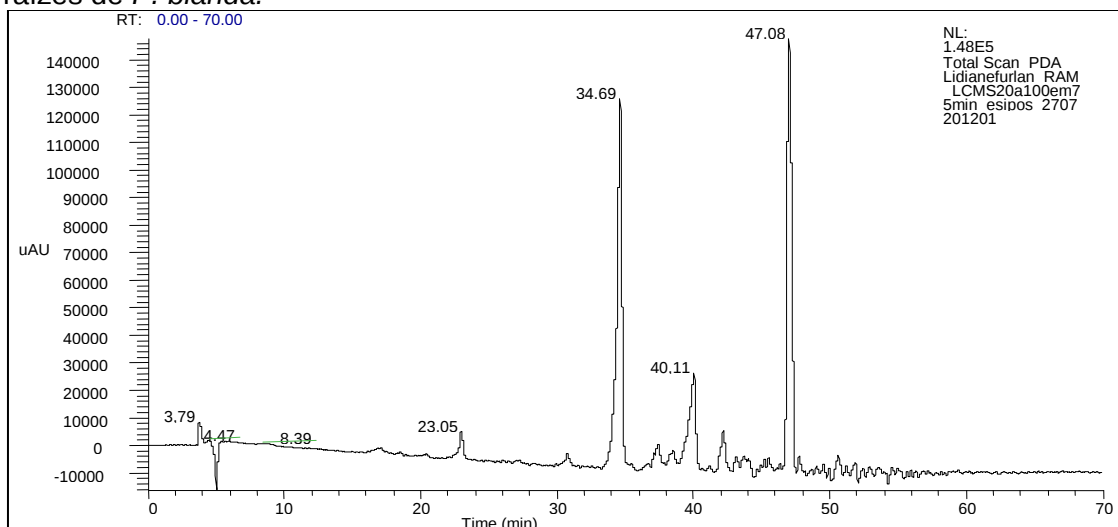


Figura 76: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 23,1 min.

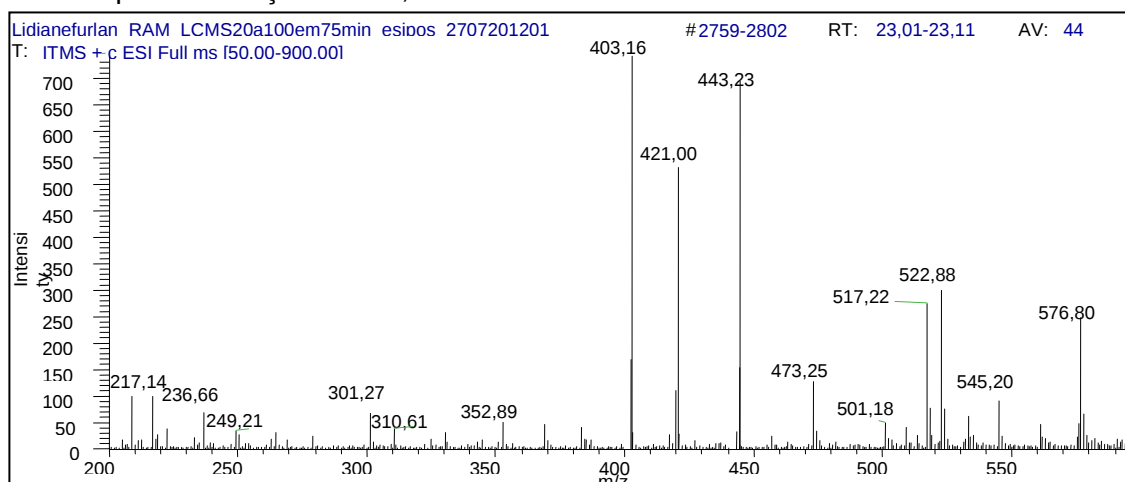


Figura 77: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 34,8 min.

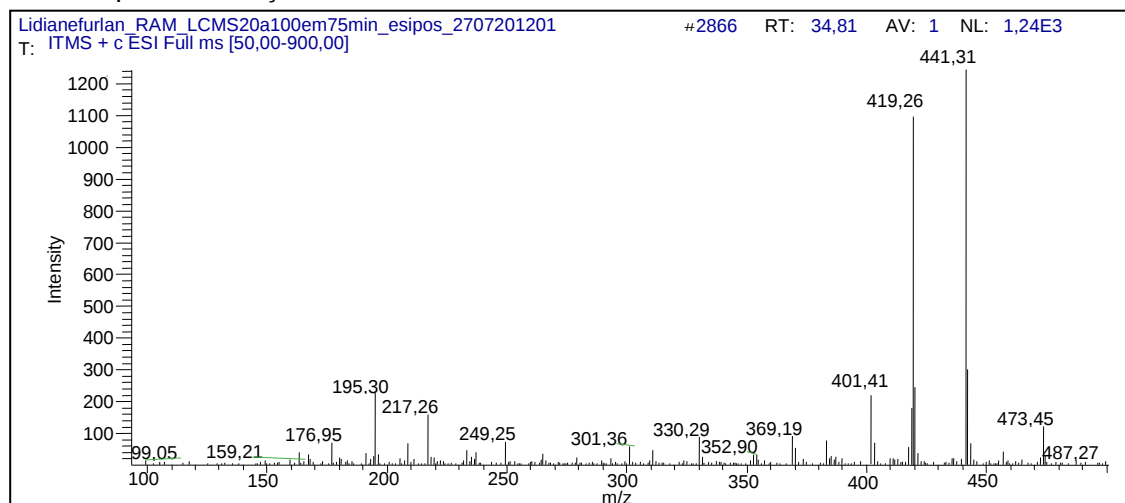


Figura 78: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 40,1 min.

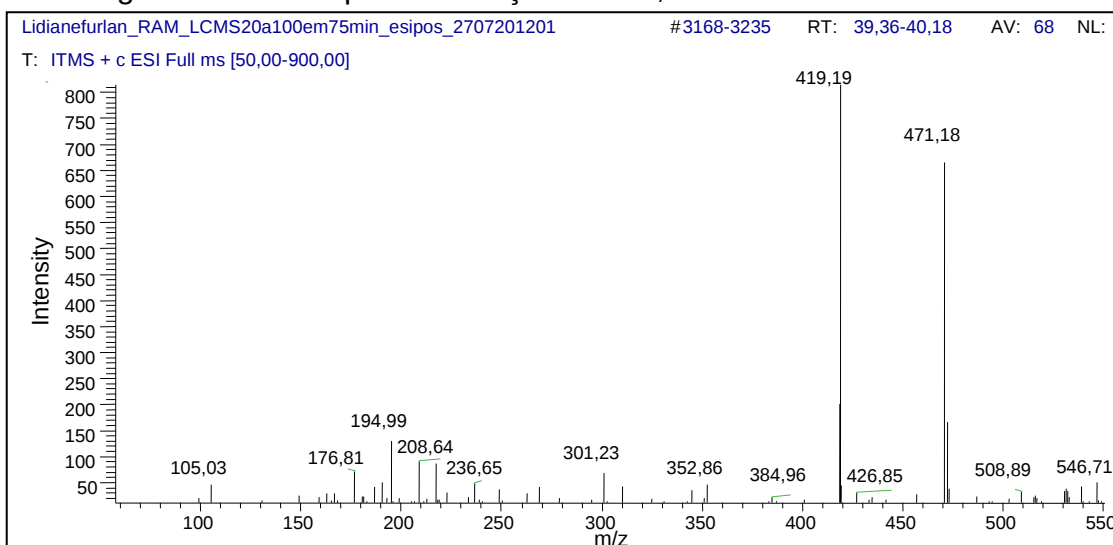
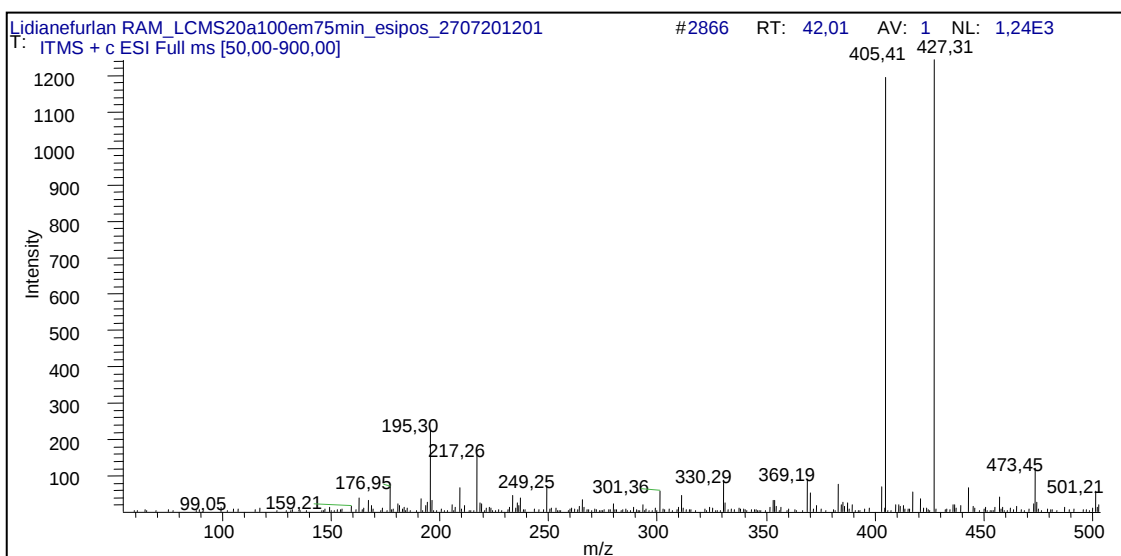
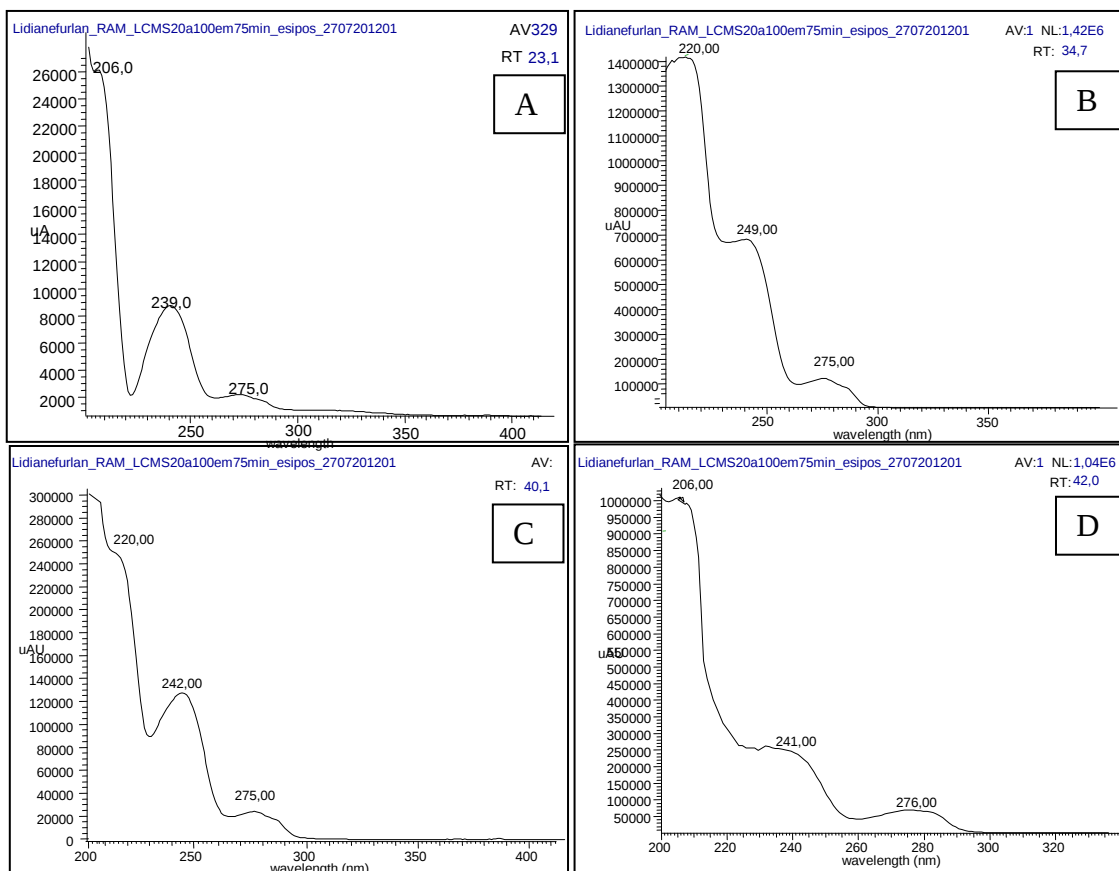


Figura 79: Espectro de massas da substância referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 42,0 min.



