UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

NÍDIA CRISTIANE YOSHIDA

Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoídico em espécies de *Piper*

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
22/07/2013

NÍDIA CRISTIANE YOSHIDA

Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoídico em espécies de *Piper*

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
2013

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

Yoshida, Nídia Cristiane
Y65an Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoidico em espécies de *Piper* / Nídia Cristiane Yoshida. – São Paulo, 2013.
199p.

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

1. Produtos naturais 2. Piperaceae : Farmacognosia I. T. II. Kato, Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoidico em espécies de *Piper*"

NÍDIA CRISTIANE YOSHIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
Orientador e Presidente

Profa. Dra. Sayuri Miyamoto
IQ - USP

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
UFMS

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
IQ - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
20 de setembro de 2013

Dedicatórias

Dedico este trabalho à minha família, Mário, Geni e Nadia,
ao meu amado Francis e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Massuo J. Kato, pela orientação, ensinamentos, incentivo e, sobretudo, pela amizade.

Ao prof. Dr. Norman G. Lewis e à Dra. Laurence Davin pela orientação, incentivo, apoio financeiro e pelo carinho com que me receberam durante o estágio na Washington State University.

Aos meus pais, Mário e Geni, e à minha irmã Nadia, pelo amor incondicional.

Ao Francis Paes Saffran, por todo amor, carinho e compreensão.

Aos amigos e colegas do LQPN: Adalberto, Alberto, Aline, Anderson, Augusto, Camila, Celso, Clécio, Edgard, Giovana, Harold, Homero, Joaquim, Karina, Lucas, Lydia, Marcílio, Mauro, Renata e Yasmin por toda ajuda, ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos meus queridos amigos Érica L. Santos, Cristiane Y. Kawasoko, Letícia Fanucchi, Thaís D. Biffano, Joaquim V. Marques, Márcio S. Duarte, Juan D. Rojas e Cláudia L. Cardenas pela amizade, companheirismo e por tornarem a jornada muito mais divertida.

À toda minha família e aos meus amigos, que me apoiaram e compartilharam inúmeros momentos importantes comigo.

Ao Dr. Carlos Colombo à Paula F. Lima, pela contribuição no desenvolvimento dos microssatélites utilizados neste estudo e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino, pela contribuição nas discussões sobre as análises filogenéticas e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos da Washington State University.

À Dra. Kye-won Kim, por todos os ensinamentos e pela amizade.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, Instituto de Ciências Biomédicas e Instituto de Botânica da USP, pelos ensinamentos e apoio.

Aos colegas e funcionários do Institute of Biological Chemistry, WSU, e ao Dr. John Cort, pelas análises de RMN.

Aos funcionários da Secretaria de pós-graduação do IQ-USP, Cibele, Milton, Emiliano, Marcelo e Paulo pela atenção e apoio ao longo de todo o processo.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de estudo e recursos financeiros.

"There is a grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved".

Charles Darwin, naturalista

The origin of species (1859).

RESUMO

Yoshida, N. C. **Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoídico em espécies de *Piper.*** 2013. 199p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A análise filogenética e reconstrução dos caracteres químicos em espécies de *Piper* indicou clados especializados na produção de ácidos benzoicos/cromenos, amidas e lignóides. Os perfis químicos das espécies foram determinados pela análise dos extratos brutos por RMN de ^{1}H combinados com análise de componente principal (PCA). Destacou-se a ocorrência de lignanas dibenzilbutirolactônicas e furofurânicas no clado Macrostachys, enquanto que para Schilleria foi observado o acúmulo preferencial de fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e benzofurânicas. Espécies de localidades distintas classificadas como *Piper solmsianum* apresentaram diferentes perfis químicos e características morfológicas. A análise da variabilidade química e genética por PCA e microssatélites, respectivamente, indicou a segregação das populações de acordo com o local de coleta e apontou o potencial para o uso conjunto das técnicas para distinguir os espécimens de *P. solmsianum.* As sequências dos genes acetiltransferase, propenilfenol sintase e proteína dirigente forneceram as primeiras informações sobre os genes envolvidos na biossíntese de lignanas/fenilpropanoides em *P. solmsianum*.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper*, *Piper solmsianum*, microssatélite, proteína dirigente, propenilfenol sintase.

ABSTRACT

Yoshida, N. C. **Phylogenetic analyses and phenylpropanoid metabolism in *Piper* species**. 2013. 199p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The phylogenetic analysis and reconstruction of chemical characters in *Piper* species distinguished clades specialized in the production of benzoic acids/chromenes, amides and lignoids. The chemical profiles of these species were determined by analysis of crude extracts by ^{1}H NMR combined with principal component analysis (PCA). It is remarkable that lignans of dibenzylbutyrolactone and furofurans type occur in Macrostachys while Schilleria contains dimers of propenylphenols such as tetrahydrofurans lignans and benzofuran neolignans. *Piper solmsianum* specimens collected from distinct sites showed differences in their morphology and chemical profiles. The assessment of chemical and genetic variability by PCA and microsatellites, respectively, indicated the segregation of populations according to the sampling site and pointed out to the potential use for the combined approaches to distinguish *P. solmsianum* specimens. The sequences of the genes acetyltransferase, propenylphenol synthase and dirigent protein provided the first information about the genes involved in the biosynthesis of lignans/phenylpropanoids in *P. solmsianum*.

Keywords: Piperaceae, *Piper*, *Piper solmsianum*, microsatellites, dirigent protein, propenylphenol synthase.

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

AcT	Acetiltransferase
BAHD	Família de enzimas aciltransferases
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
$CHCl_3$	Triclorometano (clorofórmio)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
d	dubleto
D_2O	Óxido de deutério
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
dl	dubleto largo
dt	duplo tripleto
EGS	Eugenol sintase
EM	Espectrometria de massas
EM-ESI	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
ESI	Ionização por electrospray
FPLC	*Fast Protein Liquid Chromatography*
HMBC	*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
HSQC	*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
IGS	Isoeugenol sintase
ITS	*Internal transcribed spacer*
J	Constante de acoplamento
LB	Luria-Bertani
LP	*Lycopersicum peruvianum*
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
m	multipleto
m/m	Relação massa/massa
m/z	Relação massa carga
MCMC	*Markov chain Monte Carlo*
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
MeOH	Álcool metílico
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NOESY	*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*
pb	Pares de bases
PAGE	Poliacrilamida
PC	*Principal component* (Componente principal)
PCA	*Principal components analysis* (Análise de componentes principais)
PCR	*Polymerase chain reaction* (Reação de polimerização em cadeia)

PD	Proteína dirigente
PhCFAT	*Petunia hybrida* coniferil álcool acetiltransferase
PIP	Família de enzimas redutases
PPS	Propenilfenol sintase
PsAcT	Acetiltranferase de *Piper solmsianum*
psbA-trnH	Codifica a *photosystem II protein D* - intron dentro dos *transfer RNA genes*
PsPD	Proteína dirigente de *P. solmsianum*
PsPPS	Propenilfenol sintase de *P. solmsianum*
RACE	*Rapid Amplification of cDNA Ends*
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Hum
qPCR	*Quantitative polymerase chain reaction*
rPsPD	Proteína dirigente recombinante de *P. solmsianum*
rPsPPS	Proteína propenilfenol sintase recombinante de *P. solmsianum*
s	singleto
SDS	Docecil sulfato de sódio
sl	singleto largo
t	tripleto
td	triplo dubleto
tr	Tempo de retenção
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
v/v	Relação volume/volume
δ	deslocamento químico em ppm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O primeiro diagrama da árvore da vida, desenhado por Charles Darwin em 1837, presente em seu caderno de esboços em *Transmutation of Species* (1837)	22
Figura 2. Árvore filogenética basal inferida a partir de análises comparativas das sequências de SSR rRNA (Woese, 2000; Woese et al., 1990)	23
Figura 3. Rede metabólica relacionada aos processos de regulação em linhagens de *Arabidopsis thaliana* (Thum et al., 2008)	30
Figura 4. Relação entre ordens e algumas famílias obtida da análise em larga escala de angiospermas. Os ramos apresentados são suportados por porcentagens acima de 50% de *bootstrap* e jacknife (The Angiosperm Phylogeny, 2009). As linhas pontilhadas destacam Magnoliide, ao qual pertence as Piperales	32
Figura 5. Proposta biossintética para a formação do isoeugenol e eugenol. PhCFAT: *Petunia hybrida* coniferil álcool acetiltransferase (Dexter et al., 2007), IGS1: Isoeugenol sintase, EGS1: Eugenol sintase (Koeduka et al., 2006)	39
Figura 6. Proposta dos mecanismos de redução e eliminação que levam à formação do eugenol e isoeugenol (Koeduka et al., 2006). **A**: representação geral de uma ligação de hidrogênio entre um hidrogênio ácido e um doador-receptor. **B**: representação geral da base que abstrai-doa o hidrogênio do grupo *p*-hidróxi do acetato de coniferila	40
Figura 7. Acoplamento enantiosseletivo que gera o (+)-pinoresinol em *Forsythia intermedia* (Davin and Lewis, 2000; Davin et al., 1997)	41
Figura 8. Alinhamento das sequências de nucleotídeos que codificam proteínas dirigentes em *Forsythia intermedia* e *Schizandra chinensis* (números de acesso AF210061 e HQ428029, respectivamente). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW)	67
Figura 9. Inserção das regiões de corte das enzimas de restrição *Eco*R1 e *Hind*III na sequência de PsPD. **A**: Amplificação do gene PsPD com regiões de corte. **B**: Plasmídeos pCR-4 para sequenciamento	76
Figura 10. Digestão com enzimas de restricão *Eco*R1 e *Hind*III. **A**: plasmídeo linear pART17. **B**: gene PsPD com os sítios de restrição	77
Figura 11. **A:** Placas de meio LP seletivo contendo as células de tomate 5 dias após o bombardeamento. **B:** Calos selecionados, após 21 dias de crescimento	79
Figura 12. Curva de calibração do padrão pinoresinol, obtida por CLAE-UV (280nm)	83
Figura 13. Cromatograma CLAE-UV (280 nm) do extrato das folhas de *P. solmsianum*, dos indivíduos 1 (**A**) e 2 (**B**) (método no **item 3.1**)	84
Figura 14. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) dos extratos obtidos com acetato de etila das folhas de dois indivíduos de *P. solmsianum.* **A**: indivíduo 1. **B**: indivíduo 2. Ambos espectros foram adquiridos nas mesmas condições de análise.	85
Figura 15. Árvore mais parcimoniosa baseada em ITS de sequências de *Piper*. *Saururus* e *Houttuynia* foram usadas como grupos externos. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Dígitos abaixo dos ramos: valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número total de caracteres da matriz: 716, dos quais 116 foram eliminados. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*: 1000; comprimento da árvore = 1412 passos; índice de consistência (CI) = 0,532; índice de homoplasia (HI) = 0,370; índice de retenção (RI) = 0,720; algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 282; 200 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1592. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportion invariant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 59000. Barras verticais (em negro) indicam seções do gênero *Piper* (Jaramillo *et al.,* 2001). Em cores, destaca-se as classes de metabólitos secundários produzidos pelas espécies (reconstrução de caracteres químicos **seção 4.1.1.**)	87
Figura 16. Reconstrução do caracter químico amida sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem amidas	89
Figura 17. Reconstrução dos caracteres químicos lignanas/fenilpropanoides sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem lignanas/fenilpropanoides	90

Figura 18. Reconstrução dos caracteres químicos ácidos benzoicos e cromenos sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem ácidos benzoicos e cromenos 91

Figura 19. Reconstrução do caracter químico alquenilfenol sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem os alquenilfenóis 92

Figura 20. Ampliação da seção Schilleria do gênero *Piper,* obtida da árvore filogenética gerada da análise da região de ITS (Apêndice 4, Figura 97). Os números 1 e 2 representam as coletas. A-D representam espécies de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades 99

Figura 21. Ampliação da seção Macrostachys do gênero *Piper,* obtida da árvore filogenética gerada da análise da região de ITS (Apêndice 4, Figura 97) 103

Figura 22. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* utilizados na análise filogenética 107

Figura 23. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* utilizados na análise filogenética. As estruturas representam exemplos de metabólitos que mais influenciaram a separação das espécies. As cores detacam nas estruturas os substituintes que contribuiram para a formação dos grupos. 107

Figura 24. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* pertencentes aos clados Macrostachys (linhas pontilhadas) e Schilleria (linhas cheias). As estruturas representam as classes de lignanas presentes nos grupos. Ar: substituinte aromático, frequentemente um grupo fenólico (1,4) com substituição nas posições 3, 4 e 5 109

Figura 25. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* pertencentes aos clados Macrostachys e Schilleria 109

Figura 26. Folhas de *P. solmsianum* coletadas no Brasil. **A**: *P. solmsianum* [K-1384 (CUASO, SP)] (Medeiros, 2006); **B**: *P. solmsianum* C. DC. [K-1368 (Ubatuba, SP)]; **C**: *P. solmsianum* [K-1329 (Teresópolis, RJ)] (Medeiros, 2006); *P. solmsianum* var. *solmsianum* **D**: [K-1316 (Itatiaia, RJ)] (Monteiro and Guimarães, 2009) 111

Figura 27. Mapa dos locais de coleta, com ampliação na região sudeste do Brasil. Destacado em vermelho: locais de coleta de *P. solmsianum*. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ) 111

Figura 28. Espectros de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) dos extratos brutos (fração orgânica) das folhas de espécimens de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ) 114

Figura 29. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **A**. Sigla e local de procedência: K-1384, CUASO - São Paulo 116

Figura 30. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **A**. Sigla e local de procedência: K-1384, CUASO - São Paulo 116

Figura 31. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **B**. Sigla e local de procedência: K-1368, Ubatuba - São Paulo 117

Figura 32. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **B**. Sigla e local de procedência: K-1368, Ubatuba - São Paulo 118

Figura 33. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **C**. Sigla e local de procedência: K-1329, Teresópolis, Rio de Janeiro 119

Figura 34. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **C**. Sigla e local de procedência: K-1329, Teresópolis, Rio de Janeiro 119

Figura 35. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **D**. Sigla e local de procedência: K-1316, Itatiaia, Rio de Janeiro 120

Figura 36. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **D**. Sigla e local de procedência: K-1316, Itatiaia, Rio de Janeiro 121

Figura 37. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum*. Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ) 124

Figura 38. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum.* Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ) 124

Figura 39. (I) Dendrograma da distância genética entre os 72 indivíduos de *P.solmsianum* definido pelo critério de agrupamento UPGMA, baseado no índice de Jaccard, gerado pelo software NTSYS. **(II)** Gráfico de barras indicando o número de *clusters* obtido pelo software *Structure*. Indivíduos são representados pelas barras verticais. Indivíduos com as mesmas cores indicam que pertencem ao mesmo *cluster*. Gráfico em verde: população formada pelos indivíduos das coletas das regiões de Teresópolis e Itatiaia, RJ (grupos **C** [K1329] e **D** [K1316]); Gráfico em vermelho: população formada pelos indivíduos da coleta da região de Ubatuba, SP (grupo **B** [k1368]); Gráfico em azul: população formada pelos indivíduos da coleta da região da CUASO, SP (grupo **A** [k1384]).(*): Indica indivíduos coletados como replitcatas 128

Figura 40. Biogênese proposta para a formação do *E*-5-metóxi-isoeugenol em *P. solmsianum* 132

Figura 41. Biossíntese proposta para a (-)-grandisina em *P. solmsianum* 132

Figura 42. Géis de agarose 0,8% do amplificado com iniciadores para PsAcT. Os números de 1-12 indicam os gradientes de temperatura em cada uma das linhas do termociclador (Tabela 9). As letras que seguem os números respresentam o conjunto de iniciadores utilizados: a) AcT Dir1 + AcT Rev1. b) AcT Dir2 + AcT Rev1. As setas indicam as bandas recuperadas do gel 133

Figura 43. Gel de agarose 0,8% das bandas recuperadas da amplificação da região AcT com os iniciadores AcT Dir1+Rev1 e AcT Dir2+AcT Rev1, clonadas no vetor pCR-4 134

Figura 44. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para a sequência parcial do gene acetiltransferase de *P. solmsianum* (PsAcT-1). Data de acesso: 26/06/2013 134

Figura 45. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para sequência parcial do gene acetiltransferase de *P. solmsianum* (PsAcT-2). Data de acesso: 26/06/2013 135

Figura 46. Alinhamento dos fragmentos do gene acetiltransferase (AcT) de *P. solmsianum* com a sequência da enzima coniferil álcool aciltransferase (*Petunia hybrida,* n° acesso ABG75942). PsAcT: região do gene acetiltransferase amplificado de *P. solmsianum* (os números 1 e 2 indicam sequências obtidas com diferentes iniciadores). A seta dupla indica um dos motivos conservados, HxxxD, característicos da família de BAHD aciltransferases (acesso dia 14/08/2012). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW). 136