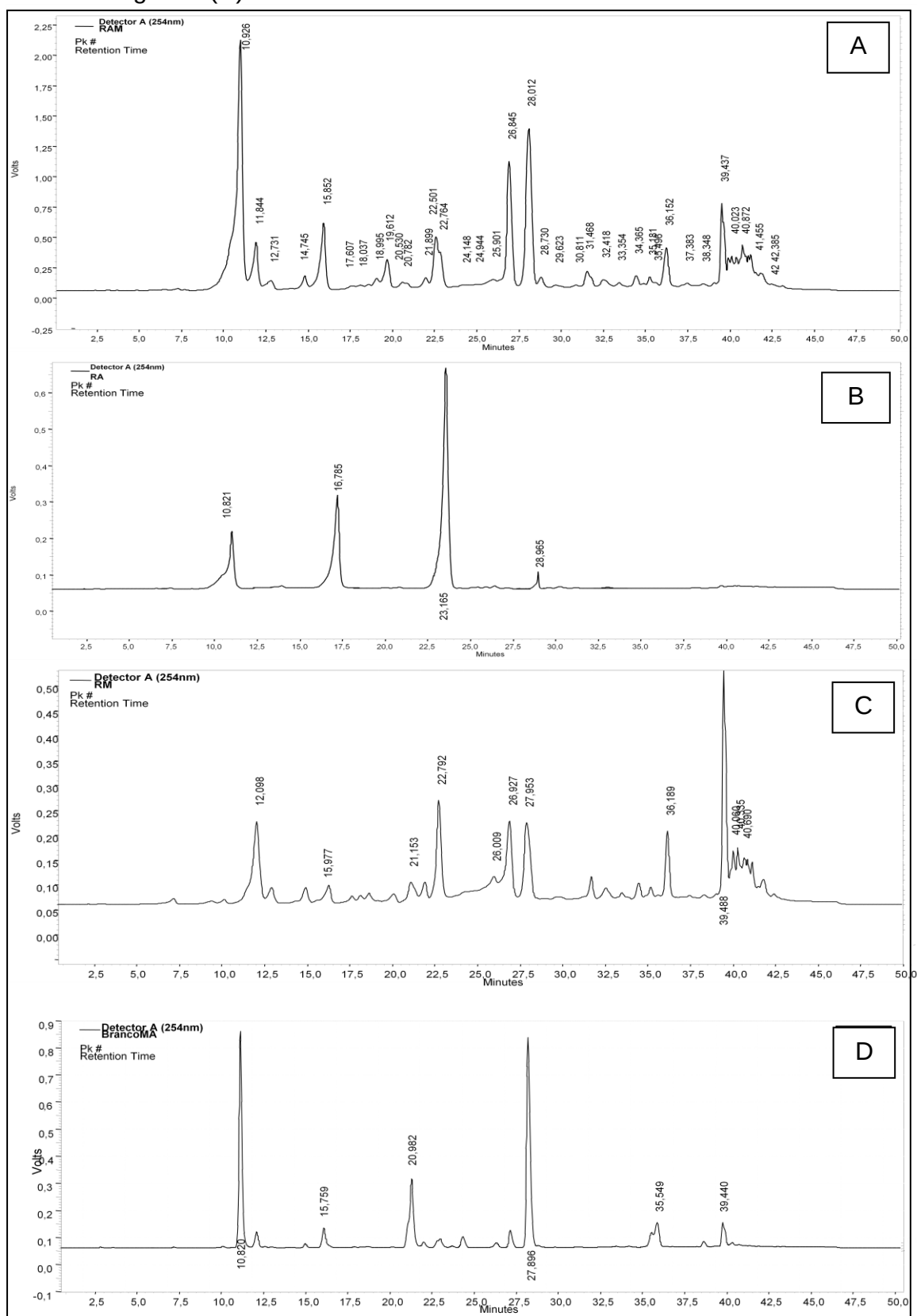
Os espectros no UV/Vis das substâncias de interesse foram analisados e corroboram as estruturas química propostas. Como demonstrado no item 5.3.4.1, (p. 104), as lignanas tetraidrofurânicas possuem absorção máxima em aproximadamente λ 245 e 275 nm e as secolignanas apresentam absorção máxima em aproximadamente λ 220, 250 e 275 nm. Os espectros no UV estão apresentados na figura 80 (p. 153).

Figura 80: Espectros no UV dos produtos formados na reação enzimática utilizando os precursores álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol com extrato enzimático de raízes de *P. blanda*. Espectros no UV referentes às substâncias com tr em (A) 23,1 min., (B) 34,7 min. (C) 40,1 min., (D) 42,0 min.



Um segundo experimento utilizando enzimas extraídas de raízes de *P. blanda* e os precursores separadamente foi realizado para avaliar o envolvimento de cada um deles com os metabólitos formados. A otimização das condições reacionais *in vitro* foram dificultadas devido à baixa estabilidade dos precursores. A melhor condição encontrada foi de temperatura de 35°C e tempo reacional de 3 horas.

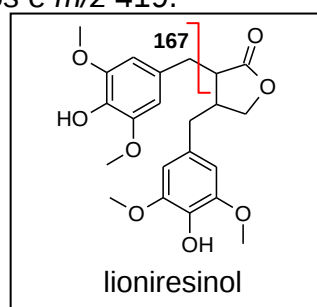
Figura 81: Cromatogramas referentes às reações com enzimas extraídas de raízes de *P. blanda* com H_2O_2 , NADPH e os precursores: (A) álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol, (B) apenas o álcool sinapílico e (C) apenas *E*-5-metoxisoeugenol. (D) Branco sem extrato enzimático.



Os produtos formados também foram analisados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo (Figura 83 e 84, p. 156 e 157). Foram detectados cinco produtos. Na reação enzimática *in vitro* que utilizou como precursor apenas o *E*-5-metoxisoeugenol, foi detectada a formação de uma substância que apresentou tempo de retenção em 26,9 minutos com m/z 405. Na reação enzimática incubada com o precursor o *E*-5-metoxisoeugenol e o álcool sinapílico foi detectada uma substância com tempo de retenção em 19,6 minutos com m/z 421. Finalmente, na reação enzimática que utilizou como precursor apenas o álcool sinapílico, foram detectadas três substâncias com tempos de retenção em 16,8, 23,1 e 28,9 min., todas apresentando m/z 419.

Esses resultados corroboram as propostas apresentadas nos experimento anterior. A terceira substância detectada neste experimento (m/z 419), não havia sido observada anteriormente. Esta substância poderia ser apenas um diastereoisômero das estruturas previamente propostas, ou ainda um intermediário estereoisomérico da reação de biossíntese das peperominas, como por exemplo, o lioniresinol, representado na figura 82 (p. 154). Esta última estrutura química proposta é corroborada pelo sinal em m/z 167, que corresponde a uma fragmentação característica desta substância.

Figura 82: Estrutura química do produto sugerido correspondente a um intermediário da reação de biossíntese das peperominas com tempo de retenção de 28,9 minutos e m/z 419.



Esses resultados reforçam a proposta biossintética da lignana tetraidrofurânica **7** (m/z 421), formada a partir do acoplamento cruzado entre o *E*-5-metoxisoeugenol e o álcool sinapílico. O fato dos picos com m/z 419 estarem presentes apenas quando o álcool sinapílico é usado como precursor corrobora a formação das peperominas a partir deste.

Figura 83: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo da segunda reação *in vitro* do extrato enzimático das raízes de *P. blanda* com os precursores, álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol.

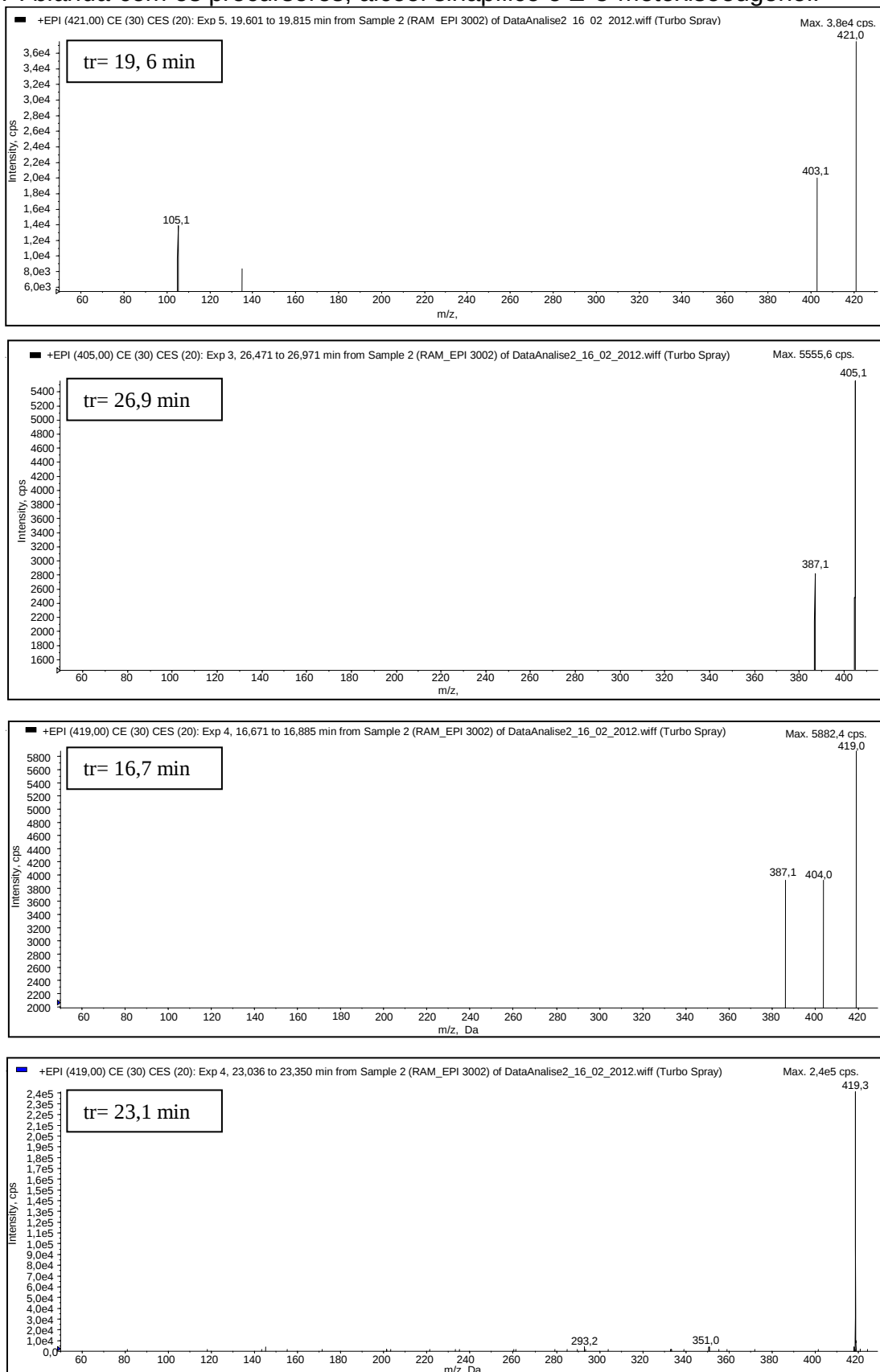
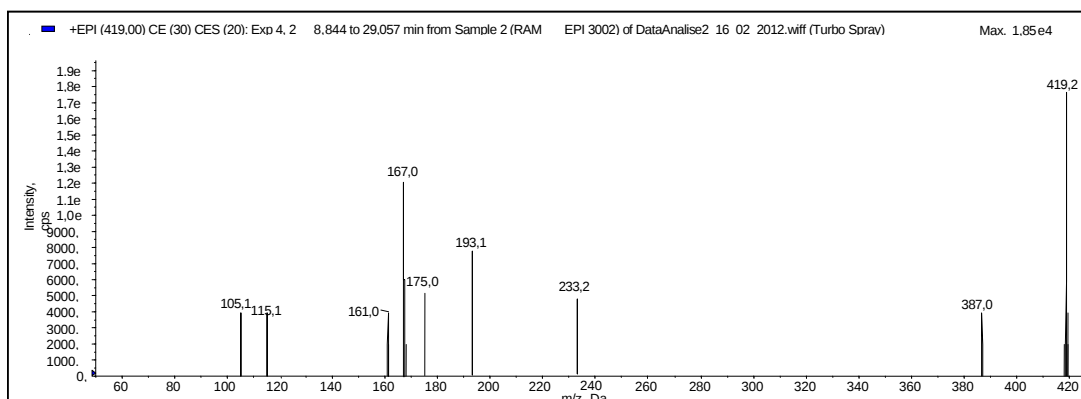


Figura 84: Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo do produto formado com tr em 28,9 minutos, com m/z 419.



Para confirmar as estruturas propostas, as amostras foram fracionadas por CLAE preparativo, utilizando coluna C-18, e as frações resultantes foram analisadas por RMN. Esses experimentos foram realizados com a colaboração do professor Antônio Gilberto Ferreira, da Universidade Federal de São Carlos.

5.4.6. Identificação dos produtos formados por ressonância magnética nuclear.

Do fracionamento da amostra da reação *in vitro* de enzimas das raízes de *Peperomia blanda* com os precursores sintetizados, foram adquiridas 6 frações, no entanto apenas 2 obtiveram massa suficiente para análise por ressonância magnética nuclear, que revelaram a presença de uma lignana furofurânica, o siringaresinol, e uma lignana do tipo peperomina. Estas análises estão discutidas a seguir.

A. Lignana furofurânica

A presença da lignana furofurânica siringaresinol (Figura 85, p.158) foi confirmada no espectro de RMN de ^1H (Figura 86, p. 158). Observa-se neste espectro um sinal em δ 3,03 (m, 2H) referente aos hidrogênios das posições H-8 e H-8', sinais em δ 4,06 (m, 2H) e em δ 4,22 (dd, $J = 7,5$ e $5,5$, 2H) referente aos hidrogênios H-9 e H-9' respectivamente, além do sinal em δ 4,67 (d, $J =$

3,5, 2H) referente aos hidrogênios H-7 e H-7'. O sinal dos grupos metoxílicos foi observado em δ 3,84 (s, 12H) e o sinal dos hidrogênios aromáticos em δ 6,52 (s, 4H). Estes dados comparados aos da literatura, confirmam a estrutura do siringaresinol (RAHMAN et al., 2007).

Figura 85: Estrutura química da lignana furofurânica siringaresinol, formada na reação enzimática e confirmada por RMN ^1H .

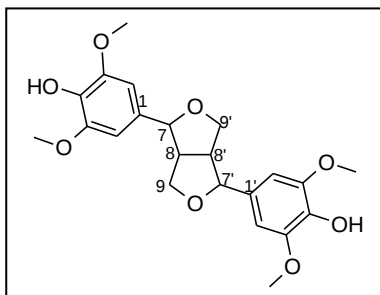
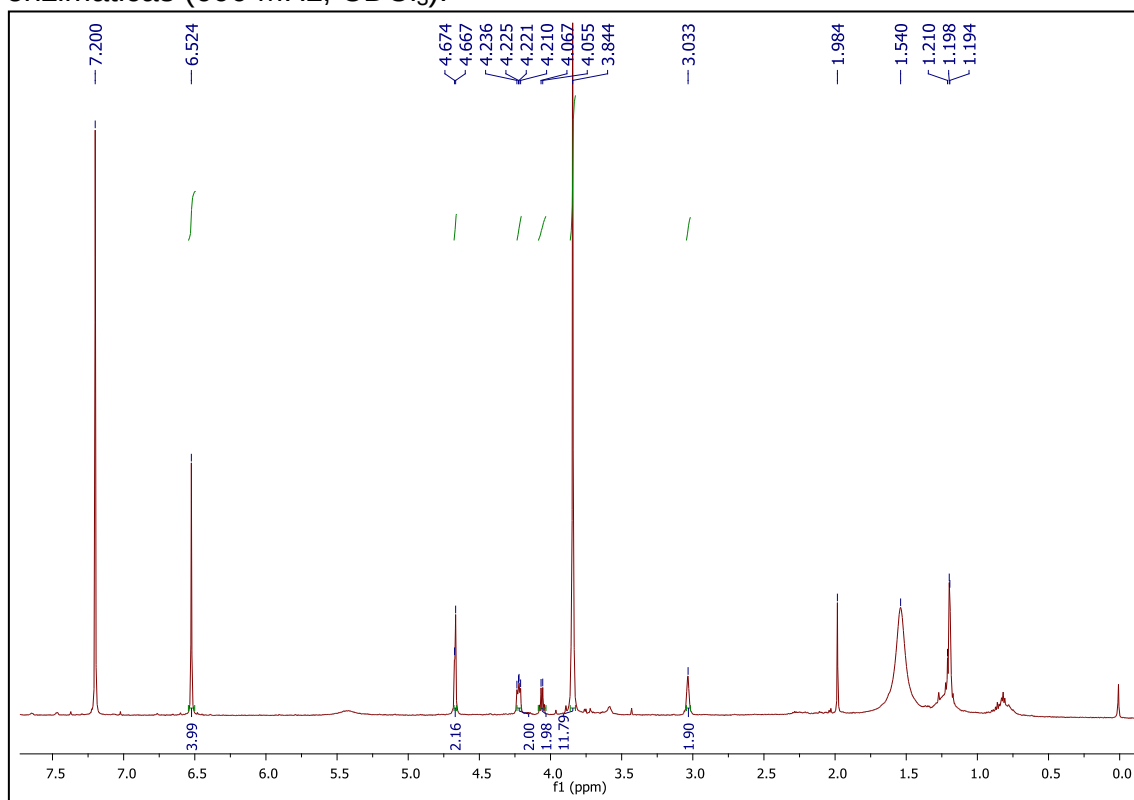


Figura 86: Espectro de RMN de ^1H do siringaresinol formado nas reações enzimáticas (600 MHz, CDCl_3).



B. Secolignana

A estrutura química da peperomina (Figura 87, p. 159) também foi identificada por experimentos de RMN ^1H (Figura 88-89, p. 160) e experimentos bidimensionais (Figuras 90-93, p. 161 e 162). No espectro de RMN ^1H observa-se sinais característicos do anel butirolactônico da peperomina formada em δ 2,04 (qn, $J = 6,5$ Hz), 2,60 (qn, $J = 6,5$ Hz) e 3,26 (d, $J = 10,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metínicos das posições H-2, H-3 e H-5. Observa-se ainda a presença do grupo metílico em δ 1,08 (d, $J = 6,0$ Hz), e os sinais em δ 4,05 (dd, $J = 7,5$ e $2,0$ Hz) e 4,14 05 (dd, $J = 7,5$ e $1,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios geminais H-4a e H-4b, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 6,46-6,51 e metoxílicos em δ 3,82.

O mapa de contornos HSQC mostra a correlação direta entre o carbono em δ 13,9 com o hidrogênio em δ 1,08 (posição 6), o carbono em δ 44,2 com o hidrogênio δ 2,04 (posição 2), o carbono em δ 48,1 com o hidrogênio em δ 2,60 (posição 3), o carbono em δ 56,9 com o hidrogênio δ 3,26 (posição 5) e o carbono em δ 69,5 mostra correlação com os hidrogênios geminais em δ 4,05 e 4,13 (posição 4).

O mapa de contorno HMBC confirma o fechamento do anel mostrando correlação entre C-3 (δ 48,1) e os hidrogênios δ 1,08 (H-6), 2,04 (H-2), δ 4,05 e (H-4a). O Carbono em δ 44,2 (C-2) mostra correlação com os sinais em δ 2,04, (H-2) e 2,60 (H-3), o carbono da carbonila em δ 172,0 (C-1) mostra correlação com o hidrogênio em δ 2,04 (H-2) e o carbono em δ 69,5 (C-4) mostrou correlação com os hidrogênios em δ 3,26 (H-5) e este com os hidrogênios aromáticos. Estes dados confirmam a estrutura da 2-metil-3-[bis(4'-hidroxi-3',5' dimetoxifenil)metil]butirolactona (Figura 87).

Figura 87: Estrutura química da secolignana, formada na reação enzimática.

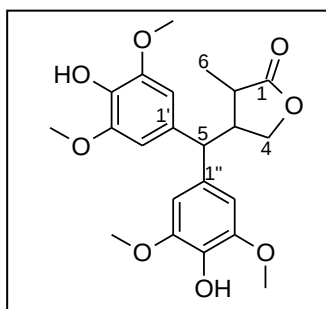


Figura 88: Espectro de RMN de ^1H da peperomina formada nas reações enzimáticas (600 MHz, CDCl_3).