Figura 47. A: Gel de agarose 0,8% com o gene completo PsPPS amplificados nas reações 1 e 2. **B**: Gel de agarose das colônias contendo o inserto de PPS da reação 1 (acima) e 2 (abaixo) 137

Figura 48. Sequência completa do cDNA que codifica a proteína propenilfenol sintase de *P. solmsianum* 138

Figura 49. Alinhamento da sequência de propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS) com a isoeugenol sintase de *Petunia hybrida* (n° de acesso: Q15GI3). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clutalW) 139

Figura 50. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para a sequência do gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS). Data de acesso: 26/06/2013 140

Figura 51. Gel (SDS-PAGE) com o perfil de proteínas expressas das colônias de *E. coli* modificadas contendo o gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* PsPPS. **Linhas A-D**: Colônias selecionadas. **S:** fração de proteínas solúveis. **I:** fração de proteínas insolúveis. As flechas indicam a banda de tamanho equivalente ao esperado para a proteína recombinante rPsPPS. 141

Figura 52. Géis (SDS-PAGE) das frações do extrato proteico das colônias **C** e **D** de *E. coli* modificadas contendo o gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS). **(I)**: frações oriundas do primeiro fracionamento cromatográfico; **(II)**: frações oriundas do segundo fracionamento cromatográfico, ambos em coluna de afinidade de níquel. A seta branca indica a banda purificada. 141

Figura 53. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do substrato acetato de coniferila, utilizando o método 1 (**item 3.1**) 142
Figura 54. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do padrão eugenol, utilizando o método 1 (**item 3.1**) 143
Figura 55. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do padrão isoeugenol, utilizando o método 1 (**item 3.1**) 143
Figura 56. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) da reação controle, na ausência de rPsPPS, utilizando o método 1 (**item 3.1**). **S**: substrato (acetato de coniferila) 143
Figura 57. Cromatograma UPLC-UV (280nm) obtido da conversão enzimática do acetato de coniferila em isoeugenol, mediada pela enzima rPsPPS, utilizando o método 1 (**item 3.1**). **S**: substrato da reação (acetato de coniferila). **P**: produto da conversão (isoeugenol) 144
Figura 58. Proposta da conversão enzimática mediada pela enzima propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS) 144
Figura 59. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para sequência do gene de proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD). Data de acesso: 26/06/2013 145
Figura 60. Sequência completa do cDNA que codifica a proteína dirigente de *P. solmsianum* 146
Figura 61. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD) com as proteínas dirigentes obtidas de *Forsythia intermedia* (AF210061, 70% de similaridade) e de *Schizandra chinensis* (HQ428029, 70% de similaridade). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clutalW) 147
Figura 62. PCR qualitativa da expressão do gene de proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD) nos calos bombardeados 148
Figura 63. Gel (SDS-PAGE) das frações purificadas da proteína rPsPD. **A:** Frações provenientes da coluna Mono-S. **B:** Frações provenientes da coluna Superdex-75. As setas indicam bandas de proteínas com tamanho equivalente ao esperado para a proteína rPsPD. 149
Figura 64. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do substrato álcool coniferílico, utilizando o método 2 (**item 3.1**) 150
Figura 65. Cromatograma UPLC -UV (280 nm) da reação controle, na ausência de rPsPD, utilizando o método 2 (**item 3.1**) 150
Figura 66. Cromatograma UPLC-UV (280nm) da conversão enzimática do álcool coniferílico em pinoresinol, mediada pela enzima rPsPD, utilizando o método 2 (**item 3.1**). **S**: substrato da reação (álcool coniferílico). **P**: produto da conversão (pinoresinol) 151
Figura 67. Árvore filogenética baseada em dados de seqüências de nucleotídeos do gene de proteína dirigente. Dígitos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*: 1000; comprimento da árvore = 574 passos; índice de consistência (CI) = 0,533; índice de homoplasia (HI) = 0,499; índice de retenção (RI) = 0,620 algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 135; 114 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas=603. Destacam-se em cores as famílias as quais pertencem os táxons analisados 153
Figura 68. Metabólitos secundários acumulados por *P. solmsianum* 155
Figura 69. Comparação do perfil químico folhas jovens e maduras dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum* 156
Figura 70. Comparação entre o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas em diferentes estágios de desenvolvimento dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum.* **A:** propenilfenol sintase. **B:** proteína dirigente. 156
Figura 71. Comparação do perfil químico em diferentes tecidos dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum* 158
Figura 72. Comparação entre o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas em diferentes em diferentes tecidos dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum.* **A:** proteína dirigente e **B:** propenilfenol sintase 158
Figura 73. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens A1-A7 (K-1384) 180
Figura 74. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens A8-A15 (K-1384) 181
Figura 75. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens A16 (K-1384) 182

Figura 76. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens B1-B7 (K-1368) 183
Figura 77. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens B8-B15 (K-1368) 184
Figura 78. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens C1-C7 (K-1329) 185
Figura 79. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens C8-C14 (K-1329) 186
Figura 80. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens D1-D6 (K-1316) 187
Figura 81. Espectros de RMN de ^1H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens D7-D13 (K-1316) 188
Figura 82. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384) 189
Figura 83. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384) 189
Figura 84. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384) 190
Figura 85. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen C1 (K1329) 190
Figura 86. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen C1 (K1329) 191
Figura 87. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen C1 (K1316) 191
Figura 88. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen D1 (K1316) 192
Figura 89. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen D1 (K1316) 192
Figura 90. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen D1 (K1316) 193
Figura 91. Diagrama de *scores* dos dados de RMN ^1H (fração hidroalcoólica) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética 194
Figura 92. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN ^1H (fração hidroalcoólica) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética 194
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) dos extratos brutos (fração aquosa) das folhas de espécimens de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ). 195
Figura 94. Diagrama de *scores* dos dados de RMN ^1H (fração aquosa) de espécimens de *P. solmsianum*. Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ) 196
Figura 95. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN ^1H (fração aquosa) de espécimens de *P. solmsianum.* Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ) 196
Figura 96. Árvore mais parcimoniosa baseada em *psbA-trnH* de 16 sequências de *Piper*. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Matrix com 314 caracteres. Comprimento da árvore = 62; *Bootstrap* replication = 1000; Busca: heuristica; Número de caracteres informativos: 42; Caracteres constantes: 263; Índice de consistência (CI) = 0,9032; Índice de homoplasia (HI) = 0,0968, Índice de retenção (RI) = 0,6667; Algoritmo Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR). Score das melhores árvores encontradas: 62 197
Figura 97. Árvore mais parcimoniosa baseada em ITS de sequências de *Piper*. *Saururus* e *Houttuynia* foram usadas como grupos externos. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Dígitos abaixo dos ramos: valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número de caracteres totais da matriz: 716, dos quais 116 foram eliminados. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*: 1000; comprimento da árvore = 1603 passos; índice de consistência (CI) = 0,4716; índice de homoplasia (HI) = 0,528; índice de retenção (RI) = 0,746; algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 297; 185 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1603. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportion invariant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 133000. Barras verticais indicam seções do gênero *Piper* (Jaramillo and Manos, 2001) 198

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores ITS e *psbA-trnH*	49
Tabela 2. Espécies de *Piper* utilizadas nas análises filogenéticas	51
Tabela 3. Espécies de *Piper* cujas sequências de ITS foram obtidas do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information)	53
Tabela 4. Distribuição das classes de metabólitos secundários em espécies de *Piper* selecionadas. (**+**) : presença. (**–**) **:** ausência/não detectado. **LQPN** – espécies em estudo no Laboratório de Química de Produtos Naturais – IQ-USP	56
Tabela 5. Espécies de *Piper* analisadas por RMN de ^{1}H e por PCA	60
Tabela 6. Características morfológicas das espécies de *P. solmsianum*	62
Tabela 7. Iniciadores utilizados para análise de microssatélites em *P. solmsianum*	63
Tabela 8. Iniciadores utilizados para amplificação do gene AcT em *P. solmsianum*	69
Tabela 9. Temperaturas de cada uma das linhas do termociclador	69
Tabela 10. Gradiente de eluição utilizado na FPLC	80
Tabela 11. Sequência dos iniciadores para PsPPS e PsPD utilizados na qPCR	82
Tabela 12. Metabólitos secundários das espécies de *Piper* pertencentes ao clado Schilleria	99
Tabela 13. Metabólitos secundários das espécies de *Piper* pertencentes ao clado Macrostachys	103
Tabela 14. Áreas relativas dos picos obtidos da análise por UPLC-UV (280 nm) da reação de conversão do álcool coniferílico em pinoresinol na presença de rPsPD	151

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **21**

1.1. A evolução das plantas 21
1.1.1. Teoria da evolução: Seleção natural e a Origem das espécies 21
1.1.2. A conquista dos ambientes terrestres e a síntese de metabolitos 24
1.1.3. O abominável mistério das Angiospermas 25
1.1.4. Metabolismo secundário 25
1.2. FIlogenia e quimiotaxonomia 27
1.2.1. Angiospermas Basais e Piperaceae 31
1.3. Metabolismo secundário em Piperaceae 34
1.4. Metabolismo fenilpropanoídico 34
1.4.1. Genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanoides e lignanas 36
1.4.1.1. Aciltransferases 38
1.4.1.2. Propenilfenol sintases 39
1.4.1.3. Proteína dirigente 40

2. OBJETIVOS **43**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **45**

3.1. Materiais e generalidades metodológicas 45
3.2. Material Vegetal 47
3.3. Filogenia molecular 47
3.3.1. Preparo do material vegetal 47
3.3.2. Extração de DNA 48
3.3.3. Quantificação do DNA e RNA 49
3.3.4. Amplificação das regiões ITS e *psbA-trnH* e sequenciamento 49
3.3.5.Análise filogenética 50
3.3.6. Alinhamento da matriz de dados moleculares 55
3.3.7. Máxima Parcimônia 55
3.3.8. Análise Bayesiana 55
3.3.9. Reconstrução de caracteres químicos 55
3.4. Preparo dos extratos para análise por RMN de ^{1}H 59
3.5. Análise de componente principal 61
3.6. Análise da variabilidade química e genética em *P. solmsianum* 62
3.6.1.Perfil químico de *P. solmsianum* por RMN de ^{1}H 62
3.6.2.Perfil genético e de *P. solmsianum* por análise de microssatélites 63
3.7. Identificação dos genes 64
3.7.1. Materiais, reagentes e enzimas 64
3.7.2. Construção dos oligonucleotídeos 66
3.7.3. Estratégias para amplificação dos genes 67
3.7.4 Acetiltransferase (AcT) 68
3.7.4.1. Teste dos iniciadores 69
3.7.4.2. Clonagem e sequenciamento dos amplificados AcT 69
3.7.5. Propenilfenol sintase (PsPPS) 70
3.7.5.1. Construção do vetor para expressão heteróloga do gene PsPPS 71

3.7.5.2. Seleção das bactérias contendo os plasmídeos recombinantes 71
3.7.5.3. Expressão heteróloga da proteína recombinante rPsPPS 72
3.7.5.4. Cromatografia de afinidade em resinal de níquel 73
3.7.5.5. Ensaio de conversão enzimática com rPsPPS 74
3.7.6. Proteína dirigente 74
3.7.6.1. Construção do vetor para expressão heteróloga do gene PsPD 75
3.7.6.2. Biobalística 77
3.7.6.3. Purificação de proteína rPsPD 80
3.7.6.4. Ensaio de conversão enzimática com rPsPD 81
3.7.6.5. Amplificação do gene de proteína dirigente em espécies de *Piper* 81
3.7.6 6. Perfil químico e de expressão dos genes PsPPS e PsPD 82

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 86

4.1. Análise filogenética e distribuição dos principais metabólitos secundários em espécies de *Piper* 86
4.1.1. Reconstrução dos caracteres químicos em *Piper* 88
4.1.2. Distribuição de lignóides nos clados Schilleria e Macrostachys 97
4.1.3. Análise de componente principal das espécies brasileiras de *Piper* utilizadas na análise filogenética 105
4.1.4. Análise de componente principal das espécies de *Piper* pertencentes aos clados Schilleria e Macrostachys 108
4.2. Variabilidade química e genética em *Piper solmsianum* 110
4.2.1. Diferenças morfológicas e químicas entre as populações de *P. solmsianum* 110
4.2.2. Distribuição geográfica de *P. solmsianum* 110
4.2.3. Composição química e atividades biológicas 112
4.2.4. Variabilidade intra-populacional em *P. solmsianum* 115
4.2.4.1. Grupo A (CUASO, SP, sigla K-1384) 115
4.2.4.2. Grupo B (Ubatuba, SP, sigla K-1368) 117
4.2.4.3. Grupo C (Teresópolis, RJ, sigla K-1329) 118
4.3.4.4. Grupo D (Itatiaia, RJ, sigla K-1316) 120
4.2.5. Análise inter-populacional em *P. solmsianum* 121
4.2.6. Variabilidade genética utilizando marcadores de microssatélites (*simple sequences repeats* - SSR) 125
4.3. Genes envolvidos na biossíntese de lignóides. 131
4.3.1. Acetiltransferase em *P. solmsianum* (PsAcT) 133
4.3.2. Propenilfenol sintase em *P. solmsianum* (PsPPS) 137
4.3.2.1. Expressão heteróloga, seleção das colônias e purificação da proteína recombinante rPsPPS 139
4.3.2.2. Reação de conversão enzimática do precursor isoeugenol pela enzima recombinante PsPPS 142
4.3.3. Proteína dirigente em *P. solmsianum* (PsPD) 145
4.3.3.1. Análise da expressão do gene PsPD e seleção dos calos pós-bombardeamento 147
4.3.3.2. Purificação da proteína recombinante PsPD 148
4.3.4. Análise das relações filogenética baseada na região do gene de proteína dirigente em espécies de *Piper* 152

4.3.5. Análise comparativa entre o perfil metabólico e o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas *P. solmsianum* 154

5. CONCLUSÕES 160

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 162

APÊNDICE 1 180

APÊNDICE 2 189

APÊNDICE 3 194

APÊNDICE 4 197

ANEXO 1 200

1. INTRODUÇÃO

1.1. A evolução das plantas

1.1.1. Teoria da evolução: Seleção natural e a Origem das espécies

A compreensão da natureza e dos mecanismos que regem seu funcionamento, organização e os meios pelos quais é possível moldá-los sempre estiveram entre os pilares do pensamento e da realização cientifica.

A maneira como a origem da vida e a posição do homem no mundo e no universo eram encarados foi profundamente reformulada após a mais audaciosa e controversa revelação do século IXX proposta pelo naturalista Charles R. Darwin em 1859. Darwin, em seu famoso livro "A origem das espécies" [*On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*] (Darwin, 1859), descreveu suas observações a bordo do H.M.S. *Beagle* (1831-1836) em uma viagem ao redor do mundo e propôs um mecanismo no qual as espécies evoluiriam e se diversificariam através de um fenômeno de natureza populacional. A esse fenômeno Darwin denominou seleção natural, onde as variações herdáveis positivas ou neutras propagaram-se nas populações conforme as vantagens adaptativas conferidas por determinados ambientes. O efeito cumulativo dessas variações origina a diversidade biológica.

O amadurecimento da idéia e observações de Darwin naturalmente levou às primeiras propostas para a origem da vida a partir de um organismo original (ancestral comum), que através dos processos evolutivos, deu origem as demais formas de vida (Figura 1).

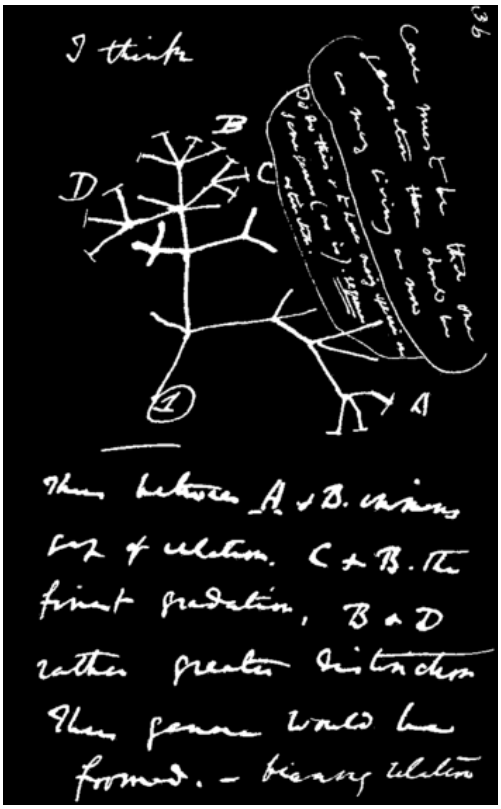


Figura 1. O primeiro diagrama da árvore da vida, desenhado por Charles Darwin em 1837, presente em seu caderno de esboços em *Transmutation of Species* (1837).

Desde então, os avanços nas técnicas moleculares têm gerado uma grande quantidade de informações genéticas sobre grupos taxonômicos que com o emprego da bioinformática permitiram organizar e comparar estas informações, redesenhando a história evolutiva dos seres vivos. Estudos pioneiros empregando dados moleculares foram realizados por Woese e cols. (Woese et al., 1990) utilizando o gene que codifica para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (SSU rDNA, também chamado 18S nos eucariotos) e transformaram a visão da árvore da vida em um sistema de 3 grandes domínios: Bacteria, Archaea e Eucaria (Figura 2).

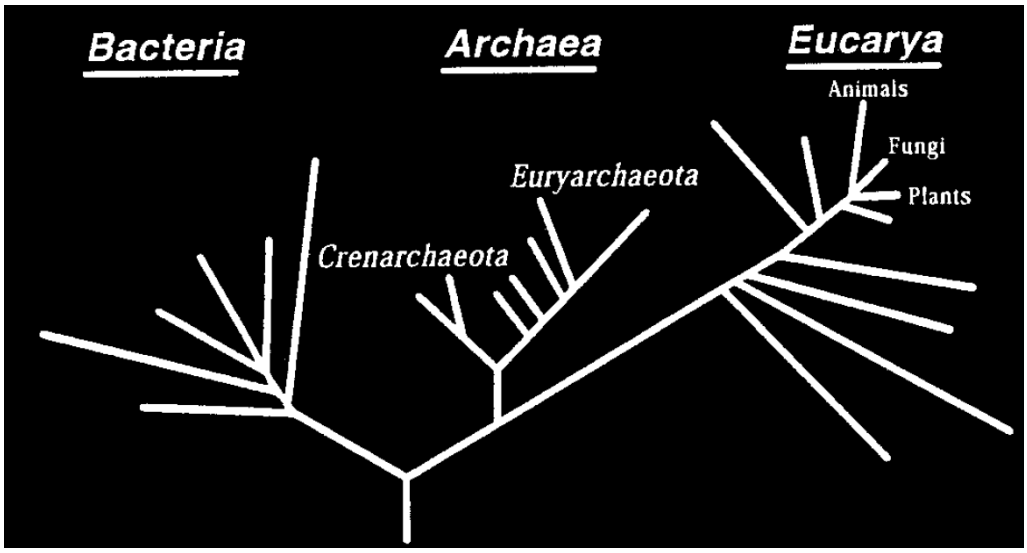


Figura 2. Árvore filogenética basal inferida a partir de análises comparativas das sequências de SSR rRNA (Woese, 2000; Woese et al., 1990).

A relação entre os três domínios ainda permanece alvo de muitas discussões, sendo que com o desenvolvimento de novas técnicas de processamento de dados e aquisição de informações de genomas completos, os pesquisadores tem se dedicado a empregar toda essa informação para organizar com máxima fidedignidade a história evolutiva dos seres vivos (Ding et al., 2008; Doolittle and Bapteste, 2007; Koonin and Wolfm, 2012; Woese, 2000).

Um dos mais intrigantes nodos da árvore da vida tem sido a origem dos eucariotos. A rápida diversificação das principais linhagens dos eucariotos ocorreu em torno de 2 bilhões de anos atrás e pode ter sido ocasionada por diversos fatores, tais como alterações ambientais. Por exemplo, o aumento do oxigênio da atmosfera e o soerguimento dos continentes, resultando num aumento da exposição à radiação UV que pode ter atingido patamares que possibilitaram a ocupação de novos nichos e a especiação (Zimmer, 2009).

1.1.2. A conquista dos ambientes terrestres e a síntese de metabólitos

A origem e a evolução das plantas terrestres em meados da era Paleozoica (aproximadamente entre 480 a 360 milhões de anos atrás) foi um evento extremamente importante na história da vida, levando à evolução de organismos terrestres e à modificação do ambiente global, uma vez que o surgimento do processo fotossintético alterou completamente a atmosfera, causando um enorme impacto na história do planeta e redirecionando a evolução dos seres vivos (Kenrick and Crane, 1997; Matioli, 2001).

Estudos filogenéticos apontam a origem das plantas terrestres a partir das algas verdes *Charophycean* (Bennici, 2008; Kranz et al., 1995). Elas possuem atributos biossintéticos que são extensamente expressos entre as plantas terrestres, incluindo a capacidade de produzir esporopoletina, cutina e compostos fenólicos. A transição do meio aquoso para o gasoso expôs as plantas a novas condições físicas que resultaram na chave para as mudanças fisiológicas e estruturais. Importantes vias metabólicas envolvidas na formação de ligninas, flavonóis, cutinas e hormônios nas plantas vasculares provavelmente evoluíram de elementos pré-existentes do metabolismo primário nas algas *Charophycean* e briófitas (Crane et al., 1995; Kenrick and Crane, 1997). A internalização de órgãos com funções vitais combinada com o desenvolvimento de superfície exteriores impermeáveis foram as primeiras respostas à vida ao ambiente terrestre. Assim, uma série de inovações nas plantas vasculares, como o surgimento da lignina, o incremento na capacidade de sustentação e de condução de seiva elaborada foram críticas para o desenvolvimento de plantas de grande porte, sendo que este desenvolvimento foi estimulado pela competição por luz.

1.1.3. O abominável mistério das Angiospermas

Em uma carta a J. D. Hooker datada de 22 de julho de 1879, Charles Darwin descreveu o rápido crescimento e diversificação das angiospermas como um "mistério abominável" (Davies et al., 2004). As Angiospermas surgiram há cerca de 90-130 milhões de anos e constituíram-se na principal diversificação vegetal do planeta, com um número estimado de 250 mil espécies (Crane et al., 1995; Crane et al., 2004; Friis et al., 2010; Labandeira et al., 1994). A multiplicidade das espécies vegetais resulta também na diversidade estrutural de metabólitos secundários, com mais de 200 mil metabólitos descritos, incluindo derivados fenólicos, isoprenoides, alcaloides, policetídios, dentre outros (Firn and Jones, 2003; Maia and Andrade, 2007).

1.1.4. Metabolismo secundário

As plantas são organismos de fundamental importância para sustentar a vida na Terra, pois fornecem oxigênio, alimentos, energia e muitos dos valiosos metabólitos. Os metabólitos são classificados em duas grandes classes: primários e secundários. Os metabólitos primários, tais como açúcares, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos, estão presentes em todos os organismos e desempenham um papel metabólico essencial para manutenção de processos vitais. Os metabólitos secundários, erroneamente chamados assim por não aparentarem participar diretamente no crescimento e desenvolvimento, são frequentemente distribuídos de maneira limitada entre grupos taxonômicos pelo reino vegetal. Apesar de sua notória complexidade estrutural e vias biossintéticas específicas, os produtos naturais foram considerados como biologicamente insignificantes e historicamente receberam pouca atenção por parte dos biologistas de plantas e

bioquímicos. Já os químicos orgânicos têm demonstrado um grande interesse pelos metabólitos secundários e têm investigado suas estruturas químicas extensivamente desde meados de 1850 (Croteau et al., 2000). O estudo dos produtos naturais estimulou o desenvolvimento de técnicas de separação, abordagens espectroscópicas para a elucidação estrutural, e metodologias sintéticas que vieram a se constituir nos pilares da química orgânica contemporânea. Produtos naturais estão relacionados à defesa e adaptação das plantas ao meio ambiente e assumiram funções como atraentes de polinização, dipersão de sementes e outras funções aleloquímicas (Bourgaud et al., 2001; Dodds, 2010; Jones et al., 1991). Além disso, uma gama deles apresenta grande utilidade como corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, ceras, agentes flavorizantes, perfumes e drogas (Arif et al., 2009; Cordell et al., 2007; Macías et al., 2008; Newman and Cragg, 2007; Newman and Cragg, 2012), movimentando cifras expressivas.

Entretanto, as barreiras que separavam a química e a biologia tornaram-se difusas, e as pesquisas em produtos naturais têm sido expandidas de modo a abrigar uma abordagem multidisciplinar que faz uso de um leque de ferramentas que permeiam os princípios da química orgânica, bioquímica, biologia molecular, bioinformática, entre outros. Essa nova abordagem tem resultado em uma visão holística de como os organismos vivos produzem, acumulam, ativam vias metabólicas e são estimulados a usar seu potencial na construção dos metabólitos secundários. Desta maneira e, somente assim, os esforços em analisar e avaliar a gigantesca biodiversidade do nosso planeta resultarão num domínio que contribuirá para direcionar o seu uso e para sua preservação.

1.2. Filogenia e quimiotaxonomia

Avanços substanciais foram observados em taxonomia molecular nos quais diversas regiões do DNA têm sido empregadas para o estabelecimento de árvores filogenéticas em Angiospermas (Crane et al., 2004; Friis et al., 2010; Leitch et al., 2005).

Atualmente, consórcios de pesquisadores voltados para a geração e análise de dados moleculares têm trazido grandes avanços nas análises filogenéticas. Um bom exemplo é o *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), que consiste em um grupo de pesquisadores voltados a classificação das Angiospermas baseado em dados moleculares (The Angiosperm Phylogeny, 2009). A cada ano, novas informações são geradas e adicionadas a cada atualização da classificação gerada pelo APG. Esta empreitada tem permitido reconstruir com maior veracidade a história evolutiva deste grande grupo que têm sido considerado um desafio desde Darwin (Davies et al., 2004). Tem-se assim, de um lado, um conjunto de técnicas moleculares que pode ser utilizado nos estudos de filogenia e, por outro, a disponibilidade de técnicas para análise metabolômica (Fridman and Pichersky, 2005; Kim et al., 2010a; Moco et al., 2006; Rochfort, 2005; Verpoorte et al., 2007) e o próprio conhecimento sobre a estrutura dos metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários são amplamente distribuídos no reino vegetal e geralmente apresentam padrões específicos e, portanto, o compartilhamento de substâncias ou de substâncias biogeneticamente relacionadas pode conter uma informação valiosa nos relacionamentos filogenéticos. Na era molecular da sistemática, o estudo comparativo da química oferece uma importante ferramenta para estudos filogenéticos, além dos caracteres morfológicos e anatômicos.

A análise filogenética e sistemática de plantas foi tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos (macro- e microscópicos). O uso de estruturas moleculares de metabólitos secundários, a quimiossistemática, tem sido considerado como ferramenta auxiliar em função da presença característica de uma determinada classe de metabólitos dentro de um clado. O uso da quimiossistemática permitiu o desenvolvimento de novos sistemas de classificação que passaram a considerar a ocorrência de metabólitos secundários (Dahlgren, 1980; Grayer et al., 1999; Wink, 2003; Wink and Waterman, 1999). Uma análise numérica, no qual foram estabelecidos índices de oxidação das substâncias e de especialização, introduzidos por Gottlieb, tornou a quimiossistemática menos dependente do enfoque da simples presença/ausência, e permitiu sugerir correlações de tendência evolutiva das vias metabólicas (Gottlieb, 1984; Gottlieb, 1992). O emprego das técnicas filogenéticas em associação com a quimiossistemática tem possibilitado inferências sobre os aspectos evolutivos relacionados ao desenvolvimento de vias biossintéticas bem determinadas (Wink, 2003; Wink and Waterman, 1999). No entanto, os aspectos sobre a regulação do metabolismo secundário, incluindo o estudo de genes e enzimas associadas à sua biossíntese ainda carecem de investigações sistemáticas.

Um excelente exemplo da utilização da composição química junto a filogenia é o caso dos liquens (associação de fungos com algas). O emprego da taxonomia em liquens iniciou-se em meados dos anos de 1850, com a introdução de testes químicos colorimétricos. Atualmente, junto à filogenia utilizando dados de DNA, rotineiramente emprega-se informações de composição química na identificação e classificação dos liquens, e esta pode ser informativa em todos os níveis taxonômicos, de populações até ordem (Alcântara et al., 2007; Schmitt and Lumbsch, 2004).

O monumental conjunto de trabalhos "Chemotaxonomie der Pflanzen", descritos entre os anos de 1962-2001 por Hegnauer, apresentou uma revisão dos dados da literatura sobre a distribuição dos metabólitos primários e secundários em Asteridae e inferências filogenéticas baseadas em perfis químicos. Estes dados foram re-analisados no trabalho de Grayer (Grayer et al., 1999), que apresenta a comparação entre a relação de parentesco das espécies de Asteridae com base nos seus perfil químicos e com base nas análises cladísticas do gene *rbc*L (DNA genômico). Os resultados desta comparação demonstraram que as sequências de DNA são os caracteres de escolha para descrever a relação de parentesco entre as espécies. No entanto, a adição de informações e dados de outras áreas, como químicos e morfológicos, foi fundamental tanto para dar maior suporte às análises genéticas como para esclarecer casos de clados não resolvidos. Ambas as áreas do conhecimento devem ser utilizadas conjuntamente de modo a gerar um modelo que mais se aproxime da verdadeira história evolutiva dos organismos.

Com o aumento estrondoso de informações obtidas de várias áreas, está sendo adotada uma visão dos organismos como um todo, funcionando em um sistema metabólico que responde e interage com estímulo externos através de um sistema complexo de redes metabólicas (Figura 3). Somando-se as informações de genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma, o panorama do funcionamento do organismo pode ser mapeada de maneira a determinar quais alterações são responsáveis pelo "*reactome*", termo utilizado para descrever de maneira holística como os organismos reagem aos estímulos e quais mecanismo são ativados para tal (Ding et al., 2008; Fiehn, 2001; Lange, 2006; Tsesmetzis et al., 2008). Tal abordagem não significa que a descrição individual e reducionista não seja importante, afinal, é ela que permite alimentar os bancos de dados, dar consistência

estatística as análises e delimitar linhas de tendências quando se trata de estudos relacionados à evolução e pesquisa racional. A pesquisa em produtos naturais deixou de ser uma área com foco apenas nos metabólitos, e a reunião de todas essas informações levará uma era de entendimento dos mecanismos que regem a vida e os serem vivos sem precedentes na história da ciência.

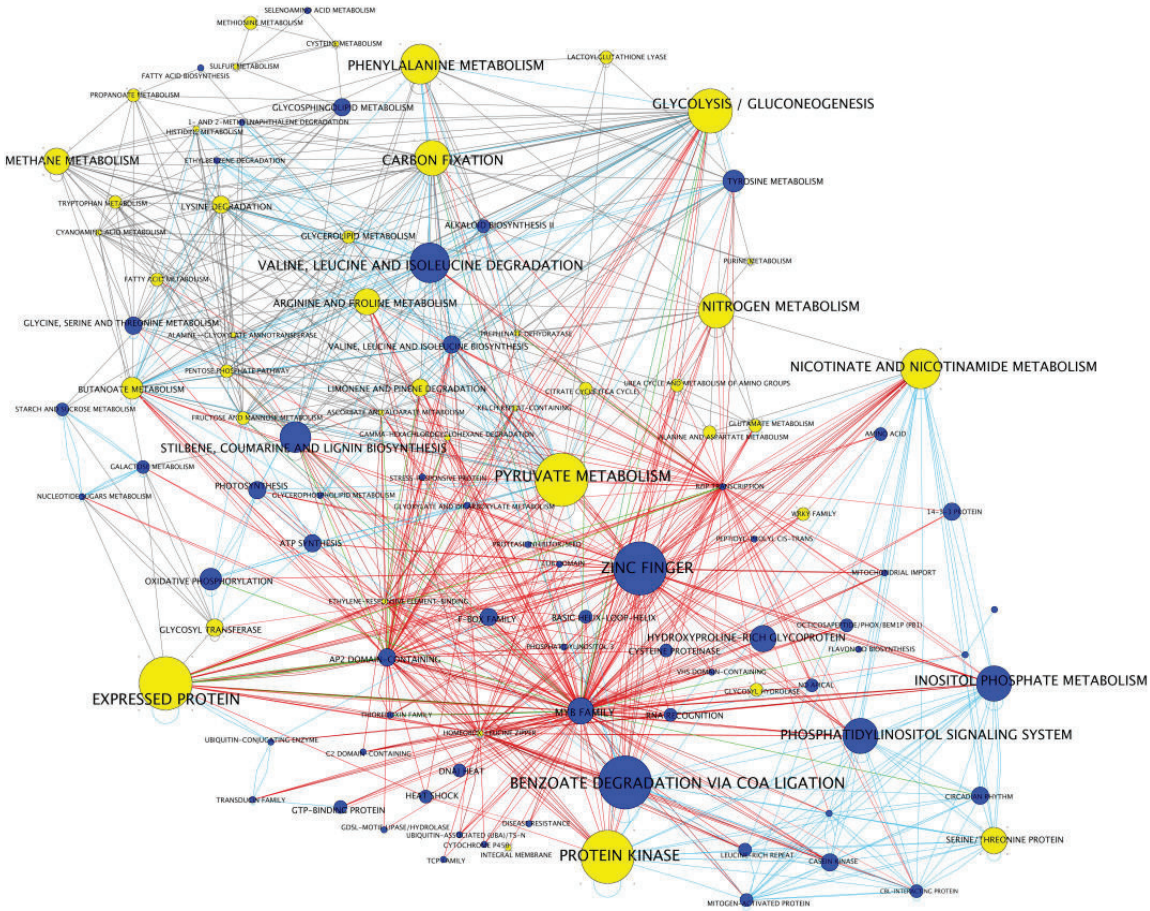


Figura 3. Rede metabólica relacionada aos processos de regulação em linhagens de *Arabidopsis thaliana* (Thum et al., 2008).