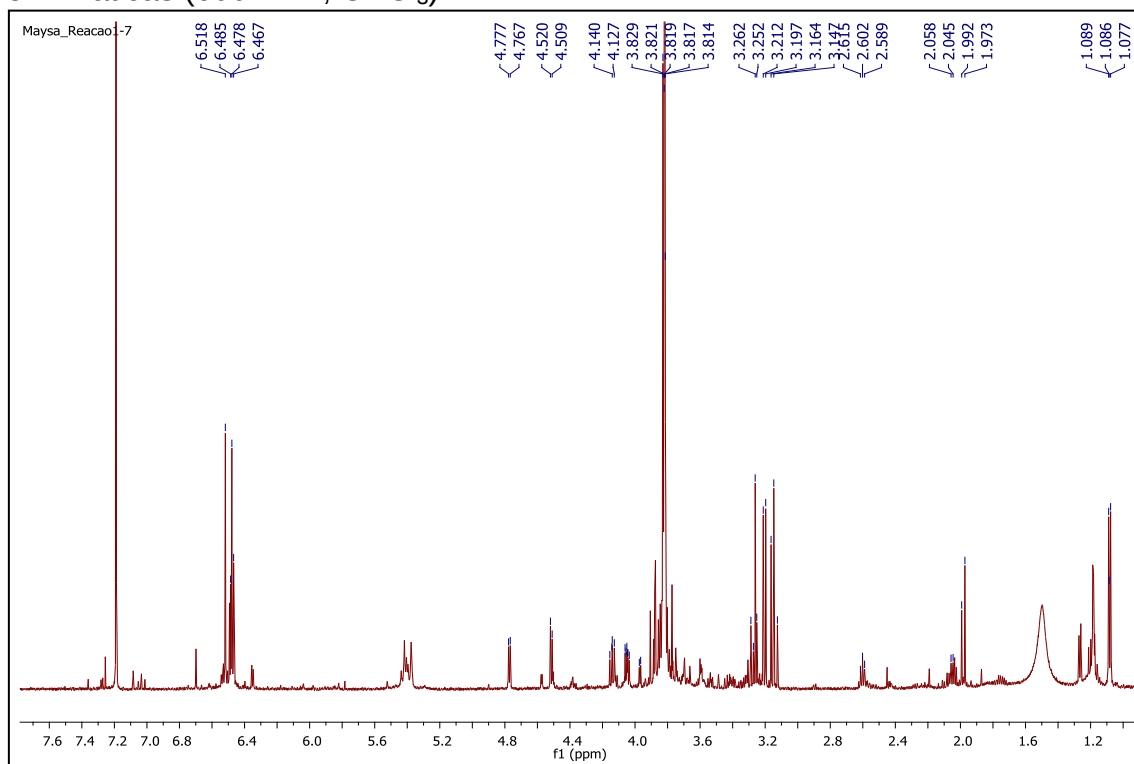


Figura 89: Espectro de RMN de ^1H da da peperomina formada nas reações enzimáticas. – ampliação.

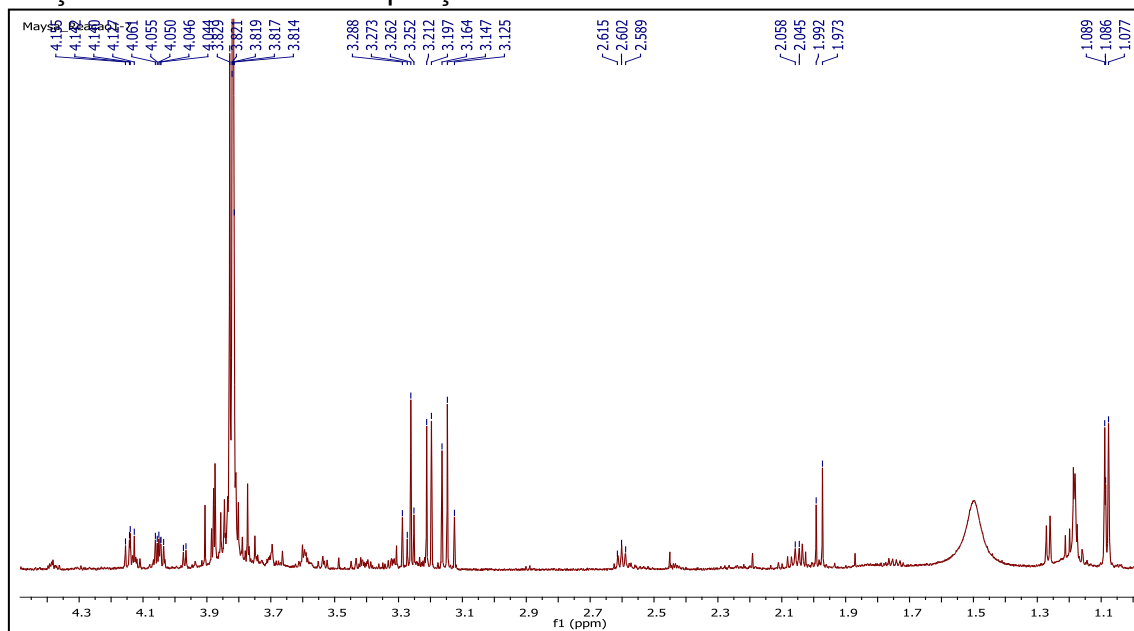


Figura 90: Mapa de contorno HSQC da peperomina formada na reação enzimática.

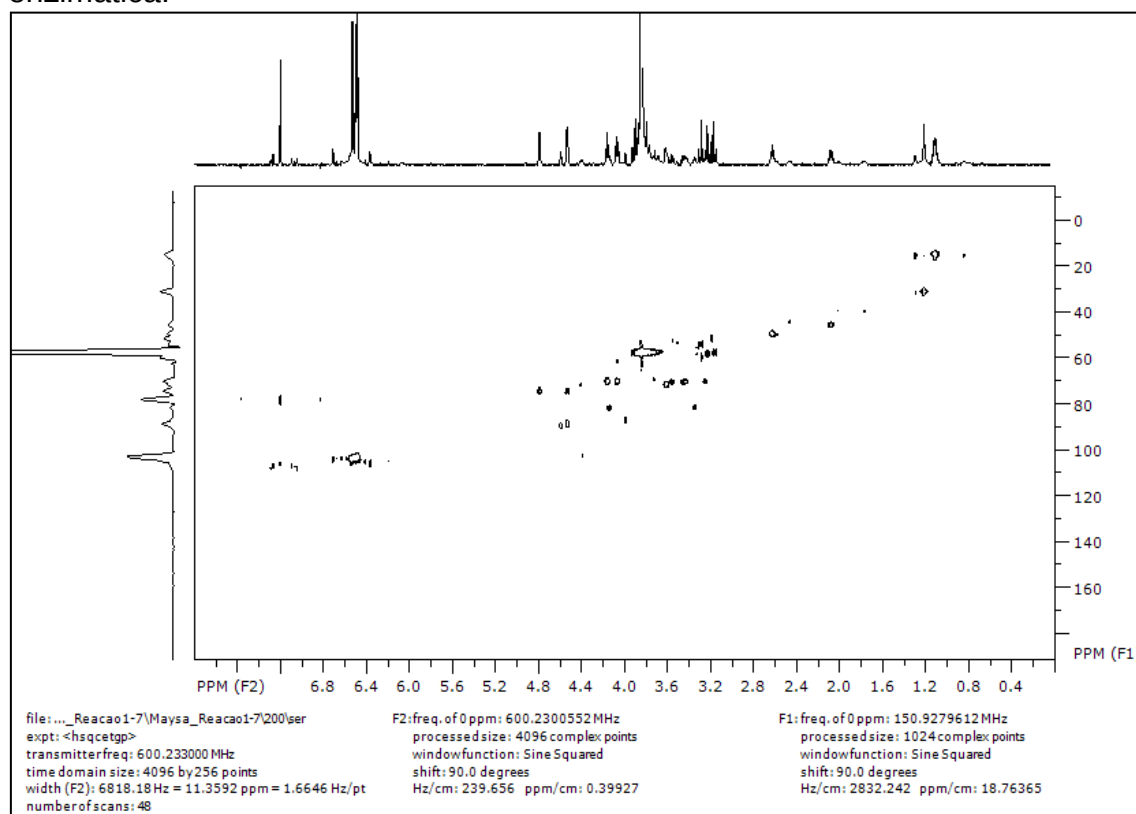


Figura 91: Mapa de contorno HSQC da peperomina formada na reação enzimática – ampliação.

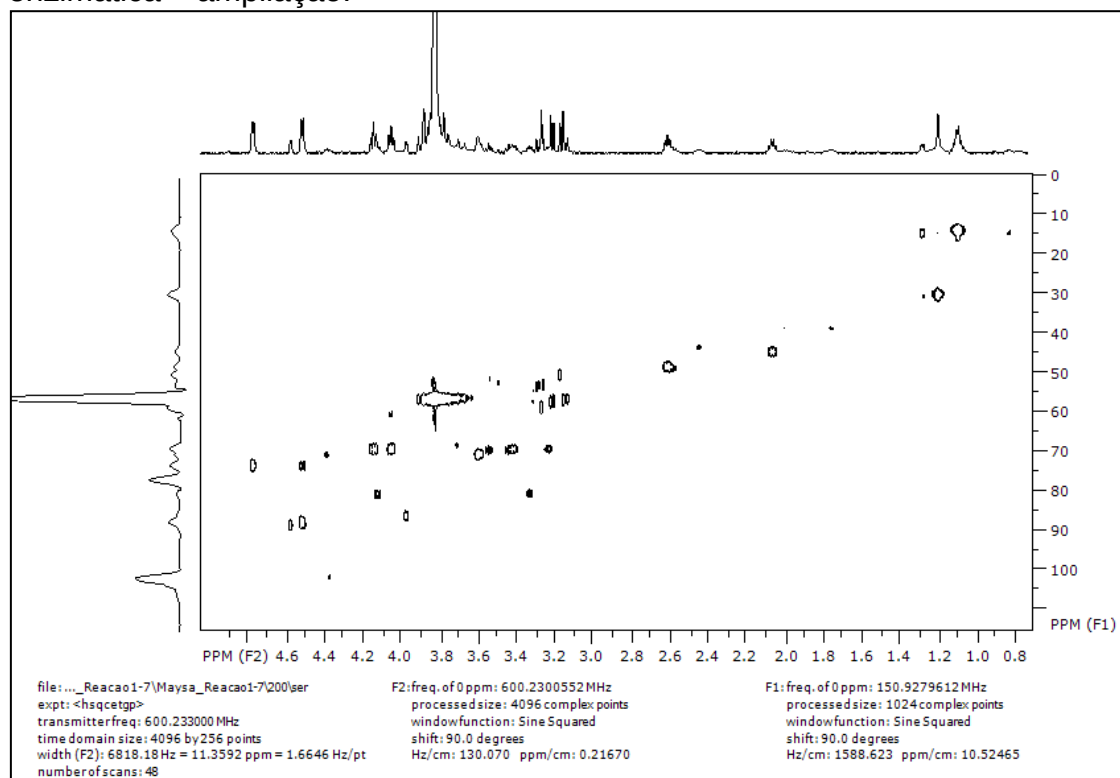


Figura 92: Mapa de contorno HMBC da peperomina formada na reação enzimática.