Com a geração de uma grande quantidade de dados químicos obtidos de diversos organismos, através do uso de técnicas analíticas como CG-EM, CLAE-UV-EM e RMN, o uso de ferramentas de análise multivariadas tornou-se imprescindível. A análise de componente principal (PCA) consiste em um método não

supervisionado de agrupamento de amostras que não requer conhecimento prévio sobre a natureza dos dados, e que ajuda a reduzir a dimensionalidade dos dados multivariados ao mesmo tempo que preserva a máxima variância entre eles (Choi et al., 2004; Choi et al., 2005; Kim et al., 2010b; Verpoorte et al., 2007). A escolha do método empregado para gerar os dados é extremamente importante, uma vez que os resultados devam ser consistentes e permitir um controle para análises futuras sendo, portanto, a reprodutibilidade o critério mais importante para o desenvolvimento das técnicas de análises multivariadas. Neste ponto, o uso da técnica de RMN com a finalidade de determinar perfis metabólicos de organismos torna-se uma ferramenta de grande utilidade, por apresentar uma elevada reprodutibilidade e fornecer informações estruturais precisas, já que cada metabólito presente na mistura possui um espectro de RMN altamente específico (Eisenreich and Bacher, 2007; Fiehn, 2001; Kim et al., 2010a). Considerando-se a importância da técnica de PCA para a análise de um grande volume de dados, a utilização deste método foi testada no presente estudo para a análise da distribuição dos metabólitos secundários de espécies de *Piper*.

1.2.1. Angiospermas Basais e Piperaceae

A ordem Piperales é considerada o maior e mais rico grupo em número de espécies entre as angiospermas basais, incluindo Aristolochiaceae, Saururaceae, Lactoridaceae e Hydnoraceae (Figura 4) (Dahlgren, 1989; Dahlgren, 1980; The Angiosperm Phylogeny, 2009). Piperales compreende cerca de 4.300 espécies e corresponde a aproximadamente 1,7% da diversidade mundial de angiospermas (Samain et al., 2009; Wanke et al., 2007). Dentro desta ordem, diversos hábitos podem ser observados, tais como ervas, suculentas, parasitas, lianas, arbustos,

árvores e epífitas. Os gêneros considerados ricos em número de espécies são *Aristolochia*, *Peperomia* and *Piper*. Dentre estes, *Piper* destaca-se por apresentar o maior número de espécies (cerca de 2000), sendo também classificado entre os 20 gêneros mais ricos de angiospermas (Frodin, 2004).

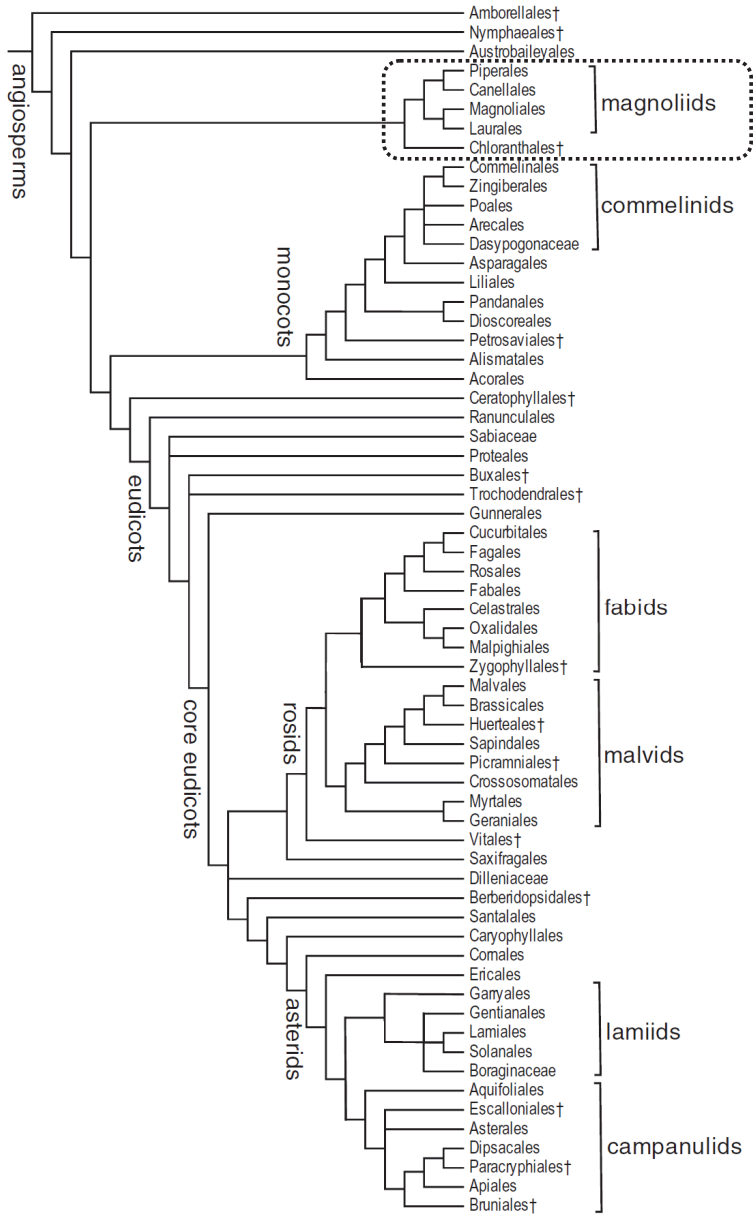


Figura 4. Relação entre ordens e algumas famílias obtida da análise em larga escala de angiospermas. Os ramos apresentados são suportados por porcentagens acima de 50% de *bootstrap* e *jacknife* (The Angiosperm Phylogeny, 2009). As linhas pontilhadas destacam Magnoliide, ao qual pertence as Piperales.

As primeiras classificações do gênero *Piper* foram feitas por Miquel e Kunth (Kunth, 1839; Miquel, 1845) que propuseram a divisão de *Piper* em diversos gêneros. Nos trabalhos seguintes, as revisões desta classificação reuniram as espécies em um único grande gênero, porém, mantendo as classificações iniciais como seções ou subgêneros (de Candolle, 1869). Mais recentemente, as análises das relações filogenéticas alinharam-se às tendências modernas e passaram a empregar dados moleculares juntamente aos caracteres morfológicos para revisitar estas classificações.

A região de *internal transcribed spacer* (ITS) do DNA nuclear ribossomal têm sido amplamente utilizada para análises filogenéticas em nível de espécies e demonstrou uma excelente resolução para *Piper* (Jaramillo and Manos, 2001). De acordo com as classificações tradicionais e dos novos panoramas gerados pelas extensas análises moleculares, a classificação das espécies de *Piper* encontra-se organizada em grupos maiores formados por três regiões geográficas distintas: Neotrópicos, Trópicos Asiáticos e Pacífico Sul. Dentro destes 3 grandes grupos, as espécies podem ser classificadas em nove consistentes clados: Macrostachys, Ottonia, Enckea, Radula, Pothomorphe, Peltobryon, Schilleria, Piper e Macropiper (Jaramillo and Manos, 2001; Jaramillo et al., 2008).

A análise das modificações morfológicas destas espécies em combinação com os estados de caracteres florais foram utilizados para investigar a origem da diversificação do gênero (Jaramillo and Manos, 2001). Além disso, o uso de dados biogeográficos, registros fósseis e dados moleculares (regiões *tnr*L-*trn*F, intron *trn*L, *ndh*F e *g3pd*) permitiu estimar que a origem do gênero *Piper* deu-se durante o período Cretáceo (cerca de 91 milhões de anos atrás) na região dos Neotrópicos (Smith et al., 2008), onde existe a maior área de diversificação, com

aproximadamente 700 espécies, seguida pela Ásia meridional com cerca de 300 representantes (Jaramillo and Manos, 2001).

1.3. Metabolismo secundário em Piperaceae

O metabolismo secundário da família Piperaceae é caracterizado pela ocorrência de produtos predominantemente oriundos de biossíntese mista (chiquimato/acetato), que resultam na produção de amidas (da Silva et al., 2002; Marques et al., 2008b; Marques et al., 2007; Navickiene et al., 2003; Scott et al., 2008), fenilpropanoides e lignanas (Benevides et al., 1999; Gottlieb et al., 1995; Kato and Furlan, 2007; Martins et al., 2000; Martins et al., 2003; Parmar et al., 1997), ácidos benzóicos (Freitas et al., 2009; Friedrich et al., 2005; Lago et al., 2009; Lago et al., 2004; Morandim et al., 2009), cromenos (Baldoqui et al., 1999; Leite et al., 2007; Lopes et al., 2007; Morandim et al., 2009; Morandim et al., 2005) e alquenilfenóis (Orjala et al., 1998; Parmar et al., 1997; Valdivia et al., 2008). Muitos desses apresentam pronunciadas atividades biológicas, as quais se destacam as atividades antifúngica (Lago et al., 2004; Marques et al., 2007), antiparasitária (Martins et al., 2003; Rapado et al., 2013) e antitumoral (Bezerra et al., 2008a; Bezerra et al., 2008b; Bezerra et al., 2008c).

1.4. Metabolismo fenilpropanoídico

Considerando-se que as diversas vias metabólicas são expressas de forma diferencial e específica nos diversos táxons, seu recrutamento deve ter sido um fator positivo para a evolução das espécies vegetais. Neste aspecto, o desenvolvimento

da via fenilpropanoídica foi de fundamental importância para as plantas. Em especial, as lignanas são um foco altamente interessante para o estudo das vias metabólicas, por possuírem uma expressiva importância biológica e apresentarem mecanismos de acoplamento oxidativo que requerem o desenvolvimento e o recrutamento de genes altamente específicos nas etapas de formação e dimerização destes compostos (Vassão et al., 2010).

As lignanas constituem-se numa família estruturalmente diversificada de metabólitos de origem fenilpropanoidica, distribuídos no reino vegetal principalmente entre angiospermas e gimnospermas. São freqüentemente encontradas como dímeros opticamente ativos, mas também estão envolvidas na formação dos oligômeros que constituem as ligninas, de importância estrutural para os vegetais (Klink et al., 2007). Apresentam uma gama de atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, fungicida e inseticida o que sugere que seu metabolismo esteja diretamente relacionado com mecanismos de defesa das plantas (Croteau et al., 2000; Harmatha and Nawrot, 2002; Lewis et al., 1995; Nawrot and Harmatha, 2012).

Em *Piper*, a ocorrência de fenilpropanoides e lignanas é bastante frequente. Destacam-se as espécies *P. solmsianum, P. regnelli, P. richardiaefolium, P. cubataonum* e *P. cernuum*, agrupadas nos clados Schilleria e Macrostachys, que acumulam lignanas e fenilpropanóides como metabólitos majoritários em seu repertório químico.

O estudo biossintético de lignanas avançou significativamente nos últimos anos. Ainda que essa classe de produtos naturais tenha sido descrita desde os anos 40, somente na década de 90 sua biossíntese começou a ser desvendada, através da demonstração da estereoespecificidade do acoplamento oxidativo de unidades

de álcool coniferílico em lignanas como a (+)-pinoresinol, em *Forsythia intermedia* (Figura 7) (Davin et al., 1992; Davin et al., 1997).

O processo de formação de lignanas é mediado pela ação de enzimas específicas e por esta razão as lignanas têm sua estereoquímica rigidamente controlada originando produtos enantiomericamente puros. Foi observado que este controle estereo- e enantiosseletivo devia-se não às peroxidases atuantes, mas a uma classe de proteínas recentemente descoberta, denominada proteínas dirigentes (Davin et al., 1997; Gang et al., 1999; Halls and Lewis, 2002; Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007).

1.4.1. Genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanoides e lignanas

Uma parte considerável do genoma das plantas está destinada a codificar enzimas envolvidas no metabolismo primário e secundário. Não se sabe ao certo o número de metabólitos que as plantas são capazes de produzir, mas estima-se que este número seja algo próximo a ~30.000. Por sua vez, o número de genes envolvidos na biossíntese destes metabólitos também deve ser bastante grande (Verpoorte et al., 2005), embora outro ponto de vista aponte que a variedade metabólica seja, na verdade, fruto da baixa especificidade das enzimas envolvidas na biossíntese dos metabólitos (Schwab, 2003).

A comparação entre o perfil de metabolismo secundário e os perfis de expressão têm apresentado uma ferramenta poderosa para a identificação de genes e enzimas. Entretanto, a caracterização dos substratos, da atividade enzimática e dos produtos requerem extensas análises bioquímicas, as quais têm sido mais bem sucedidas quando a proteína candidata apresenta homologia com outras enzimas de função conhecida (Fridman and Pichersky, 2005).

Um caso de sucesso provêm do empenho de vários grupos de pesquisa em *Arabidopsis*, uma pequena planta da família Brassicaceae que se tornou o sistema modelo para as pesquisas de biologia, bioquímica e química de plantas. Este esforço conjunto têm apresentado importantes descobertas para a função e organização da relação entre dados de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (Bottcher et al., 2008; Fraser and Chapple, 2011; Hirai et al., 2004; Meinke et al., 1998; Rowe et al., 2008; Schenk et al., 2000; Tohge et al., 2005). Tal enfoque gera dados robustos organizados em redes metabólicas que são de extrema relevância no sentido de servirem como base para a pesquisa em outras plantas e organismos.

A abordagem dos estudos sobre o metabolismo das plantas tem incorporado essas novas tecnologias disponíveis e as empregam de modo a otimizar a descrição das enzimas envolvidas nas vias biossintéticas e aprofundar o conhecimento dos seus mecanismos de ação. No artigo de revisão sobre o status atual da "fitoquímica metabólica", escrito por Petersen (Petersen, 2007), são apontadas algumas abordagens para os atuais estudos de biossíntese, entre as quais destacam-se: 1) a descoberta de novas enzimas e genes envolvidos na biossíntese de produtos naturais de plantas, partindo da busca por enzimas que realizam uma etapa específica da reação que leva ao metabólito de interesse; 2) a produção de mutantes, em que alterações em um determinado gene correspondam a alterações metabólicas que permitam avaliar a função *in vivo* dos genes nocauteados ou superexpressos; 3) na transferência de um gene para *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* para a produção heteróloga de metabólitos de plantas.

O perfil metabólico observado na espécie *P. solmsianum*, onde praticamente apresenta como único componente a lignana (–)-grandisina enantiomericamente

pura, apresentou-se como uma oportunidade interessante para a investigação de enzimas e proteínas envolvidas na biossíntese altamente expressa desse metabólito. A pesquisa de enzimas envolvidas na biossíntese de intermediários que levam às lignanas foram um dos objetivos deste estudo, onde foram focadas as aciltransferases, propenilfenol sintases e proteínas dirigentes.

1.4.1.1. Aciltransferases

A transferência de grupos acilas desempenha um papel crucial na modificação de muitos metabólitos de plantas, alterando suas propriedades físico-químicas, incluindo polaridade, volatilidade, estabilidade e também atividades biológicas. As enzimas que realizam este tipo de reação estão classificadas dentro da família denominada BAHD, cujo nome provém das iniciais das primeiras enzimas bioquimicamente caracterizadas desta classe. Duas delas são acetiltransferases: benzilalcool *O*-acetiltransferase (**B**EAT) de *Clarkia breweri* e a desacetilvindolina 4-*O*-acetiltransferase (**D**AT) de *Catharanthus roseus*. As outras duas enzimas são benzoil/hidroxicinamoil-CoA transferases: **A**HCT de antocianina *O*-hidroxicinamoiltransferase e **H**CBT de antranilato de *N*-hidroxicinamoil/benzoilltransferase (St Pierre and de Luca, 2000).

Os estudos com as enzimas BAHD aciltransferases têm demonstrado que os membros desta família são capazes de acilar uma grande variedade de substratos e as análises filogenéticas indicaram uma segregação em cinco grandes grupos classificados tanto pelo tipo de substrato como pelas condições em que os genes e enzimas são ativados (D'Auria, 2006). Os membros da família BAHD estão envolvidos na modificação e biossíntese de antocianidinas (Taguchi et al., 2005), na síntese de substâncias voláteis como o benzoato de benzila (Boatright et al., 2004),

na acilação do paclitaxel (Walker et al., 2002; Walker et al., 1999), na formação de intermediários da biossíntese de lignina, utilizando como substratos o hidroxicinamoil- e benzoil-CoA como doadores de acila (Hoffmann et al., 2003; Hoffmann et al., 2004).

Foram identificadas em *Petunia hybrida* a enzima envolvida na acetilação do álcool coniferílico, PhCFAT, que leva à formação do acetato de coniferila (Dexter et al., 2007), intermediário na biossíntese do isoeugenol e eugenol (Figura 5)(Koeduka et al., 2006).

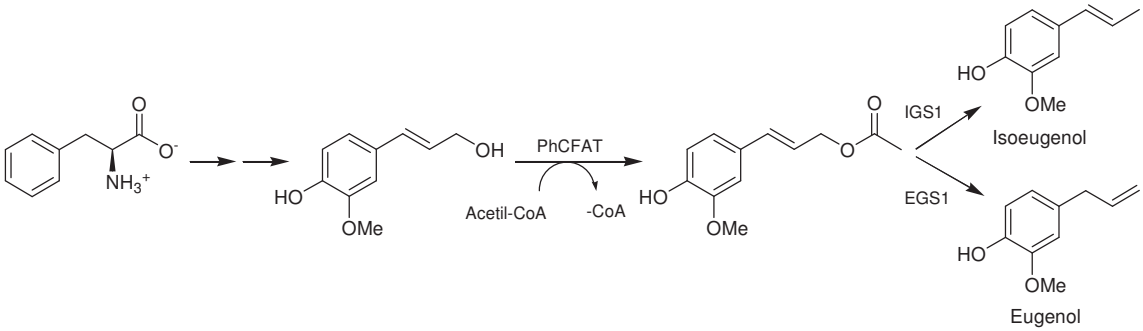


Figura 5. Proposta biossintética para a formação do isoeugenol e eugenol. PhCFAT: *Petunia hybrida* coniferil álcool acetiltransferase (Dexter et al., 2007), IGS1: Isoeugenol sintase; EGS1: Eugenol sintase (Koeduka et al., 2006) .

1.4.1.2. Propenilfenol sintases

As enzimas responsáveis pela etapa seletiva de redução, via eliminação do grupo acetila, do precursor acetato de coniferila, IGS e EGS, pertencem a família de enzimas redutases PIP dependentes de NADPH. O nome desta classe foi dado aos primeiros membros identificados, que foram a **P**inoresinol-lariciresinol redutase (PLR), **I**soflavona redutase (IFR) e **P***henylcoumaran benzylic ether reductase* (PCBER), enzimas que participam da biossíntese de diversos metabólitos secundários (Fujita et al., 1999; Hemmati, 2007; Koeduka et al., 2006; Louie et al., 2007; Vassão et al., 2007).

Entretanto, as enzimas que coordenam a eliminação do acetato são específicas quanto ao mecanismo da reação. Para a IGS, o ataque nucleofílico do hidreto oriundo do NADPH ocorre no carbono C-9 da cadeia lateral, levando à formação do propenilfenol enquanto que, para EGS, o ataque do hidreto ocorre no carbono C-8 e leva ao alilfenol. Há dois mecanismos propostos para esta redução: o primeiro consiste em um mecanismo direto de redução seguida de eliminação (Figura 6, mecanismo 1), e o segundo passa por um intermediário quinona metídeo antes da redução (Figura 6, mecanismo 2) (Koeduka et al., 2006; Vassão et al., 2006).

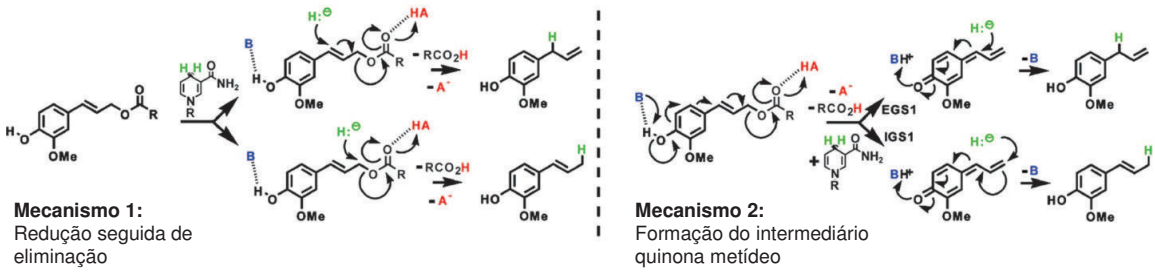


Figura 6. Proposta dos mecanismos de redução e eliminação que levam à formação do eugenol e isoeugenol (Koeduka et al., 2006). **A**: representação geral de uma ligação de hidrogênio entre um hidrogênio ácido e um doador-receptor. **B**: representação geral da base que abstrai-doa o hidrogênio do grupo *p*-hidróxi do acetato de coniferila.

1.4.1.3. Proteína Dirigente

As proteínas dirigentes (do Latin "*dirigere*": dirigir, orientar) atuam como mediadoras da enantiosseletividade do acoplamento radicalar de monolignóis. Elas não possuem sítio catalítico, porém, junto com as peroxidases, levam às lignanas opticamente ativas (Davin et al., 1997; Gang et al., 1999). Os estudos realizados com *Forsythia intermedia* resultaram na descrição de uma proteína de massa molecular de proximadamente 78 kDa que, na presença de oxidases ou de um oxidante radicalar, efetuou o acoplamento do álcool *E*-coniferílico gerando

exclusivamente como produto o (+)-pinoresinol (Davin *et al.*, 1997; Davin *et al.*, 2000) (Figura 7).

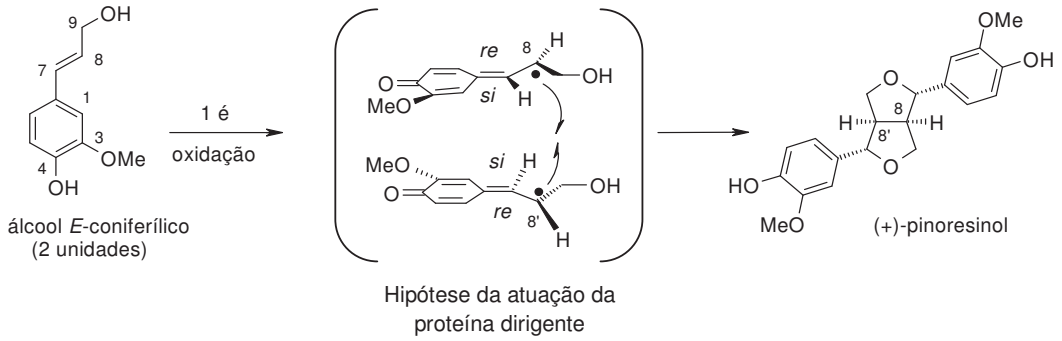


Figura 7. Acoplamento enantiosseletivo que gera o (+)-pinoresinol em *Forsythia intermedia* (Davin *et al*, 1997; Davin *et al.*, 2000).

Outras proteínas dirigentes, como àquela envolvida na formação de (+)-gossipol em *Gossypium hirsutum*, vêm sendo descritas em muitas espécies vegetais indicando sua eventual universalidade (Liu et al., 2008). Kim e colaboradores (Kim et al., 2012) demonstraram a especificidade das proteínas dirigentes obtidas de *Arabidopsis* e *Schizandra* em orientar seletivamente a formação dos enantiômeros (–)- e (+)-pinoresinol, respectivamente.

A ocorrência de proteínas dirigentes em espécies de Piperaceae nunca foi investigada, mas diante do que já foi demonstrado, muito possivelmente estão envolvidas na biossíntese das lignanas tetraidrofurânicas que ocorrem em *P. solmsianum*. Além disso, podem estar envolvidas na biossíntese das lignanas furofurânicas em *Piper richardiaefolium* e das neolignanas diidrobenzofurânicas em *P. regnellii*. Os reduzidos estudos biossintéticos realizados em espécies de Piperaceae envolvem a transformação enantiosseletiva de *p*-hidroxipropenilbenzeno exclusivamente no enantiômero (+)-conocarpano com frações de membranas obtidas das folhas de *P. regnellii* (Sartorelli *et al.*, 2001) e a enantiosseletividade do

acoplamento que promove a formação exclusiva do isômero (-)-di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina (100% *ee*) a partir do *E*-5-metóxi-isoeugenol, com preparações enzimáticas extraídas das folhas *P. solmsianum* (Martins, 2002).

Uma análise sobre a ocorrência de lignanas e neolignanas em espécies de Piperaceae sugere que tais espécies podem constituir-se em excelentes modelos para um estudo sistemático sobre a biossíntese destes metabólitos secundários.

2. OBJETIVOS

Os resultados recentes sobre o acúmulo pronunciado de lignóides por espécies de Piperaceae, dentro de um contexto filogenético e de importância biológica destes compostos, constituíram-se nas bases para o presente estudo, que visa uma análise integrada entre os aspectos químicos e moleculares ligados à filogenia de Piperaceae.

No sentido de investigar os aspectos evolutivos envolvidos na distribuição dos metabólitos secundários em *Piper*; esclarecer a variabilidade observada entre especimens classificados como *P. solmsianum* e, por fim, descrever genes envolvidos na biossíntese de lignóides, classe amplamente expressa em *P. solmsianum*, é que este estudo apresenta como objetivos principais:

- Correlacionar dados das regiões utilizadas para resolver relações filogenéticas em Piperaceae, incluindo a região de DNA nuclear (ITS) e de cloroplasto (*psbA-trnH*), com dados de composição química, no intuito de sugerir relações filogenéticas e evolutivas em diversos níveis entre espécies de *Piper*;
- Avaliar métodos de análise não supervisionada no intuito de se obter uma visão global sobre a ocorrência e distribuição de classes de metabólitos secundários em *Piper* e analisar se as espécies podem ser agrupadas de acordo com as classes estruturais mais expressas, objetivando a racionalização dos estudos fitoquímicos;
- Comparar a variabilidade química observada entre espécimens classificados como *P. solmsianum* com os resultados da análise de variabilidade genética, acessada através das sequências de microssatélites desenvolvidos para este

estudo;

- Obter dados de seqüenciamento dos genes envolvidos na biossíntese de lignóides, com foco nas aciltransferases, propenilfenol sintases e proteínas dirigentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e generalidades metodológicas

- Os solventes utilizados nos procedimentos de extração e cromatografia em camada delgada foram de pureza analítica e previamente destilados.
- Para as análises cromatográficas em CLAE e CG foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck® e Tedia® S/A), e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®).
- Para CCDA, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F_{254} (Merck®), sobre suporte de alumínio.
- Para a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram confeccionadas placas de sílica gel 60GF_{254} (5-40 µm) (Merck®) com 1,0 mm de espessura, sobre suporte de vidro (20 x 20 cm).
- As placas cromatográficas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e foram reveladas com uma solução de vanilina (1% em etanol)/ácido sulfúrico (5% em etanol), seguido de aquecimento (Stahl, 1990).
- As análises em CLAE foram realizadas em um sistema Shimadzu composto por duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector na região de UV-Vis com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M10A Diode Array, controlados por um módulo de comunicação SCL-10A e tratados pelo programa de computador CLASS-VP versão 6.10. Utilizou-se uma coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 Luna 5µ (250 x 4,6 mm). O sistema de solventes utilizado nas análises por CLAE consistiu em uma mistura binária

de acetonitrila e uma solução de ácido acético 3% em um sistema com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ e em gradiente com: 50% de acetonitrila, mantido por 10 minutos, seguido de um gradiente de 20 minutos até acetonitrila 100%, retornando a 50% de acetonitrila aos 40 minutos a fim de se iniciar novas corridas. As amostras analisadas foram preparadas a 1 $mg.mL^{-1}$, solubilizadas em MeOH:H_2O (7:1 v/v), e em seguida filtradas em filtro Millex® de 0,45 µm.

- As análises em UPLC foram feitas no equipamento *Acquit System* (Waters®) acoplado a detector DAD, com fluxo de 0,2 $mL.min^{-1}$, utilizando o sistema binário de solventes, com acetonitrila e uma solução de ácido acético 3% em um sistema em gradiente. Foram empregados dois métodos para as análises. O método 1 consiste em: 10% de acetronitrila mantido por 2 minutos, aumentando para 62% até os 9 minutos de análise, alcançando 100% de acetronitrila aos 10 minutos, mantidos até 13 minutos, e retornando a 10% aos 15 minutos. Para o método 2 o gradiente foi alterado para: 20% de acetronitrila mantido por 1 minuto, com aumento para 50% até os 9 minutos de análise, alcançando 100% de acetronitrila aos 10 minutos, mantidos até 13 minutos, e retornando a 20% aos 15 minutos. As análises foram realizadas em coluna Acquity UPLC BEH RP18 1.7µm (50 x 2,1 mm, Waters®).
- As análises em CLAE semi-preparativo foram realizadas no sistema Alliance 2690 HPLC (Waters®) equipado com detector DAD modelo 2990 (Waters®), e coluna de fase reversa Novapak C18 (250 x 3,9 mm, Waters®).
- As análises de LC-MS foram realizadas em um equipamento *Quattro II* triplo quadrupolo (Micromass®). As amostras foram preparadas em MeOH a

concentração de 1 $mg.mL^{-1}$. A ionização por electrospray (modo positivo) foi realizada em voltagem de 4,5 kV, skimmer de 50 V fluxo de gás nitrogênio a 250 e 30 $L.h^{-1}$.

- Os espectros de RMN uni- e bidimensionais foram adquiridos em um equipamento Bruker modelo DRX500, operando a 500 MHz para a frequência do hidrogênio. Para preparo das amostras, foram utilizados $CDCl_3$ (99,96%) contendo 0,05% de tetrametilsilano (TMS) e D_2O (99,00%) contendo 0,05% do ácido trimetilsililpropiônico (TSP) (Cambridge Isotope Laboratories).

3.2. Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo foi devidamente identificado pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), sendo uma exsicata depositada no *Herbarium* de acordo com os códigos e localidades descritos nas Tabelas 2, 5 e 6. As espécies foram coletadas com a autorização para atividades com finalidade científica do Instituto Florestal (SMA N° 40.272/2006) e Sisbio/MMA (N° 15780-2).

3.3. Filogenia molecular

3.3.1. Preparo do material vegetal

Para as análises moleculares, as folhas foram divididas em pequenos fragmentos (aproximadamente 1 mm) e imediatamente colocadas em tubos plásticos contendo sílica com indicador de umidade, sendo assim mantidas até a ocasião da extração do DNA, com monitoramento frequente das condições da

sílica.

As folhas frescas foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido, sendo então submetidas à extração.

3.3.2. Extração de DNA

Cerca de 30-50 mg de folhas frescas e folhas secas em sílica gel foram trituradas com N_2 líquido, diretamente em microtubo de 1,5 mL. A extração do DNA total foi feita com 2 x CTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio catiônico 2%, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl pH 8, polivinilpirrolidona 1%, 2-mercaptoetanol 2%) segundo o procedimento de Doyle (Doyle and Doyle, 1987) e Ferreira (Ferreira and Grattapaglia, 1996).

Para algumas amostras de DNA foi realizada uma segunda extração, ressuspendendo o material com 700 µL de CTAB, incubado a 60-65°C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Foram feitas duas extrações com clorofórmio, invertendo o material por 5 minutos. Este foi centrifugado a uma velocidade de 12.000 rpm durante 5 minutos, seguido da adição de 80 µL de NH_4OAc 7,5 M juntamente com 1,2 mL de isopropanol 70% frio (-20 ^{o}C) e levado ao refrigerador a temperatura de -20 ^{o}C por 40 minutos. O material foi retirado do refrigerador e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, seguido de duas lavagens do *pellet* com etanol 70%, sendo deixado em repouso por 10 minutos, centrifugado a 7.000 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o material em 100µL de tampão TE (10 mM Tris-Cl pH 8 e 1 mM de EDTA). A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 20 mM ácido acético,1 mM EDTA).

3.3.3. Quantificação do DNA e RNA

A quantificação do DNA e RNA total extraídos foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) mensurado no comprimento de onda 260 e 280 nm, e a pureza de ambos foi estimada em relação à razão dos comprimentos de onda de A_{260}/A_{230}, A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{240} (Farrell, 2010).