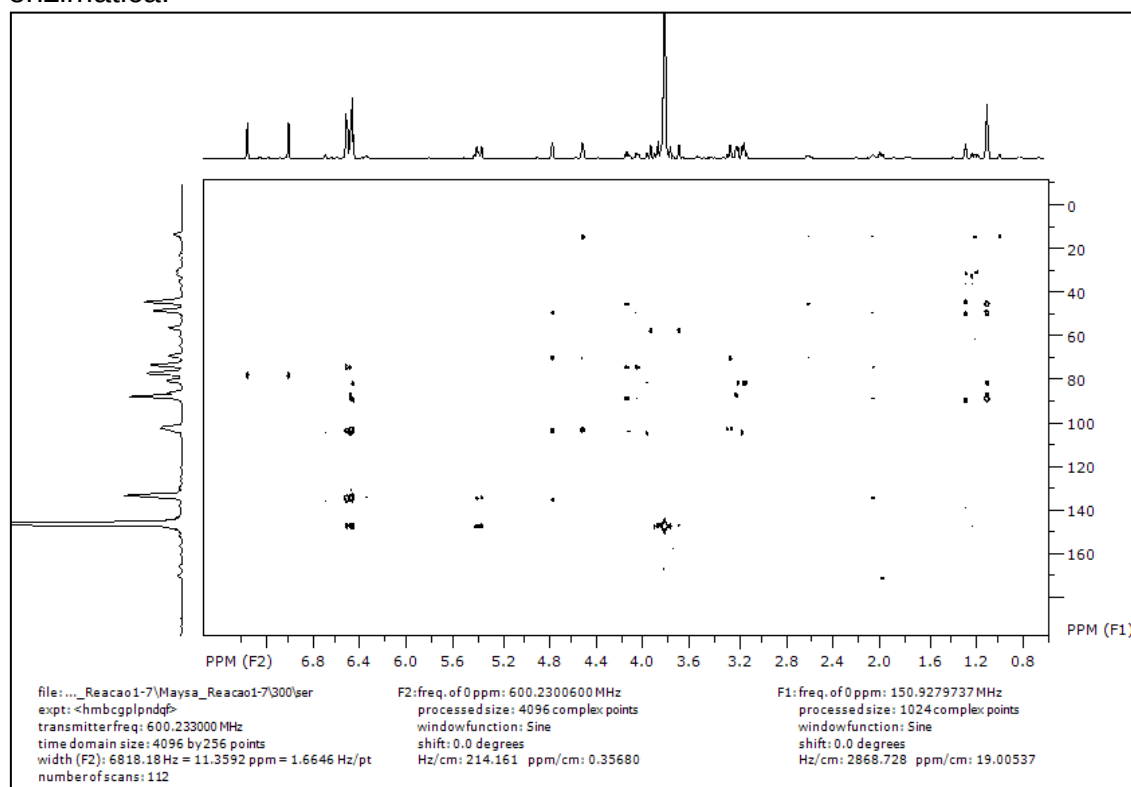
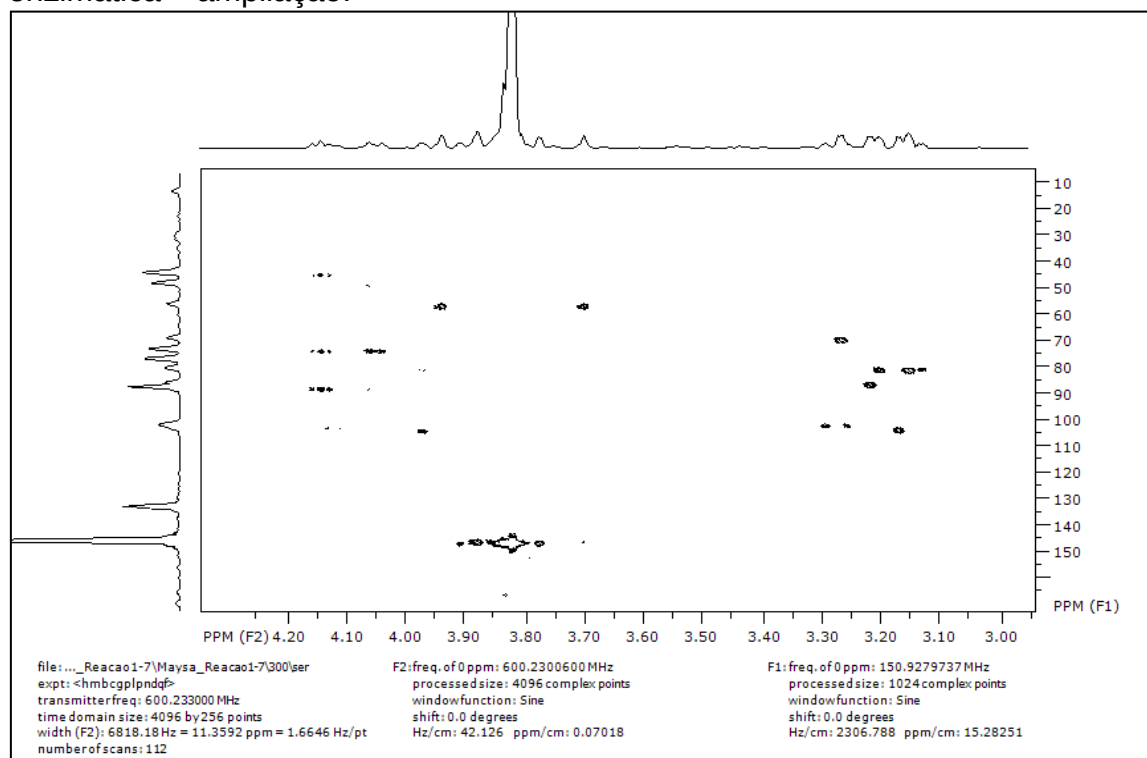
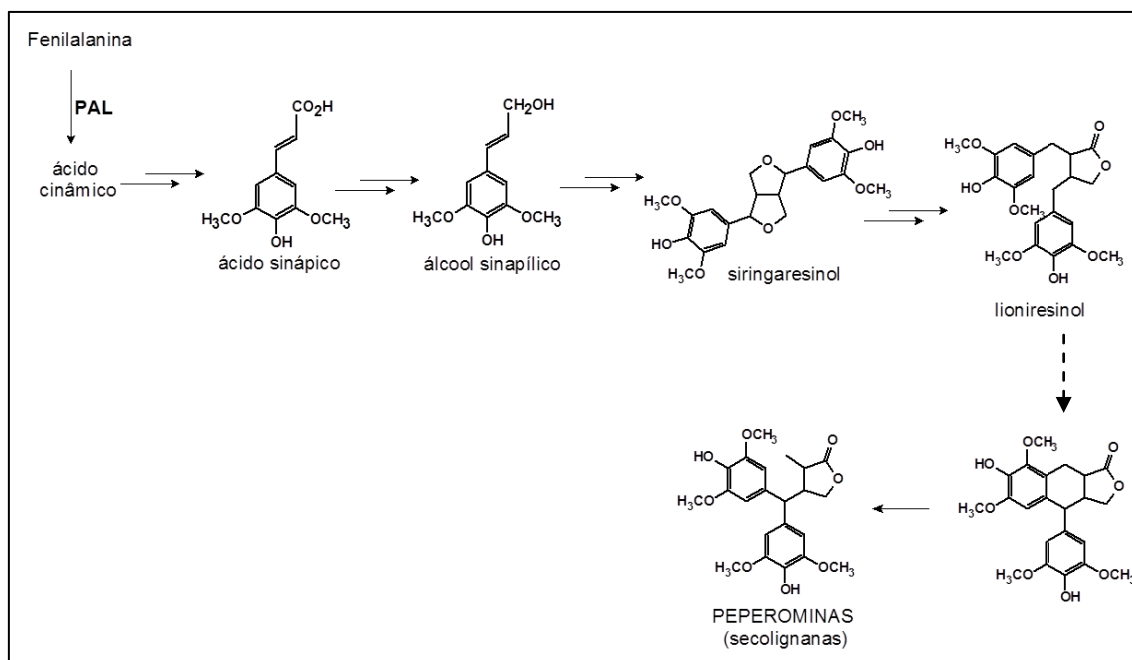


Figura 93: Mapa de contorno HMBC da peperomina formada na reação enzimática – ampliação.



De acordo com os resultados apresentados é plausível propor que a rota biossintética das peperominas utilize como precursor o álcool sinápico e que o siringaresinol e o lioniresinol estejam entre os intermediários desta reação enzimática (Figura 94, p. 163).

Figura 94: Rota biossintética de formação das peperominas.



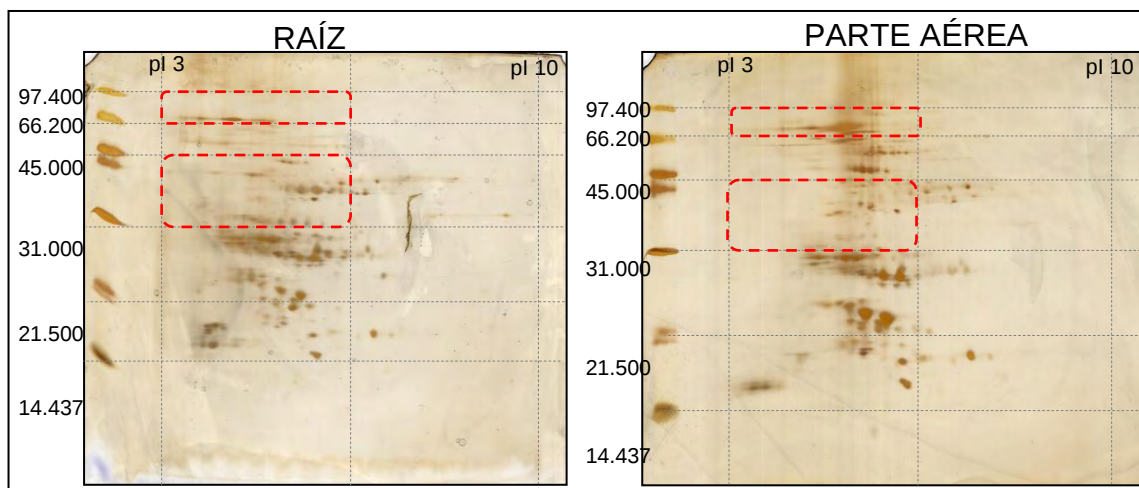
5.4.7. Análise do perfil proteico de partes aéreas e raízes de *Peperomia blanda* por eletroforese bidimensional.

Os experimentos de eletroforese bidimensional foram realizados visando comparar os perfis proteicos das partes aéreas e raízes de *P. blanda*, visto que, seus extratos enzimáticos apresentam diferentes atividades na formação das lignanas. As enzimas peroxidases são responsáveis pelo acoplamento oxidativo dos monômeros de C_6C_3 , e são descritas na literatura com valores de ponto isoelétrico (pI) próximos de 5 (SOUZA et al., 2002, MONT OVANI; CLEMENTE, 2010) e peso molecular (PM) entre 30 e 60 KDa (ŞİŞECIOĞLU et al, 2010; NAVES, 2008).