3.3.4. Amplificação das regiões ITS e *psbA-trnH* e sequenciamento

As amostras de DNA foram submetidas a reações de amplificação em termociclador para a região do cloroplasto não codificante *psbA-trnH* e para a região ITS do DNA nuclear, empregando-se os iniciadores descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores ITS e *psbA-trnH.*

Iniciadores	Sequências	Referências
ITS		
ITS5 D	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	(Jaramillo and Manos, 2001)
ITS4 R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
psbA-trnH		
trnH D	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'	(Storchová and Olson, 2007)
psbA R	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	

As reações de amplificação foram preparadas com 2 µL de DNA genômico; 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (Applied Biosystems®); 2,5 µL de dNTPs (2 mM cada); 1 µL de cada iniciador na concentração de 10 µM; 3 µL de cloreto de magnésio 1,5 M; 5µL do tampão 10X. A amplificação foi realizada com o sistema termociclador modelo MyCycler Thermal Cycler (BioRad®), com as seguintes programações:

ITS: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, e extensão a 78°C por 1 minuto e 15 segundos; e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

psbA-trnH: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 36 ciclos de: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 58°C por 20 segundos e extensão final a 72°C por 1 minuto; e um ciclo de extensão final a 72°C por 4 minutos.

Para a verificação da amplificação, uma alíquota dos produtos amplificados foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, adicionada de GelRed (Biotium), e a visualização foi feita em transluminador juntamente com padrão de fragmentos de DNA (EZ Load 100 pb *molecular ruler*; BioRad®). Para purificação dos produtos satisfatoriamente amplificados foi utilizando o kit GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences®). As reações de seqüenciamento foram preparadas com o kit BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador MegaBACE™1000 DNA Sequencing System, disponível no Instituto de Química-USP. Estes procedimentos foram realizados de acordo com os encontrados na literatura (Davin et al., 1997; Deutscher, 1990; Halls and Lewis, 2002; Halls et al., 2004; Nakatsubo et al., 2008; Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007).

3.3.5. Análise filogenética

Para as análises da região de ITS e *psbA-trnH*, um total de 41 espécies de *Piper*, coletadas em diferentes localidades do Brasil (Tabela 2) foram

examinadas. Para a análise das sequências e construção da matriz foram incluídas 60 sequências de *Piper* obtidas no banco de dados GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), totalizando 95 espécies (Dyer and Palmer, 2004; Jaramillo and Manos, 2001; Jaramillo et al., 2008). Para as análises de *psbA-trnH* foram utilizadas 16 espécies de *Piper*.

As espécies *Saururus cernuus* e *Houttuynia cordata,* ambas da família Saururaceae, foram inseridas na análise como grupos externos. As famílias Saururaceae e Piperaceae pertencem à ordem das Piperales e são consideradas famílias irmãs em análises filogenéticas recentes (Jaramillo and Manos, 2001).

Tabela 2. Espécies de *Piper* utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécies de *Piper*	**Nº da coleta**	**Data de coleta**	**Procedência**	**Iniciadores analisados**	
				ITS	**psb*A*-trn*H***
P. aduncum	K-057	30/06/2006	Ubatuba (SP)	X	X
P. aequale	K-962	19/02/2008	Carajás (PA)	X	--
P. aleyreanum	K-966	19/02/2008	Carajás (PA)	X	--
P. amalago	K-110	16/12/2000	Riacho Grande (SP)	X	--
P. amplum	K-818	03/12/2006	Praia do Félix, Ubatuba (SP)	X	--
P. anisum	K-655 K-1037	16/10/2005	Cachoeira Deus me livre, Aiuruoca (MG)	X	--
P. arborescens	K-349	08/02/2003	Ubatuba (SP)	X	--
P. arboreum	K-053	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	X
P. caldense	K-842	29/10/2004	Ubatuba (SP)	X	--
P. callosum	K-161	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. carniconnectivum	K-976	21/02/2008	São Paulo (SP)	X	--
P. cernuum	K-137	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	--	X
P. crassinervium	K-091	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	--	X

Tabela 2. Conclusão.

Espécies de *Piper*	Nº da coleta	Data de coleta	Procedência	Iniciadores analisados	
				ITS	psb*A*-trn*H*
P. cubataonum	K-249	09/07/2002	Parque Municipal Previdência, São Paulo (SP)	X	X
P. diospyrifolium	K-431	01/10/2004	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. flavoviride	K-098	08/01/2000	Araraquara (SP)	--	X
P. fuligineum	K-720	25/06/2006	Araraquara (SP)	X	X
P. gaudichaudianum	K-031	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	--	X
P. glabratum	K-901	19/05/2007	Araraquara (SP)	X	--
P. hemmendorffii	K-1061	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. hostmannianum	K-983	21/02/2008	Carajás (PA)	X	--
P. lhotzkycuyabanum	K-900	19/05/2007	Aquidauana (MS)	X	--
P. lucaenum	K-867 K-1040	02/03/2007 25/10/08	Guaraqueçaba (PR) Viconde de Mauá (MG)	X	--
P. magnificum	K-491	15/11/2004	Manaus (AM)	X	--
P. malacophyllum	K-448	16/10/2004	Capão Bonito (SP)	X	--
P. marginatum	K-571 K-969	01/05/2002	Bairro São José, Manaus (AM)	X	X
P. mikanianum	K-1154	12/08/2009	Marquês de Souza (RS)	X	--
P. pellitum	K-960	19/02/2008	Carajás (PA)	X	--
P. peltatum	K-599	10/06/2005	Santa Teresa (ES)	X	--
P. permucronatum	K-310	27/10/2002	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. regnellii	K-242	25/04/2001	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	X
P. reitzii	K-1197	19/02/2010	Juquitiba (SP)	X	--
P. reticulatum	K-970	01/02/2008	Carajás (PA)	X	X
P. richardiaefolium	K-290	01/09/2002	Trilha do Corcovado, Ubatuba (SP)	X	X
P. scutifolium	K-281	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	--	X
P. solmsianum	K-487	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. solmsianum var. *solmsianum*	K-886	02/03/2007	Guaraqueçaba (PR)	X	X
P. truncatum	K-112	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	--	X
P. tuberculatum	K-169	24/04/2006	Ananindeua INPA (AM)	X	X
P. umbellatum	K-671	02/03/2009	IQ-USP, São Paulo (SP)	X	--
P. xylosteoides	K-1141	07/08/2009	D. Pedro de Alcântara (RS)	X	--

Tabela 3. Espécies de *Piper* cujas sequências de ITS foram obtidas do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Espécies	Nº de acesso	Data de Acesso
P. arboricola	AY572319	07/2013
P. argyrophyllum	EU581107	07/2013
P. arieianum	AF275163	07/2013
P. attenuatum	EU581110	07/2013
P. augustum	AF275165	07/2013
P. auritum	AF275175	07/2013
P. baccatum	EU581124	07/2013
P. bartlingianum	EU581125	08/2009
P. betle	EU581124	07/2013
P. boehmeriifolium	AF275204	07/2013
P. caninum	EF060066	07/2013
P. capense	EU581143	07/2013
P. cenocladum	EF056239	07/2013
P. cernuum	EF056242	07/2013
P. corcovadense	EU581165	08/2009
P. crassinervium	EU581172	07/2013
P. cubeba	EF060070	07/2013
P. darienense	AF275181	07/2013
P. dilatatum	EU581179	08/2009
P. divaricatum	EU581183	08/2009
P. excelsum	AF275193	07/2013
P. fimbriulatum	EF056251	07/2013
P. gaudichaudianum	EU581214	08/2009
P. glabratum	EU581215	07/2013
P. guayranum	EU581227	07/2013
P. guineense	EU581229	07/2013
P. hancei	EU581232	07/2013
P. hispidum	EU581241	08/2009
P. hoffmannseggianum	EU581246	08/2009
P. imperiale	EF056263	07/2013

Tabela 3. Conclusão.

Espécies	Nº de acesso	Data de Acesso
P. kadsura	EF450290	07/2013
P. klotzkyianum	EU581266	08/2009
P. lanceifolium	EU581272	07/2013
P. lolot	AY326208	07/2013
P. longum	EF450288	07/2013
P. methysticum	EU581298	07/2013
P. mollicomum	EU581300	09/2009
P. mollissimum	EF060075	07/2013
P. mullesua	AF203634	07/2013
P. multiplinervium	AF275168	07/2013
P. nigrum	AF 275197	09/2009
P. nudibaccatum	EU581318	07/2013
P. obliquum	EU581325	09/2009
P. ovatum	EU581330	07/2013
P. piscatorum	EU581342	09/2009
P. puberulum	EU581360	07/2013
P. retrofractum	AF275196	07/2013
P. rugosum	EU581374	07/2013
P. sanctum	EU581381	07/2013
P. sarmentosum	EF060082	07/ 2013
P. scutifolium	EU581389	09/2009
P. semi-immersum	EU581391	07/2013
P. solmsianum	EU581392	09/2009
P. tricuspe	AY326225	07/2013
P. truncatum	EU581423	09/2009
P. umbellatum	AF275172	09/2009
P. villiramulum	EU581441	07/2013
P. wallichii	EU581444	07/2013
Houttuynia cordata	AF275212	08/2009
Saururus cernuus	AF275211	08/2009

3.3.6. Alinhamento da matriz de dados moleculares

As seqüências foram alinhadas utilizando o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit (Hall, 1999), sendo modificadas através de inspeção visual. A partir do alinhamento dos dados obteve-se uma matriz com 716 caracteres moleculares para ITS e 314 para *psbA-trnH.*

3.3.7. Máxima Parcimônia

A análise filogenética foi realizada com o programa PAUP v. 4.0 utilizando o algoritmo de máxima parcimônia para a construção da árvore. Para avaliação da consistência dos clados foi empregado o método *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

3.3.8. Análise Bayesiana

A análise Bayesiana foi realizada com os dados de ITS através do programa MrBayes, versão 3.1.2 para Windows**.** O modelo evolutivo *General time reversible* + *gamma* + *Proportion Invariant* (GTR+I+G) foi determinado através do programa MrModeltest versão 2.3. O número de buscas realizadas foi de 1.000.000, com duas corridas simultâneas independentes sendo que o número de cadeias foi igual a 4 para cada corrida.

O estudo da filogenia molecular envolveu a definição de estratégias e de metodologias que teve a colaboração do Prof. Antonio Salatino (IB-USP).

3.3.9. Reconstrução de caracteres químicos

Com a finalidade de mapear os caracteres químicos, foi construída uma matriz de dados químicos obtidos de estudos que vem sendo realizados no

Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) no IQ-USP e também através dos dados publicados. O LPQN e colaboradores vêm, ao longo de anos, desenvolvendo estudos sobre a composição química das espécies brasileiras pertencentes à Piperaceae, e estes dados foram empregados neste estudo.

Os caracteres químicos foram analisados quanto à sua presença ou ausência nas diversas espécies, e incluíram amidas, lignanas/fenilpropanoides, ácidos benzoicos, cromenos e alquenilfenóis (Tabela 4). O estado de caracter (–) indica ausência e (+) presença, conforme matriz de dados químicos construída no programa Mesquite versão 2.6 para realizar a reconstrução dos caracteres sobre a árvore mais parcimoniosa, obtida pelo método de máxima parcimônia.

Tabela 4. Distribuição das classes de metabólitos secundários em espécies de *Piper* selecionadas. (**+**) **:** presença.(**–**) **:** ausência/não detectado. **LQPN** – espécies em estudo no Laboratório de Química de Produtos Naturais - IQ-USP.

Espécie	Amidas	Lignanas	Fenilpro-panoides	Cromenos	Ácidos Benzoicos	Alquenil -fenóis	Referências
P. aduncum	+	-	+	+	+	-	(Baldoqui et al., 1999; Lago et al., 2009; Morandim et al., 2005; Moreira et al., 1998; Navickiene et al., 2006; Orjala et al., 1993a; Orjala et al., 1993b); (Batista et al., 2008; Leite et al., 2007; Parmar et al., 1997; Parmar et al., 1998)
P. aequale	-	+	-	-	-	-	*(Maxwell et al., 1999)*
P. amalago	+	+	-	-	-	-	(Achenbach et al., 1986; Parmar et al., 1997)
P. amplum	-	+	-	-	-	-	**LQPN**
P. anisum	-	-	-	-	-	+	(Marques et al., 2008a)
P. arborescens	+	+	-	-	-	-	(Lee et al., 2004; Parmar et al., 1997)
P. arboreum	+	-	-	-	-	-	(da Silva et al., 2002)
P. arboricola	+	-	-	-	-	-	(He, 1981; Ho, 1981)
P. argyrophylum	+	+	-	-	-	-	(Singh et al., 1996)
P. argyrophylum	+	+	-	-	-	-	(Singh et al., 1996)
P. arieianum	-	-	-	-	+	-	(Green et al., 1999)

Tabela 4. Continuação.

Espécie	Amidas	Lignanas	Fenilpro-panoides	Cromenos	Ácidos Benzoicos	Alquenil -fenóis	Referências
P. attenuatum	+	-	-	-	-	-	(Desai et al., 1990)
P. augustum	+	-	-	-	-	-	(Delgado et al.)
P. auritum	-	-	+	+	+	-	(Ampofo et al., 1987; Gupta et al., 1985; McBurnett et al., 2007; Nair et al., 1989)
P. baccatum	+	+	-	-	-	-	(Nobuji et al., 1986)
P. bartlingianum	+	-	-	-	-	-	(Kijjoa et al., 1982)
P. beltle	+	-	+	-	-	-	(Gragasin et al., 2006; Murata et al., 2009)
P. boehimerifolium	+	+	-	-	-	-	(Desai et al., 1990; Desai, 1989; Pradhan et al., 1994; Xinxia et al., 2005)
P. caldense	+	-	-	-	+	-	(Cardozo and Oliveira Chaves, 2003; Freitas et al., 2009)
P. callosum	+	+	+	-	-	-	(Maia et al., 1993; Pring, 1982)
P. caninum	+	-	+	-	-	-	(Ma et al., 2004a; Ma et al., 2004b)
P. capense	+	+	-	-	-	-	(Green and Wiemer, 1991; Green et al., 1991; Pedersen et al., 2009)
P. cenocladum	+	-	-	-	-	-	(Dodson et al., 2000; Richards et al., 2001)
P. cernuum	-	+	+	-	-	-	(Danelutte et al., 2005)
P. corcovadense	+	-	-	-	-	-	(Costa and Mors, 1981)
P. crassinervium	+	-	-	-	+	-	(Lago et al., 2004; Lopes et al., 2008)
P. cubataonum	-	+	+	-	-	-	**LQPN**
P. cubeba	-	+	-	-	-	-	(Bodiwala et al., 2007; Harmatha and Nawrot, 2002)
P. darienense	+	-	-	-	-	+	(Meléndez-Rodríguez et al., 2000)
P. dilatatum	-	-	-	-	+	+	(Terreaux et al., 1998) **LQPN**
P. diospyrifolium	-	-	-	-	-	+	**LQPN**
P. divaricatum	+	-	+	-	-	+	(Avella et al., 1994; Bezerra et al., 2008a)
P. excelsum	-	+	-	-	-	-	(Briggs et al., 1968; Russell and Fenemore, 1973)
P. fimbriulatum	-	+	-	-	-	-	(Solis et al., 2005)
P. fuligineum	-	+	-	-	-	-	**LQPN**
P. gaudichaudianum	-	-	+	+	+	-	(Lago et al., 2004; Lopes et al., 2007; Ramos et al., 2009)
P. glabratum	-	-	-	-	+	-	(Flores et al., 2008)
P. glabratum	-	-	-	-	+	-	(Lago et al., 2004)
P. guayranum	+	-	-	-	-	-	(Maxwell and Ramprasad, 1989)
P. guineense	+	-	-	-	-	-	(Scott et al., 2005; Su and Sondengam, 1980)
P. hancei	+	+	-	-	-	-	(Han et al., 1992; Stöhr et al., 2001)

Tabela 4. Continuação.

Espécie	Amidas	Lignanas	Fenilpro-panoides	Cromenos	Ácidos Benzoicos	Alquenil -fenóis	Referências
P. hispidum	+	-	+	+	+	-	(Alécio et al., 1998; Friedrich et al., 2005; Navickiene et al., 2000; Vieira et al., 1980)
P. hoffmannseggianum	+	-	-	-	-	-	(Marques et al., 2007)
P. hotsmannianum	-	-	-	+	+	-	(Lago et al., 2009; Lago et al., 2004)
P. imperiale	+	-	-	-	-	-	(Richards et al., 2005)
P. kadsura	+	+	-	-	-	-	(Jiang et al., 2003; Kuo et al., 2000; Lin et al., 2006; Ma, 1992)
P. klotzschianum	-	-	-	+	-	-	(Lago et al., 2007)
P. lolot	+	-	+	-	-	-	(Do, 2001; Li et al., 2007; Luger, 2002; Vu et al., 2004)
P. longum	+	+	-	-	-	+	(Atal et al., 1966; Desai et al., 1988)
P. magnificum	-	+	-	-	-	-	**LQPN**
P. mallacophyllum	-	-	-		-	+	**LQPN**
P. marginatum	+	-	+	-	+	+	(Chaves and Santos, 2002; Chaves et al., 2006; Parmar et al., 1997; Reigada et al., 2007; Santos et al., 1998)
P. methysticum	+	-	-	-	-	-	(Dragull et al., 2003; Jaggy and Achenbach, 1992)
P. mollicomum	-	-	-	+	-	-	(Lago et al., 2007)
P. mollissimum	-	-	+	-	-	-	(Ahmad et al., 2000)
P. mullesua	+	+	+	-	-	-	(Srivastava et al., 2000a; Srivastava et al., 2000b; Srivastava et al., 2001a; Srivastava et al., 2001b)
P. multiplinervium	-	-	-	-	+	-	(Rüegg et al., 2006)
P. nigrum	+	+	+	-	-	-	(Chatterjee et al., 2007; Lee et al., 2008; Scott et al., 2008; Srinivasan, 2007; Sumathykutty and Madhusudana, 1988)
P. nudibaccatum	+	-	-	-	-	-	(Stöhr et al., 2001)
P. ovatum	+	-	-	-	-	-	(Rodrigues Silva et al., 2008; Silva et al., 2009a)
P. peltatum	+	-	+	-	-	-	(Nunes et al., 2005)
P. permucronatum	-	+	-	-	-	-	**LQPN**
P. piscatorum	+	-	-	-	-	-	(McFerren et al., 2002)
P. puberulum	+	+	-	-	-	-	(Wu et al., 1994; Zhang et al., 1995)
P. regnelli	-	+	+	-	-	-	(Benevides et al., 1999; Luize et al., 2006)
P. reticulatum	+	+	-	-	-	-	**LQPN**

Tabela 4. Conclusão.

Espécie	Amidas	Lignanas	Fenilpro-panoides	Cromenos	Ácidos Benzoicos	Alquenil -fenóis	Referências
P. retrofactum	+	+	+	-	-	+	(Banerji et al., 2002; Bodiwala et al., 2007; Matsuda et al., 2008; Morikawa et al., 2009)
P. richardiaefolium	+	+	-	-	-	-	**LQPN**
P. rugosum	+	-	-	-	-	-	(Maxwell and Rampersad, 1991)
P. sanctum	+	-	+	-	-	-	(Hänsel and Leuschke, 1976; Mata et al., 2004)
P. sarmentosum	+	+	+	-	-	+	(Stöhr et al., 2001)
P. scutifolium	+	-	-	-	-	-	(Marques et al., 2007)
P. semiimersum	+	-	-	-	-	-	(Stöhr et al., 2001)
P. solmsianum	+	+	+	-	-	-	(Martins, 2002; Martins et al., 2000; Martins et al., 2003) **LQPN**
P. tricuspe	-	-	-	+	+	-	(Vega et al., 2008)
P. truncatum	-	+	-	-	-	-	(Raimundo et al., 2009)
P. tuberculatum	+	-	-	-	-	-	(da Silva et al., 2002; Navickiene et al., 2000; Navickiene et al., 2003)
P. umbellatum	+	+	-	-	-	-	(Nunez et al., 2005; Tabopda et al., 2008)
P. virillamurum	-	-	-	-	-	+	(Galinis and Wiemer, 1993)
P.obliquum	-	-	+	-	-	+	(Valdivia et al., 2008)
P.wallichi	+	+	-	-	+	-	(Stöhr et al., 2001; Yun et al., 2005; Zhao and Ruan, 2006)
Saururus cernuus	+	+	-	-	-	-	(Hossain et al., 2005; Kubanek et al., 2000; Rao and Reddy, 1990)
Houttuynia cordata	+	+	-	-	-	-	(Probstle and Bauer, 1992; Tsui and Brown, 1996)

3.4. Preparo dos extratos para análise por RMN de ^{1}H

Todas as espécies utilizadas para as análises do perfil químico por RMN de ^{1}H (Tabelas 5 e 6) foram preparadas utilizando uma mesma metodologia otimizada. Os extratos foram preparados com alíquotas de 500 mg das folhas secas, que foram trituradas com N_2 líquido, e extraídas com uma mistura de 5 mL de metanol: água (1:1 v/v) e 5 mL de clorofórmio. Essa mistura foi colocada no vórtex por 30 segundos, seguido por 1 minuto no ultrassom, sendo

centrifugada à 3000 rpm por 20 minutos. O procedimento foi repetido novamente. Após esse processo, foram retirados da mistura 3 mL de cada fase, secas e submetidas às análises. Esta metodologia foi baseada no trabalho realizado por Choi (Choi et al., 2005).

Tabela 5. Espécies de *Piper* analisadas por RMN de ^{1}H e por PCA.

Espécie	Código no PCA	Nº da coleta	Local da coleta
P. aduncum	P.adun A	K-968	Carajás (PA)
	P.adun B	K-908	Araraquara (SP)
	P.adun C	K-509	IQ-USP, São Paulo
P. aleyreanum	P.aleyr	K-966	Carajás (PA)
P. amalago	P.amal	K-110	Riacho Grande (SP)
P. amplum	P.amplum	K-1204	Ubatuba (SP)
P. arboreum	P.arboreum A	K-1001	São Paulo (SP)
	P.arboreum B	K-053	IQ-USP, São Paulo
P. caldense	P.cald A	K-930	Ubatuba (SP)
	P.cald B	K-620	IQ-USP, São Paulo
P. callosum	P.callosum	K-161	IQ-USP, São Paulo
P. carniconnectivum	P.carnic	K-991	Carajás (PA)
P. cernuum	P.cern A	K-1196	Juquitiba (SP)
	P.cern B	K-137	IQ-USP, São Paulo
P. crassinervium	P.crass A	K-091	IQ-USP, São Paulo
	P.crass B	K-1003	Parauapebas (PA)
	P.crass C	K-091	IQ-USP, São Paulo (SP)
P. cubataonum	P.cubat A	K-939	Alto Carapaó (MG)
	P.cubat B	K-1331	Itatiaia (RJ)
	P.cubat C	IQ	IQ-USP, São Paulo (SP)
P. dilatatum	P.dilat A	K-971	Carajás (PA)
	P.dilat B	K-998	Parauapebas (PA)
P. diospyrifolium	P.diosp	K-431	IQ-USP, São Paulo (SP)
P. flavoviride	P.flavov	K-098	IQ-USP, São Paulo (SP)
P. fuligineum	P.fulig	K-676	IQ-USP, São Paulo (SP)
P. gaudichaudianum	P.gaudi A	K-489	Ubatuba (SP)
	P.gaudi B	K-031	IQ-USP, São Paulo
P. hemmerdorffii	P.hemm	K-1061	IQ-USP, São Paulo
P. hostmannianum	P.hostm	K-983	Carajás (PA)
P. lhotzkianum	P.lhotz	K-1183	Gonçalves (MG)
P. marginatum	P.marg A	K-969	Carajás (PA)
	P.marg B	K-715	IQ-USP, São Paulo
P. nigrum	P.nigrum	k-1113	IQ-USP, São Paulo
P. permucronatum	P.permuc	K-850	Ubatuba (SP)
P. regnellii	P.regn A	K-1155	Lageado (RS)
	P.regn B	K-1077	Ubatuba (SP)
	P.regn C	K-424	IQ-USP, São Paulo
P. richardiaefolium	P.rich A	K-854	IQ-USP, São Paulo
	P.rich B	K-1214	Ubatuba (SP)
	P.rich C	K-839	IQ-USP, São Paulo
P. scutifolium	P.scut A	K-923	Ubatuba (SP)
	P.scut B	K-1212	Ubatuba (SP)

Tabela 5. Conclusão.

Espécie	Código no PCA	N° da coleta	Local da coleta
P. solmsianum	P.solm A	K-1368A	Ubatuba (SP)
	P.solm B	K-1368B	Ubatuba (SP)
	P.solm C	K-1368C	Ubatuba (SP)
P. truncatum	P.trunc	K-112	IQ-USP, São Paulo
P. tuberculatum	P.tuberc	K-169	IQ-USP, São Paulo
P. umbellatum	P.umb	K-671	IQ-USP, São Paulo

3.5. Análise de componente principal

As análises de RMN de ^{1}H foram realizadas no instrumento Bruker DPX500, operando em frequência de hidrogênio igual a 500,13 MHz. Os extratos da fase orgânica foram solubilizados em 800 µL de $CDCl_3$ (99,8%) contendo 0,05% de TMS (tetrametilsilano) e os extratos da fase hidroalcoólica foram solubilizados em D_2O (99.00%) contendo 0,05% do ácido trimetilsililpropiônico (TSP) (Cambridge Isotopes Laboratories). Os extratos foram analisados seguindo os seguintes parâmetros: pulsos de 4,0 μs (90°), 128 scans, 64 k data point e tempo de relaxação de 1,0 s. Os espectros foram processados no programa MestReC (versão 4.8.6.0, MestreLab) com LB de 0,3 Hz, e calibrados com referência ao sinal de hidrogênio residual do $CDCl_3$, sendo o TMS e o TSP utilizados como padrões internos (ambos a 0 ppm). Os espectros foram integrados a cada 0,02 ppm em uma janela de δ 0,30-10,00 ppm. A região entre δ 7,25 - 7,27 (sinal residual do solvente) e δ 1,26-1,28 ppm (sinal de ácidos graxos) foram removidas das análises estatísticas. Os dados de deslocamento químico e intensidade dos picos foram compilados em uma tabela no programa Excel, normalizados pela média e processados utilizando o software *The Unscrambler* (version 9.5 CAMO Process AS, Norway).

3.6. Análise da variabilidade química e genética em *P. solmsianum*

3.6.1.Perfil químico de *P. solmsianum* por RMN de ^{1}H

Para a análise do perfil químico das espécies de *P. solmsianum*, foram coletados indivíduos de 4 diferentes localidades no Brasil (Tabela 6). O método de extração, análise por RMN de ^{1}H e por PCA foram realizadas como descrito no **item 3.4.** Os espectros uni e bidimensionais das amostras analisadas encontram-se nos Apêndices 1, 2 e 3.

Tabela 6. Características morfológicas das espécies de *P. solmsianum*.

Nome da amostra	N° de amostras	Local da coleta	Características das folhas	Características das inflorescências	N° da exsicata
Grupo A	16	CUASO - SP	Folhas com pecíolo 1,5-4,5 cm compr., glabro; bainha alargada na base, constituindo um canal, 1,5-2,3 cm compr., margem com ala caduca, quando presente a ala é membranéceo-hialina, percorrendo quase toda a extensão do pecíolo; lâmina 5,7-19,4 x 3,5-14,9 cm, ovada, membranácea, glabra em ambas as faces com glândulas translúcidas, base simétrica truncada, obtusa, cordada decurrente em direção ao pecíolo, ápice agudo, acuminado, margem revoluta; padrão de nervação camptódromo-acródromo, com tendência camptódromo na base e acródromo no ápice, nervuras primária castanho-amarelada, proeminente na face abaxial, subimpressa a plana na face adaxial, nervuras secundárias 5-7 pares, alternas, ascendentes em relação a primária, proeminentes na face abaxial, aplanada na face adaxial, dispostas e atenuadas em direção ao ápice; nervuras intersecundárias presentes, nervura terciárias laterais e axiais.	Espiga 3,1-8,4 x 0,2-0,3 cm, na frutificação atingem 0,6 cm de diâm., alvo-esverdeada, ereta; flores aglomeradas; pedúnculo 0,7-1,2 cm compr., glabro, subestriado; raque glabra, estriada; bractéola convexo-arredondada, peltada-concrescida, glabra com pedicelo piloso; estames 4, anteras oblongas com filetes 1-1,5 mm compr., castanhos; ovário 1,8-2 mm compr., ovado, ovado-elíptico, glabro, estigmas 3, filiformes, reflexos, sésseis. Drupa obpiramidal, trigonal, glabra, estigmas persistentes.	K-1384 (Medeiros, 2006)
Grupo B	15	Ubatuba - SP	Arbustos ou subarbustos, 0,5-4,5 m de altura. Haste decumbentes ou vertical; entrenós superiores glabros com cera epicuticular, 6,7-14,1 cm. Folhas glabras, com grânulos de cera epicuticulares visíveis nas amostras secas. Pecíolo com 18-65 mm de comprimento, canaliculado, às vezes revestindo parcialmente ou completamente o tronco, quando pode ser alado e sulcado por todo comprimento do pecíolo. Lâminas raramente assimétricas, ovadas a cordiforme, 8,6-14,5 cm de comprimento, 6,9-14 cm de largura (taxa média 1:1), coriáceas, glabras em ambas as faces, base raramente assimétrica, obtusa a cordiforme, ápice curto ao longo acuminado; venação com 4-6 pares de nervuras secundárias provenientes da base, e um par a partir da parte inferior da veia central; veias glabras, salientes, de cor amarelada; margem revolutas. Inflorescências em espigas com 6,7-14,1 cm de comprimento, retas, bractéolas (profilo associado) com 10-20 mm, glabro, escuro quando seco.	Flores com brácteas 0,7-0,8 mm de largura, triangular para arredondada, côncava, ciliados branco. Anteras 0,5 mm de comprimento. Fruto obovóide, 0,8-1 mm de largura, trigonal-obpiramidal, glabro; estigmas 3, sésseis a linear, às vezes persistente.	K-1368
Grupo C	14	Teresópolis-RJ	Idem ao grupo D	Idem ao grupo D	K-1329

Tabela 6. Conclusão.

Grupo D	13	Itatiaia - RJ	Folhas com pecíolo 2,5–6,5 cm, estriado e com bainha alada, membranáceo-hialina, percorrendo toda a sua extensão; prófilo 1–2,5 cm compr., lanceolado; lâmina 13–21 × 9,5–21 cm, ovada, base ligeiramente assimétrica, truncado arredondada, às vezes cordada, abruptamente decorrente, ápice agudo, discolor, papirácea, translúcido-glandulosa, glabra em ambas as faces, camptódroma, com 6–8 nervuras secundárias de cada lado, dispostas até o ápice.	Espigas 5,5–8 × 0,5–0,6 cm, opostas às folhas, solitárias, eretas, alvas; pedúnculo 0,8–2 cm compr.; raque glabra; bractéola arredondada, subcrescente-peltada, glabra na parte superior, vilosa na inferior; estames 3; ovário com estilete curto, ca. 0,3 mm compr., ou ausente. Fruto obpiramidal-trigonal, glabro; estigmas 3, curvados.	K-1316 (Monteiro and Guimarães, 2009)

3.6.2. Perfil genético de *P. solmsianum* por análise de microssatélites

O desenvolvimento dos microssatélites para *P. solmsianum* (Tabela 7) foi realizado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) pela doutoranda Paula F. Lima, sob a orientação do Dr. Carlos Colombo. A descrição do desenvolvimento da biblioteca enriquecida de microssatélites, bem como a seleção das colônias e desenho dos iniciadores está detalhada no Anexo 1.

Tabela 7. Iniciadores utilizados para análise de microssatélites em *P. solmsianum*

Iniciador	Repetição	Código GeneBank	Sequências 5'-3'	Alelos (pb)
Psol3	$(TG)_{12}$	JQ924478	D CACGACGTTGTAAAACGACGCGGATCTTACCAGAATCAG R GAGTAGCCTTTGGTTGTTGC	256-272 (8)
Psol6	$(CT)_9(CA)_8$	JQ924481	F CACGACGTTGTAAAACGACCTCTTGGCAAAAGTCACCTG R ATCCCATACCGATCTCCTTC	254-266 (6)
Psol9	$(AC)_8$	JQ924484	F CACGACGTTGTAAAACGACGGAACCCACGAGTTTCTTG R GGGGTCCTTTTTACGTTGAG	180-202 (6)
Psol10	$(TG)_9$	JQ924485	F CACGACGTTGTAAAACGACCAGACGGATTCCCACTGAT R GGACTTGTAACCCATCGAGA	228-238 (5)
Psol11	$(TG)_{10}$	JQ924486	F CACGACGTTGTAAAACGACTTATTTGGTTGGAGCTGTGTG R CCACGGTGGGTTATCACAC	106-118 (6)
Psol15	$(GT)_9$	JQ924490	F CACGACGTTGTAAAACGACCGCGGACTAACCAGAGTTAC R GCCACAAAAACCCACTCA	145-151 (2)
Psol16	$(GT)_7$	JQ924491	F CACGACGTTGTAAAACGACGAAGTCCTAACGGACCTGTG R GAGGTGTTGTTGATGTGAGC	166-214 (3)
Psol17	$(CA)_7$	JQ924492	F CACGACGTTGTAAAACGACTATTCCCATGCGAGATGC R CGGCATAACCACTAAACCAC	392-430 (7)
Psol18	$(GT)_7$	JQ924493	F CACGACGTTGTAAAACGACACTGTTGTGGACCTTGTTGC R TGTATTAGGCCCCATCGAC	152-166 (2)

3.7. Identificação dos genes

Todas as sequências nucleotídicas dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas/fenilpropanoides foram provenientes de *P. solmsianum* e são denominadas pelas iniciais da espécie (Ps) seguida da sigla que designa a classe da proteína alvo. As proteínas resultantes da tradução dos genes de *P. solmsianum* expressos de forma heteróloga são tratadas como recombinantes e designados com a sigla r (recombinante) antes do nome. Esta etapa do trabalho foi realizada durante o período de estágio no laboratório do Institute of Biological Chemistry, WSU, sob supervisão do Dr. Norman G. Lewis.