A análise qualitativa por comparação visual dos géis referentes aos extratos enzimáticos dos diferentes órgãos permitiu verificar que os padrões de expressão apresentavam algumas diferenças. O extrato enzimático solúvel de

raízes de *P. blanda* apresentou maior abundância e concentração das bandas eletroforéticas nas regiões de *pI* e *PM* relatadas para a classe das peroxidases (Figura 95, p. 164). Este fato corrobora a intensa atividade observada nos experimentos *in vitro* com extratos obtidos das raízes.

Figura 95: 2D SDS-PAGE da fração enzimática de raízes e partes aéreas de *P. blanda*. Separação entre *pI* 3-10 (IPG 3-10 Linear) e *MW* entre 14-97 kDa (12,5%). Massa aplicada: 100 µg de proteínas totais.

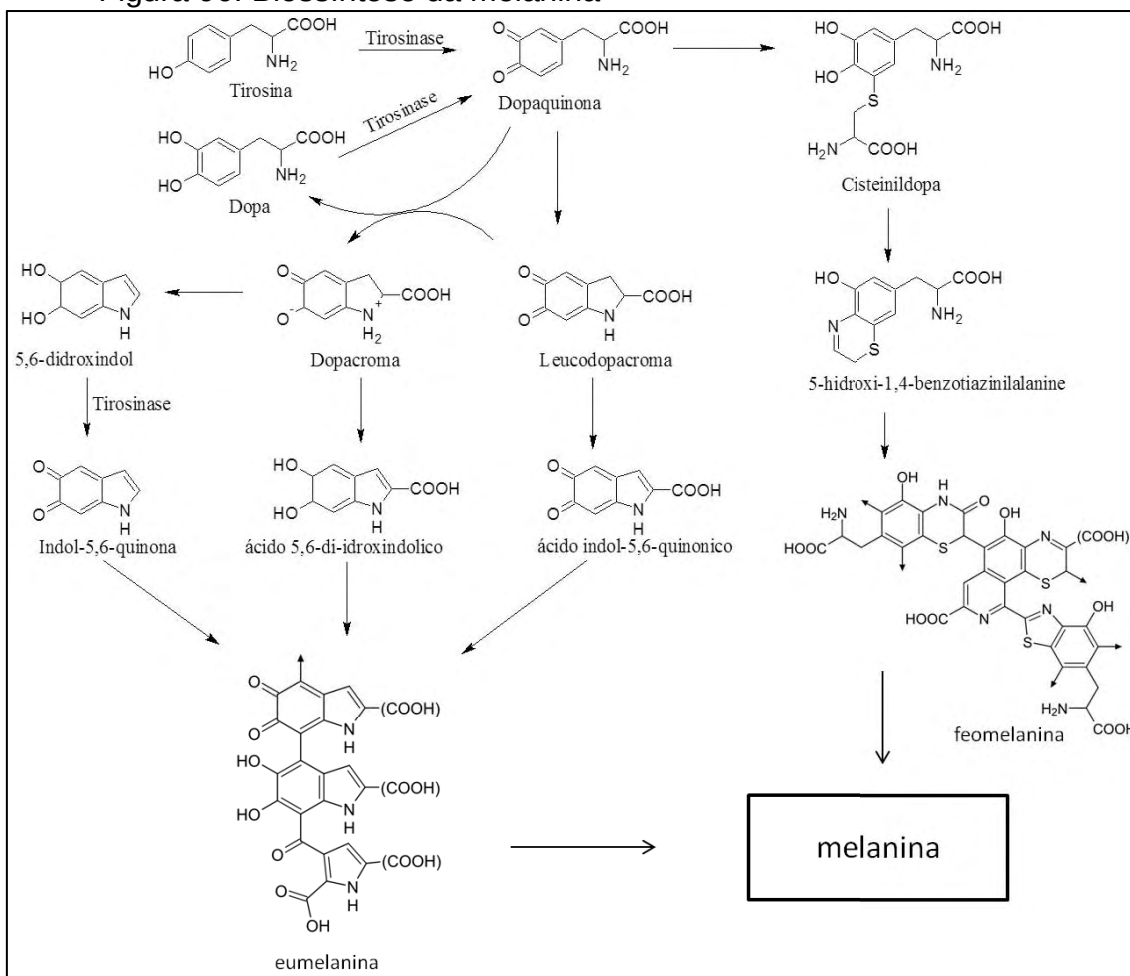


Outra enzima que teve sua atividade avaliada no presente trabalho e que, está envolvida na rota de formação das lignanas, é a PAL. A faixa esperada para a localização dos monômeros desta enzima, de acordo com a literatura, é de 50000 a 97000Da. Observa-se no gel acima que existe uma banda proeminente nas amostras de partes aéreas na região entre 66,2 e 97,4 KDa, e que parece estar associada à subunidades da PAL.

5.5. Estudo da atividade *in vitro* das lignanas e secolignanas de *Peperomia blanda* frente à enzima tirosinase.

A tirosinase é uma enzima envolvida na primeira etapa de biossíntese de melanina em mamíferos (Figura 96, p. 165), e é responsável pela pigmentação da pele, olhos, pelos e cabelos. A melanina desempenha um papel importante na proteção da pele humana contra os efeitos nocivos da radiação UV do sol, além de determinar a nossa aparência fenotípica (CHANG, 2009).

Figura 96: Biossíntese da melanina



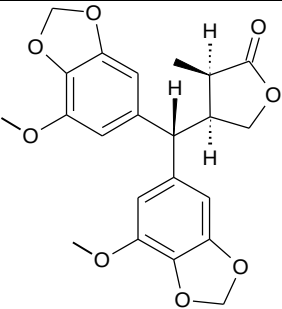
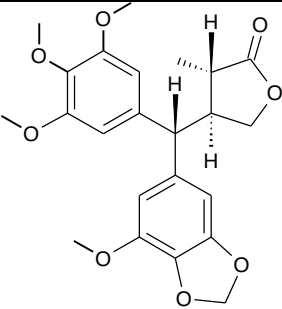
A disfunção da atividade enzimática da tirosinase está associada a diversas doenças de pele, como a hiperpigmentação ou hipopigmentação. Diversos produtos naturais foram testados no tratamento da inibição ou ativação desta enzima com fins terapêuticos e cosméticos, dentre eles constam os flavonóides, compostos fenólicos, terpenos e lignanas (CHANG, 2009; YE et al., 2010).

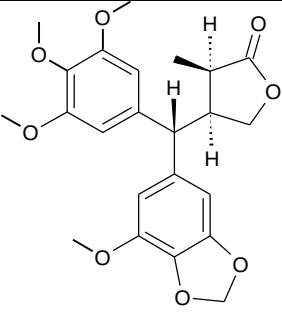
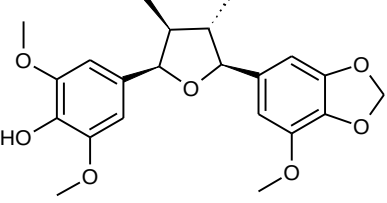
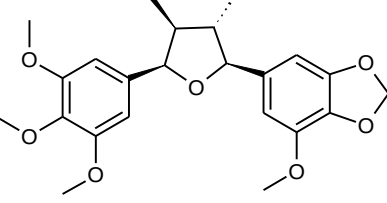
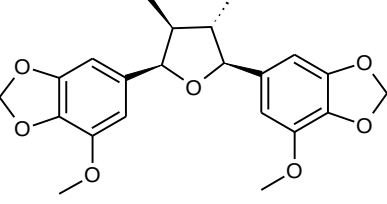
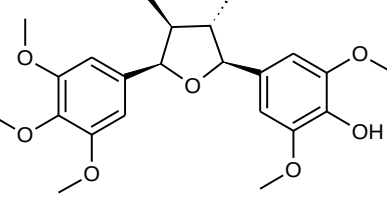
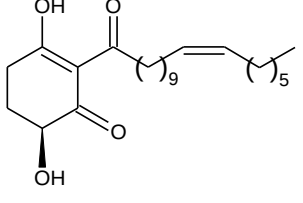
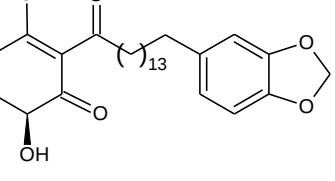
Os extratos de algumas espécies de Piperaceae, inclusive *Peperomias*, já foram relatados e patenteados como ativadores da tirosinase, e classificados como potenciais medicamentos ou cosméticos para tratamento de doenças como a poliose ou leucoplasia (KUBO; MATSUDA, 2003; MATSUDA et al., 2004).

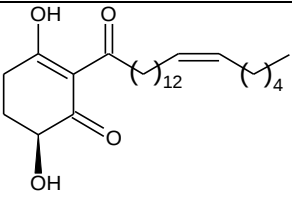
As substâncias isoladas de algumas espécies de *Piper* foram relatadas como potenciais inativadores da tirosinase, que podem auxiliar no tratamento estético de melasmas (KIM et al., 2006; ROW; HO, 2009).

As substâncias isoladas de *P. blanda* testadas nas reações enzimáticas foram: substâncias **1-3**, pertencentes à classe das secolignanas, substâncias **4-6** e **8**, pertencentes à classe das lignanas tetraidrofurânicas e substâncias **9-11**, pertencente à classe dos policetídeos. As estruturas químicas das substâncias avaliadas, bem como os valores do potencial de ativação ou inativação da tirosinase das mesmas estão descritos na tabela 45 (p. 166). Os valores estão apresentados em porcentagem de ativação ou inibição da enzima.

Tabela 45: Atividade das substâncias isoladas de *P. blanda* frente à enzima tirosinase.

Substância	Estrutura química	Inibição da atividade enzimática (%)
1		-31,2*
2		-6,2*

3		-21,5*
4		13,7
5		-16,4*
6		-22,4*
8		22,4
9		-32,3
10		- 39,6

11		-33,5
----	---	-------

* Os valores negativos sugerem a ativação da enzima na presença dos compostos.

Os resultados mostraram que, para as classes de substâncias testadas, o grupo metilenodioxílico parece ser importante na ativação da enzima, bem como a configuração *cis* no anel butirolactônico das peperominas. Os grupos hidroxílicos presentes na estrutura química das substâncias **4** e **8**, aparentemente contribuíram para inativação da tirosinase nos ensaios. As substâncias **9**, **10** e **11**, pertencentes à classe dos policetídeos, apresentaram-se como as mais potentes na ativação da enzima tirosinase. Esses estudos demonstram a potencialidade dos mesmos, porém, estudos mais conclusivos direcionados ao potencial ativador da tirosinase serão realizados, incluindo testes em células de mamíferos.

6. CONCLUSÕES

As etapas experimentais desenvolvidas no presente trabalho enfocaram estudos dos aspectos estruturais, funcionais e biológicos, associados a duas classes de lignanas presentes em *Peperomia blanda*: secolignanas (peperominas) e tetraidrofurânicas.

Os aspectos estruturais incluíram o estudo da configuração absoluta das secolignanas (peperominas), uma vez que não haviam dados descritos na literatura, principalmente relacionados à peperominas isoladas de fontes naturais. Os centros estereogênicos das secolignanas foram determinados por métodos quirópticos, como Dicroísmo Circular Vibracional e Eletrônico, associados a cálculos mecânico-quânticos, que levaram à atribuição dos mesmos e identificação da peperomina B, além de duas secolignanas inéditas.

Os aspectos metabólicos, principalmente relacionados à produção das lignanas de *P. blanda* e suas relações sazonais, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, após coletas mensais em dois habitats: um de crescimento natural e outro confinado (casa de vegetação). As análises revelaram um ciclo anual regular na produção das lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas. O acúmulo das secolignanas é expressivo na espécie, com predominância dos isômeros com configuração *cis* no anel butirolactônico, bastante raros quanto à ocorrência em espécies vegetais. As lignanas tetraidrofurânicas mostraram um perfil de acúmulo diretamente relacionado à proposta biossintética da classe, uma vez que a análise dos resultados demonstraram que a etapa biossintética de formação dos substituintes aromáticos de duas substâncias (**5** e **6**) utiliza como precursor comum a substância **4**, preferencialmente nas raízes da espécie. O maior acúmulo de todas as lignanas isoladas ocorre principalmente nos períodos de baixa disponibilidade hídrica (julho) e de desenvolvimento dos órgãos como raízes e frutos (novembro), o que sugere que as principais funções destas substâncias na espécie são de caráter estrutural, como na lignificação, assim como na sua proteção contra possíveis parasitas e predadores. Estes resultados foram fundamentais para a previsão da época do ano e do órgão vegetal em que as enzimas envolvidas nas etapas biossintéticas de formação das lignanas apresentariam maior expressão e atividade enzimática.

Os estudos biossintéticos relacionados à formação das lignanas de *P. blanda* foram iniciados avaliando-se a atividade enzimática da fenilalanina amônia liase em suas folhas, bem como em outras duas espécies de Piperaceae (*Piper tuberculatum* e *Peperomia obtusifolia*). O protocolo avaliado nas três espécies mostrou que essa enzima é termo estável e apresenta expressiva atividade em pH elevado, características importantes pela primeira vez relatadas para a PAL. Tais características podem favorecer a aplicação prática desses parâmetros na indústria de alimentos ou na síntese de derivados C₆C₃ de forma a contribuir para a transformação da fenilalanina utilizando processos sustentáveis. A utilização dos precursores álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol em reações *in vitro* confirmaram a maior atividade das enzimas envolvidas na biossíntese das lignanas nos órgãos vegetais e períodos anuais previstos pelo estudo metabólico. Os experimentos realizados confirmaram que a biossíntese das secolignanas ocorre pela utilização exclusiva do álcool sinapílico. A incorporação do álcool sinapílico permitiu a elucidação não somente da via metabólica, mas também de uma proposta dos mecanismos envolvidos na mesma, baseado na identificação dos intermediários biossintéticos por técnicas espectrométricas, incluindo ressonância magnética nuclear e de massas. A rota biossintética para formação das lignanas tetraidrofurânicas com oxidação na posição C-9 mostrou que há acoplamento cruzado entre os dois precursores utilizados, álcool sinapílico e *E*-5-metoxisoeugenol. O acoplamento de diferentes fenilpropanóides para formação de lignanas tetraidrofurânicas demonstra uma diferenciada e rara seletividade no sítio ativo desta enzima.

Os estudos biológicos foram baseados em ensaios *in vitro* das substâncias isoladas de *P. blanda* frente à enzima tirosinase, uma vez que em estudos prévios, espécies de Piperaceae demonstraram ser ativas nessa matriz biológica. As lignanas tetraidrofurânicas **4** e **8** apresentaram atividade inibidora da enzima, enquanto que a secolignana **1** apresentou um aumento da atividade enzimática da tirosinase acima de 30%. As substâncias da classe dos policetídeos, também presentes em *P. blanda*, revelaram potente propriedade ativadora da enzima, com aumento de aproximadamente 40% observado para a substância **10**.

Referências

ADLERCREUTZ, H.; FOTSIS, T.; HEIKKINEN, R.; DWYER, J. T.; GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; LAWSON, A. M.; SETCHELL, K. D. R. Diet and urinary excretion of lignans in female subjects. **Medicinal Biology**, v. 59, n. 4, p. 259-61, 1981.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jul. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 dez. 2012.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; ANDRADE, J. B. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2482-2486, 2009.

ARRIGONI-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, Apr. 2004.

BAHLS, S-C. *Hypericum perforatum* no tratamento da depressão: uma atualização. **Arquivo Brasileiro de Psiquiatria, Neurologia e Medicina Legal**, v. 99, n. 4, out. 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BATISTA, 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, Mar. 2008.

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

BÜRGI, T.; VARGAS, A.; BAIKER, A. VCD spectroscopy of chiral cinchona modifiers used in heterogeneous enantioselective hydrogenation: conformation and binding of non-chiral acids. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 2, n. 9, p. 1596-1601, Sept. 2002.

CABANILLAS, B. J.; LAMER, A-C.; CASTILLO, D.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ODONNE, G.; BOURDY, G.; MOUKARZEL, B.; SAUVAIN, M.; FABRE, N. Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguineispicum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1884-1890, Nov. 2010.

CARDOSO-CARRARO, C. J.; DANTAS, M. I. S.; ESPESCHIT, A. C. R.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R. Flaxseed and human health: reviewing benefits and adverse effects. **Food Reviews International**, v. 28, n. 2, p. 203-230, 2012.

CASTRO, M. A.; CORRAL, J. M. M.; GORDALIZA, M.; GOMEZ-ZURITA, M. A.; PUENTE, M. L.; BETANCUR-GALVIS, L. A.; SIERRA, J.; FELICIANO, A. S. Synthesis, cytotoxicity and antiviral activity of podophyllotoxin analogues modified in the E-ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 899-911, 2003.

CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A. C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; ROSARIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413-422, June 2009.

CHANG, T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

CHEN, C-M.; JAN, F-Y.; CHEN, M-T; LEE, T-J. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**, v. 29, n. 3, p. 411-414, 1989.

CHENG, G. W.; BREEN, P. J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 865-869, 1991.

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

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001.

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

CURTI, C.; ZANARDI, F.; BATTISTINI, L.; SARTORI, A.; RASSU, G.; PINNA, L.; CASIRAGHI, G. Streamlined, asymmetric synthesis of 8,4'-oxyneolignans. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 8552-8558, 2006.

DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 123, n. 2, p. 453-461, 2000.

DAVIN, L. B.; WANG, H-B.; CROWELL, A. L.; BEDGAR, D. L.; MARTIN, D. M.; SARKANEN, S.; LEWIS, N. G. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. **Science**, v. 275, n. 5298, p. 362-366, 1997.

DE JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 163-176, 2006.

DE LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S. M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, p. 1658-1661, June 2012.

DEBONSI, H. M.; MIRANDA, J. E.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Pest Management Science**, v. 63, p. 399-403, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, Apr. 2012.

DIAS, L. A. S.; SOUZA, C. A. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; ALMEIDA, C. M. V. C.; RESENDE, M. D. V.; RIOS-RUIZ, R. A.; AGUILAR, M. A. G.; PEREIRA, A. B.; CASCARDO, J. C. M. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper**: a model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. New York: Kluwer Academic, 2004.

EE, G. C.; LIM, C. M.; LIM, C. K.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; BONG C. F. Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum*. **Natural Products Research**, v. 23, n. 15, p. 1416-1423, 2009.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: _____. **Methods in enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. v. 182, p. 285-300.

FELIPPE, L. G. **Estudo metabolômico e proteômico em *Peperomia blanda* (Piperaceae)**. 2008. 279 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

- 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, Jan. 2008.
- FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 245-249, May 2011.
- FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 4208-4214, Apr. 2012.
- FILIPPINI, R.; PIOVAN, A.; BORSARINI, A.; CANIATO, R. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 115-119, 2010.
- FLACK, H. D.; BERNARDINELLI, G. The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. **Chirality**, v. 20, n. 5, p. 681-690, May 2008.
- FORD, J. D.; HUANG, K-S.; WANG, H-B.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside-hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1388-1397, 2001.
- FREEDMAN, T. B.; CAO, X.; DUKOR, R. K.; NAFIE, L. A. Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. **Chirality**, v. 15, p. 743-758, Oct. 2003.
- GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas e planejamento de análise de experimentos na melhoria da qualidade de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- GEETHA, N. P.; AMRUTHESH, K. N.; SHARATHCHANDRA, R. G.; SHETTY, H. S. Resistance to downy mildew in pearl millet is associated with increased phenylalanine ammonia lyase activity. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 3, p. 267-275, 2005.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, out. 2007.
- GOLD, D. H.; LEWIS, R. A. **Clinical eye atlas**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2011.

GORDO, S. M. M.; PINHEIRO, D. C.; MOREIRA, E. C. O.; RODRIGUES, S. M.; POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F.; SILVA, I.; RAMOS, R. T. J.; SILVA, A.; SCHNEIDER, H.; SILVA, W. A.; SAMPAIO, I.; DARNET, S. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 168-176, Sept. 2012.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1537-1570, 1972.

GOTTLIEB, O. R. Neolignans. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 35, p. 1-72, 1978.

GOVINDACHARI, T. R.; KUMARI, G. N. K.; PARTHO, P. D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2129-2131, 1998.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

HAO, Z.; CHARLES, D. J.; YU, L.; SIMOM, J. E. Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 4, p. 735-739, 1996.

HAWORTH, R. D. Natural resins. **Annual Reports on the Progress of Chemistry**, v. 33, p. 266-279, 1936.

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. **Protein eletrophoresis: applications guide**. San Francisco, 1994.

HOLZWARTH, G.; HSU, E. C.; MOSHER, H. S.; FAULKNER, T. R.; MOSCOWITZ, A. Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 1, p. 251-252, Jan. 1974.

JACKSON, D. E.; DEWICK, P. M. Cytotoxic lignans and their biosynthesis in *Podophyllum hexandrum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 33, p. 18-21, 1981.

JACKSON, D. E.; DEWICK, P. M. Biosynthesis of *Podophyllum* lignans. II. Interconversions of aryltetralin lignans in *Podophyllum hexandrum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1037-1042, 1984.

JANSON, J.; RYDÉN, L. **Protein purification: principles, high resolution methods and applications**. New York: VCH Publishers, 1989.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 403-416, 2004.

JING, X.; GU, W.; BIE, P.; REN, X.; PAN, X. Total synthesis of (±)-eusiderin k and (±)-eusiderin J. **Synthetic Communications**, v. 31, n. 6, p. 861-867, 2001.

- KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4466-4503, Nov. 2010.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, May 2007.
- KATO, M. J.; CHU, A.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 4, p. 583-591, 1997.
- KIM, H. J.; ONO, E.; MORIMOTO, K.; YAMAGAKI, T.; OKAZAWA, A.; KOBAYASHI, A.; SATAKE, H. Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 12, p. 2200-2209, 2009.
- KOULMAN, A. **A study of the biosynthesis, evolution, function and use of podophyllotoxin and related lignans**. Groningen: Stichting Regenboog Drukkerij, 2003.
- KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BAČKOR, M.; REPČÁK, M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. **Plant Science**, v. 172, n. 2, p. 393-399, Feb. 2007.
- LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, Nov. 2004.
- LEE, S. K.; CUI, B.; MEHTA, R. R.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[β]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 115, n. 3, p. 215-228, 1998.
- LEITE, A. C. C. F.; KATO, M. J.; SOARES, R. O. A.; GUIMARÃES, A. E.; SANTOS-MALLET, J. R.; CABRAL, M. M. O. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 517-521, 2012.
- LEME, G. M. **Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 10, p. 161-165, July 2009.

- LI, N.; WU, J-L.; SAKAI, J-I.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1421-1426, Dec. 2003.
- LI, N.; WU, J-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J-I.; BAI, L-M.; WANG, L-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 544-548, 2007.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press, 2007.
- LUDLEY, F. H.; RALPH, J. Improved preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 44, p. 2942, 1996.
- MANTOVANI, C.; CLEMENTE, E. Peroxidase and polyphenoloxidase activity in tomato in natura and tomato purée. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 91-97, 2010.
- MARSCHALL, S. R.; GREGANTI, M. A. **Netter medicina interna**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- MARTINS, R. C. C. **Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. Dc (Piperaceae)**. 2002. 145 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.
- MATSUDA, H.; KAWAGUCHI, Y.; YAMAZAKI, M.; HIRATA, N.; NARUTO, S.; ASANUMA, Y.; KAIHATSU, T.; KUBO, M. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by *Piper nigrum* leaf extract and its lignan constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1611-1616, 2004.
- McCREDIE, R. S.; RITCHIE, E.; TAYLOR, W. C. Constituents of *Eupomatia* species. The structure and synthesis of eupomatene, a lignan of novel type from *Eupomatia laurina* R. Br. Aust. **Journal of Chemistry**, v. 22, p. 1011-1032, 1969.
- MERRIL, C. R.; GOLDMAN, D.; KEUREN, M. L. Gel protein stains: silver stain. In: _____. **Methods in enzymology**: enzyme purification and related techniques. San Diego: Academic Press, 1984. v. 104, p. 441-451.
- MICHEL, J. L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; KRUNIC, A.; ORJALA, J.; VELIZ, M.; SONI, K. K.; SOEJARTO, D. D.; CACERES, A.; PEREZ, A.; MAHADY, G. B. Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of *Piper hispidum* Swingle (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 220-226, May 2010.
- MIYAUCHI, T.; OZAWA, S. Formation of (+)-eudesmin in *Magnolia kobus* DC. var. *borealis* Sarg. **Phytochemistry**, v. 47, p. 665-670, 1998.

MOHALLEM, D. F.; TAVARES, M.; SILVA, P. L.; GUIMARÃES, E. C.; FREITAS R. F. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 449-453, 2008.

MOLOG, G. A.; EMPT, U.; KUHLMANN, S.; VAN UDEN, W.; PRAS, N.; ALFERMANN, A. W.; PETERSEN, M. Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans. **Planta**, v. 214, n. 2, p. 288-294, 2001.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans: (IUPAC recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

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

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; AMBROSIO, 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, May 2009.

NAFIE, L. A. Vibrational circular dichroism: a new tool for the solution-state determination of the structure and absolute configuration of chiral natural product molecules. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 3, p. 451-466, Mar. 2008.

NAFIE, L. A.; DIEM, M.; VIDRINE, D. W. Fourier transform infrared vibrational circular dichroism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 2, p. 496-498, Jan. 1979.

NAUMANN, J.; SYMMANK, L.; SAMAIN, M-S.; MÜLLER, K. F.; EINHUIS, C.; DePAMPHILIS, C. W.; WANKE, S. Chasing the hare: evaluating the phylogenetic utility of a nuclear single copy gene region at and below species level within the species rich group *Peperomia* (Piperaceae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 357-376, 2011.

NAVES, A. F. **Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (Hrp) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, p. 409-415, 2003.

NOWIK, W.; BELLAISTRE, M. B-C.; TCHAPLA, A.; HERON, S. Separation of 9,10-anthraquinone derivatives: evaluation of functionalized stationary phases in reversed phase mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3636-3647, Apr. 2011.

- ODONNE, G.; BOURDY, G.; CASTILLO, D.; ESTEVEZ, Y.; LANCHATANGOA, A.; ALBAN-CASTILLO, J.; DEHARO, E.; ROJAS, R.; STIEN, D.; SAUVAIN, M. Ta'ta', Huayani: perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 149-158, Oct. 2009.
- OTTO, M. **Chemometrics**: statistics and computer application in analytical chemistry. 2nd ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2007.
- POLAVARAPU, P. L. Why is it important to simultaneously use more than one chiroptical spectroscopic method for determining the structures of chiral molecules? **Chirality**, v. 20, n. 5, p. 664-672, May 2008.
- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal Biogeography**, v. 33, p. 1266-1278, 2006.
- RAFFAELLI, B.; HOIKKALA, A.; LEPPALA, E.; WAHALA, K. Enterolignans. **Journal of Chromatography, B**, v. 777, n. 1/2, p. 29-43, 2002.
- RAHMAN, M. M. A.; DEWICK, P. M.; JACKSON, D. E.; LUCAS, J. A. Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1841-6, 1990.
- RAHMAN, M. A.; KATAYAMA, T.; SUZUKI, T.; NAKAGAWA, T. Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. elliptica I: isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 2, p. 161-167, 2007.
- REZENDE, A. A. A. de; SILVA, M. L. A.; TAVARES, D. C.; CUNHA, W. R.; REZENDE, K. C. S.; BASTOS, J. K.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H. H. R.; GUTERRES, Z. R.; SILVA, L. P.; SPANO, M. A. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1235-1241, 2011.
- RHO, M-C.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; CHOI, J-H.; KANG, J. Y.; KIM, K.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. Acat inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 899-903, Mar. 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; MELO, L. F. C.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004.
- SADLEJ, J.; DOBROWOLSKI, J. C.; RODE, J. E. VCD spectroscopy as a novel probe for chirality transfer in molecular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1478, May 2010.

SAKAMOTO, H. T.; GOBBO NETO, L.; CAVALHEIRO A. J.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1396-1401, 2005.

SAMAIN, M-S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRIGUEZ, 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, May 2010.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Methods in biotechnology**: natural product isolation. 2nd ed. Totowa: Human Press, 2006.

SARTORELLI, P.; BENEVIDES, P. J. C.; ELLENSOHN, R. M.; ROCHA, M. V. A. F.; MORENO, P. R. H.; KATO, M. J. Enantioselective conversion of *p*-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. **Plant Science**, v. 161, n. 6, p. 1083-1088, 2001.

SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 17-117, Jan. 2004.

SEIDEL, V.; WINDHOVEL, J.; EATON, G.; ALFERMANN, A. W.; ARROO, R. R. J.; MEDARDE, M.; PETERSEN, M.; WOOLLEY, J. G. Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. **Planta**, v. 215, n. 6, p. 1031-1039, 2002.

SIBI, M. P.; JOHNSON, M. D.; PUNNIYAMURTHY, T. Enantioselective synthesis of peperomins A, C, D, and analogs - examination of diastereoselective cuprate conjugate additions to N-enoyl-4-diphenylmethyl-2-oxazolidinones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 1546-1555, 2001.

SILVA, D. R.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 569-573, Mar. 2008.

ŞİŞECIOĞLU, M.; GÜLÇİN, I.; ÇANKAYA, M.; ATASEVER, A.; ŞEHİTOĞLU, M. H.; KAYA, H. B.; ÖZDEMİR, H. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 12, p. 1187-1196, 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

SOLIS, P. N.; OLMEDO, D.; NAKAMURA, N.; CALDERON, A. I.; HATTORI, M.; GUPTA, M. P. A new larvicidal lignan from *Piper fimbriulatum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 4, p. 378-381, 2005.

SOUZA, I. R. P.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N.; OLIVEIRA, A. C.; TEIXEIRA, F. F.; MACADAM, J. W.; PURCINO, A. A. C. Change in root apical protein and peroxidase activity in response to aluminum in tolerant and sensitive maize inbred lines. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p. 219-224, 2002.

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; PAN, J-J. The determination of the absolute configurations of chiral molecules using vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy. **Chirality**, v. 20, n. 5, p. 643-663, May 2008.

STOECKIGT, J.; KLISCHIES, M. Biosynthesis of lignans. Part I. Biosynthesis of arctiin (3) and phillyrin (5). **Holzforschung**, v. 31, n. 2, p. 41-44, 1977.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TOURE, A.; XU, X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2010.

TSUTSUI, C.; YAMADA, Y.; ANDO, M.; TOYAMA, D.; WU, J-L.; WANG, L.; TAKETANI, S.; KATAOKA, T. Peperomins as anti-inflammatory agents that inhibit the NF- κ B signaling pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 5, p. 4084-4087, 2009.

UMEZAWA, T.; DAVIN, L. B.; YAMAMOTO, E.; KINGSTON, D. G. I.; LEWIS, N. G. Lignan biosynthesis in *Forsythia species*. **Journal of the Chemical Society**, n. 20, p. 1405-1408, 1990.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS (Brasil). M. C. V. Bozinis; E. M. Lima; K. R. Rezende; V. Oliveira; M. J. Kato. **Composição farmacêutica antitumoral, citotóxica, indutora de apoptose, antiangiogênica, antimetastática e uso**. BR 2008004816, 7 nov. 2008, 31 mar. 2009.

VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 492-496, 2006.

VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 119-122, Nov. 2009.

VILLEGAS, L. F.; MARÇALO, A.; MARTIN, J.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. (+)-epi-alfa-bisbolols the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the *in vivo* wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1357-1359, Oct. 2001.

- WAARD, J. F.; STOFFERS, A. L.; LINDEMANN J. C. **Flora of Suriname**. Amsterdam: Brill Archive. 1986. v. 6.
- WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). **Plant Biology**, v. 8, p. 93-102, 2006.
- WILLFÖR, S.; HEMMING, J.; REUNANEN, M.; HOLMBOM, B. Phenolic and lipophilic extractives in *Scots pine* knots and stemwood. **Holzforschung**, v. 57, p. 359-372, 2003.
- WU, J-L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J-I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1656-1660, 2005.
- WU, J-L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J-I.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M.; TANG, W.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 790-794, 2006.
- XIA, Z. Q.; COSTA, M. A.; PROCTOR, J.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 537-549, 2000.
- XU, S.; LI, N.; NING, M-M.; ZHOU, C-H.; YANG, Q-R.; WANG, M-W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 247-250, 2006.
- YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162-168, abr. 2005.
- YE, Y.; CHOU, G-X; WANG, H.; CHU, J-H.; YU, Z-L. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 32-35, 2010.
- YUN, J-Y.; ROH, E.; SON, J-K.; LEE, S. H.; SEO, C-S.; HWANG, B. Y.; HAN, S-B.; KIM, Y. Effect of saucerneol D on melanin production in cAMP-elevated melanocytes. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p. 1339-1345, 2011.
- ZHANG, G-L.; LI, N.; WANG, Y-H. ZHENG, Y-T.; ZHANG, Z.; WANG, M-W. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 662-664, 2007.