3.7.1. Materiais, reagentes e enzimas

- Para extração de RNA foi utilizado o kit *Spectrum Plant total RNA* (n^o no catálogo: STRN50, Sigma®) e para síntese de cDNA foi utilizado o *kit SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (n^o cat.: 18080-051, Invitrogen®).
- As reações de PCR foram preparadas com o kit *GoTaq DNA polymerase* (Promega®), com o tampão da enzima já contendo 1,5 mM de $MgCl_2$.
- Os produtos das amplificações foram analisados pelo método de eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ de brometo de etídio, em tampão 1X TAE (80mM Tris; 40mM de ácido acético glacial; 2,5 mM de EDTA; pH 8,3), submetido a tensão de 90V por 30-40 minutos. Em seguida, foram visualizados em luz UV após a migração.
- Para as amostras analisados em gel de agarose, foi utilizado como padrão de tamanho dos fragmentos o 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

- Para purificação dos produtos de PCR recuperados do gel de garose foi utilizado o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen ®).
- As sequências de genes alvos obtidos por reações de PCR foram inseridas em vetores pCR-4, usado para transformar células competentes de *E. coli* TOP 10 utilizando o kit *TOPO TA cloning* (n^{o} cat. K4530-20, Invitrogen®). As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura com o antibiótico de escolha para seleção das colônias resistentes.
- A triagem das colônias recombinantes foi feita por reações de amplificação por PCR de colônia. Esta técnica consiste em encostar nas colônias isoladas com palitos estéreis e inocular nos tubos já contendo o volume final da reação de PCR, com os iniciadores específicos para o inserto e para o vetor, ajustando a temperatura de anelamento de acordo com os iniciadores utilizados. Após a reação, os produtos são recuperados do gel, purificados e enviados para sequenciamento.
- O DNA plasmideal dos clones recombinantes foi preparado usando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega®).
- Para obtenção das sequências completa dos cDNA referentes aos genes alvo, foi utilizado o kit *Smart RACE cDNA amplification* (cat. n°. 634914, Clontech).
- Para os sequenciamentos foi utilizado o kit *DYEnamic ET terminators sequencing* (Amersham Biosciences®) em seqüenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences®).
- As células modificadas de *E. coli* contendo o gene alvo foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB), constituído por 1,0% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de NaCl, em pH 7. O meio de cultura foi autoclavado e,

posteriormente, resfriado a aproximadamente 55°C para adição do antibiótico seletivo. Para as placas, foi adicionado ao meio de cultura 15 $g.L^{-1}$ de ágar antes ser autoclavado, sendo em seguida resfriado a ~55°C para a adição do antibiótico e distribuído nas placas.

- Amostras dos clones contendo os genes alvo foram armazenadas a -80°C em soluções estéreis de glicerol:água 1:1 (v/v).
- As etapas de purificação da proteína foram realizadas em câmara fria a 4°C. O fracionamento cromatográfico dos extratos proteicos foram realizados no sistema de cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC) (GE Healthcare®), com monitoramento a 280 nm.
- O método Bradford (Bradford, 1976) foi empregado para determinar a concentração das proteínas.
- Para analisar as frações proteicas foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de 4-15%, em tampão de Laemmli em condição desnaturante. As proteínas foram visualizadas utilizando prata (Morrissey, 1981).
- Para as análises das proteínas nos géis de poliacrilamida, foi utilizando o BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

3.7.2. Construção dos oligonucleotídeos

A estratégia adotada para o desenho dos iniciadores para amplificação dos genes de interesse foi selecionar sequências de nucleotídeos e proteínas da classe das acetiltransferases, propenilfenol sintases e proteínas dirigentes, identificar regiões conservadas e desenhar os *primers* para estas regiões. Um exemplo da estratégia de amplificação é o alinhamento das sequências de

nucleotídeos que codificam para proteína dirigente em *Forsythia intermedia* e *Schizandra chinensis* (Figura 8), com localização dos iniciadores nas regiões conservadas.

```
                                10        20        30        40        50        60        70        80
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          -------ATGGTT--TC--TAAAACACAA--ATTGTAGCTCTTTTCCTTTGCTTCCTCACTTCCACCTC-----TTCCG-
S. chinensis           -------ATGGAAGGGAGAAAGCTGATCATCACTATCCCTCTCCTCCTCTTCTTCATTGCCTTCTTCTCAGTGCCTCCGG
Clustal Consensus              ****          *    *  *  * * *  ****  **** * **** *  * * *  ***      ****

                                90       100       110       120       130       140       150       160
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          CCACCTACGGCCGCAA---GCCACGCCCTCGC------------CGGCCCTGCAAAGAATTGGTGTTCTATTTCCACGAC
S. chinensis           CTGCGTTTGGCCGGAAAGTGACACTTCCCCGTAAAAGGATGCCGCAACCATGCATGAACTTGGTGTTTTACTTCCACGAC
Clustal Consensus      *  * *  ***** **   * ***  ** **             *  ** ****   * ******** ** *********

                               170       180       190       200       210       220       230       240
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          GTACTTTTCAAAGGAAATAATTACCACAATGCCACTTCCGCCATAGTCGGGTCCCCCCAATGGGGCAACAAGACTGCCAT
S. chinensis           ATCTTATACAACGGCAAGAATGCTGCCAATGCAACTTCGGCGATTGTCGGGTCGCCGGCATGGGGGAACCGGACCATTCT
Clustal Consensus       *  * * *** ** ** ***     ****** ***** ** ** ******** **   ****** ***  ***     *

                               250       260       270       280       290       300       310       320
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          GGCCGTGCCATTCAATTATGGTGACCTAGTTGTGTTCGACGATCCCATTACCTTAGACAACAATCTGCATTCACCCCCAG
S. chinensis           AGCTGGACAAAGCAATTTTGGTGACATGGTCGTATTTGATGACCCGATTACTCTTGACAACAATCTGCATTCGCCCCCCG
Clustal Consensus       ** *  * *  ***** ******* * ** ** ** ** ** ** *****  * ***************** ***** *
                                                                          primer direto
                               330       340       350       360       370       380       390       400
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          TGGGTCGGGCGCAAGGGATGTACTTCTATGATCAAAAAAATACATACAATGCTTGGCTAGGGTTCTCATTTTTGTTCAAT
S. chinensis           TTGGTCGTGCGCAGGGATTCTACTTCTACGACAGGAAGGATGTATTTACCGCGTGGCTAGGCTTCAGTTTCGTCTTCAAC
Clustal Consensus      * ***** ***** **  * ******** **    **  **  **  *  ** ******** ***   **  * *****

                               410       420       430       440       450       460       470       480
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          TCAACTAAGTATGTTGGAACCTTGAACTTTGCTGGGGCTGATCCATTGTTGAACAAGACTAGAGACATATCAGTCATTGG
S. chinensis           AATTCAGACTACAGGGGGAGTATAAATTTTGCTGGCGCAGATCCACTTTTGATCAAGACGAGGGACATCTCTGTGATCGG
Clustal Consensus          *  * **    ** *   * ** ******** ** ****** * **** ****** ** ***** ** ** ** **

                               490       500       510       520       530       540       550       560
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          TGGAACTGGTGACTTTTTCATGGCGAGAGGGGTTGCCACTTTGATGACCGATGCCTTTGAAGGGGATGTGTATTTCCGCC
S. chinensis           TGGCACCGGCGATTTTTTCATGGCTAGAGGGATCGCGACATTGATGACAGATGCCTTCGAGGGTGAGGTGTATTTCAGGC
Clustal Consensus      *** ** ** ** *********** ****** * ** ** ******** ******** ** ** ** ********* * *
                                                                          primer reverso
                               570       580       590
                       ....|....|....|....|....|....|....|
F. intermedia          TTCGTGTCGATATTAATTTGTATGAATGTTGGTAA
S. chinensis           TGAGGACAGATATCAAGCTGTATGAATGCTACTGA
Clustal Consensus      *  *    ***** **  ********** *  * *
```

Figura 8. Alinhamento das sequências de nucleotídeos que codificam proteínas dirigentes em *Forsythia intermedia* e *Schizandra chinensis* (números de acesso AF210061 e HQ428029, respectivamente). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW).

3.7.3. Estratégias para amplificação dos genes

A abordagem experimental para a amplificação dos genes resumiu-se em utilizar dois iniciadores internos baseados em regiões bastante conservadas dentro das sequências utilizando cDNAs como molde para as reações de PCR. Após as reações de PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8%, e as bandas amplificadas que apresentaram tamanho esperado para os fragmentos foram excisados do gel e purificados. Esses produtos foram inseridos no vetor pCR-4 e enviados para sequenciamento.

As sequências amplificadas foram comparadas com outras já descritas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), nas buscas com as ferramentas *nucleotide Blast* (busca por nucleotídeos similares em banco de dados de nucleotídeos) e BlastX (que busca informações de proteínas a partir de nucleotídeos traduzidos). As regiões amplificadas que apresentaram similaridade acima de 50% com o gene ou proteína alvo foram consideradas promissoras, sendo submetidas à amplificação do cDNA completo pela técnica *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE).

3.7.4 Acetiltransferase (AcT)

Para a amplificação da região do gene acetiltransferase em *P. solmsianum* (PsAcT), foram desenhados iniciadores degenerados (Tabela 8) baseados em sequências de peptídeos descritas para *Petunia hybrida* PhCFAT (n^{o}. de acesso ABG75942) (Dexter et al., 2007) e *Larrea tridentata* (Vassão et al., 2007). O tamanho esperado para os produtos de PCR foram: AcT Dir1 + AcT Rev1 = 750 pb e AcT Dir2 + AcT Rev1 = 400 pb.

Tabela 8. Iniciadores utilizados para amplificação do gene AcT em *P. solmsianum.*

Iniciador	Sequência (5'-3')
AcT Dir1	5'-CAYMGHGTBGCHGAYGCHTAY-3'
AcT Dir2	5'-GARTGYTTYWSHGCHTTYYTNTGG-3'
AcT Rev1	5'-GGCATNGGCATNACRTANCC-3'

3.7.4.1. Teste dos iniciadores

As reações de PCR foram preparadas com 2 µL de cDNA; 1 U de *GoTaq DNA polymerase* (Promega®); 10 mM de dNTPs; 10 µM de cada iniciador e 1,5 mM de cloreto de magnésio, com volume final de 20µL. O programa de PCR com gradiente de temperaturas de anelamento (Tabela 9) utilizado para os testes com os iniciadores foi: 96°C por 3 minutos; 45 ciclos de 96°C por um minuto, 60°C-40°C por um minuto e 72°C por um minuto, e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Tabela 9. Temperaturas de cada uma das linhas do termociclador.

Linhas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperaturas (°C)	40	40.5	41.5	43.2	45.5	48.4	51.7	54.6	56.8	58.4	59.6	60.0

3.7.4.2. Clonagem e sequenciamento dos amplificados AcT

As bandas mais promissoras foram recuperadas dos géis, inseridas no vetor pCR-4 e transformadas em *E. coli* Top 10. O *screening* das colônias com inserto foi realizado por reações de PCR utilizando os iniciadores correspondentes às regiões de interesse: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos. As bandas com tamanho esperado foram recuperadas do gel e enviadas para sequenciamento.

3.7.5. Propenilfenol sintase (PsPPS)

Para a obtenção do gene PPS em *P. solmsianum* foram testados iniciadores baseados em sequências já descritas na literatura para isoeugenol sintase de *P. hybrida* PhIGS (n^o acesso: ABD17322) (Koeduka et al., 2008; Louie et al., 2007). A primeira informação sobre o gene foi obtida com a amplificação utilizando iniciadores degenerados direto PPS Dir-1 5'-GGHGSHACHGGHTAYATHGG-3' e inverso PPS Rev-2 5'-ARRTARTYNACRAARTADGC-3' para gerar uma sequência de aproximadamente 400 pb. O BlastX apresentou similaridade com propenilfenol sintases.

A sequência completa do cDNA foi obtida empregando-se a técnica RACE, e confirmada através reação de PCR preparada com 2 µL de cDNA; 1 U de *Taq Pfu Turbo DNA Polymerase* (Stratagene®) termoestável e de alta fidelidade; 10 mM de dNTPs; 10 µM de cada iniciador e 1,5 mM de $MgCl_2$ com volume final de 20µL. Os iniciadores utilizados foram PPS2 Dir 5'-TTATGGATATGGTGAGAAGTCGAATTC-3' e PPS2 Rev 5'-CGGTTCCGCAACCGGTGATGCATTCACACAC- 3'. A amplificação foi realizada com o sistema termociclador modelo MyCycler Thermal Cycler (BioRad), com duas programações diferenciadas pelas temperaturas de anelamento: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos; 29 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C (reação 1) ou 60°C (reação 2) por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto; e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. A sequência completa do gene foi inserida no vetor pCR-4 e sequenciada para confirmação.

3.7.5.1. Construção do vetor para expressão heteróloga do gene PsPPS

Para expressão da proteína recombinante, o gene PsPPS foi inserido no vetor de entrada pENT/TEV/D-TOPO. Este foi recombinado através da reação com as enzimas *LR clonase* com o vetor de destino pET 54, fundido com uma cauda His-Tag na porção N-terminal da sequência codificante (*Gateway LR clonase II enzyme mix* e *Gateway Nova pET-54-DEST*, Invitrogen®). O vetor pET 54 contendo o PsPPS foi usado para transformar as células de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot® Chemically Competent utilizando o kit pET Directional TOPO Expression (n^{o} cat.: K101-01, Invitrogen®). Todas estas tapas foram realizadas seguindo os protocolos do fabricante.

3.7.5.2. Seleção das bactérias contendo os plasmídeos recombinantes

As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 15 mL de meio seletivo LB suplementado com o antibiótico carbanicilina a 100µg.mL^{-1}, e incubadas overnight em estufa a 37°C.

Após o período de incubação, algumas colônias resistentes foram selecionadas para realizar o PCR de colônia. Ao final da reação de PCR os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose, e os que continham o fragmento de tamanho esperado foram selecionados para extração do DNA plamideal e enviados para sequenciamento para confirmação.

3.7.5.3. Expressão heteróloga da proteína recombinante rPsPPS

Para realizar os ensaios de expressão, foram preparados pré-inóculos das colônias das células BL21 (DE3) contendo o plasmídeo com o PsPPS, selecionadas em meio sólido com antibiótico e confirmadas por PCR.

Quatro colônias (A-D) foram selecionadas para análise dos níveis de expressão em diferentes condições de crescimento. Estas colônias foram repicadas, individualmente, em 5mL de LB contendo o antibiótico carbanicilina a 100µg.mL^{-1}, Os tubos foram incubados *overnight* a 37 ºC em estufa sob agitação de 250 rpm, até densidade óptica mensurada a 600 nm (*optical density*, OD_{600}) de 1,5.

As culturas foram então diluídas na proporção de 1:100 com 5 mL de LB líquido contendo carbanicilina e crescidas, novamente, a 37°C durante aproximadamente 3 horas até alcançar OD_{600} de 0,5. Uma alíquota de 100 µL desta cultura foi armazenada em -80°C em solução aquosa de glicerol:água 50%. O restante das culturas foram induzidas com isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG) a 0,5 M. As colônias A e B foram mantidas em crescimento por 3 horas a 37°C e as colônias C e D foram mantidas em crescimento por 15 horas a 18°C. Após os períodos de incubação, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min a 4°C e os *pellets* foram armazenados a -20°C por pelo menos 5 horas para facilitar a lise das células. Os *pellets* foram descongelados a 37°C e ressuspensos em 2 mL do reagente *BugBuster Protein Extraction Reagent* (Novagen) contendo 2,5 µL da nuclease benzonase (25 unidades/µL) e 0,2 µL da solução de rLysozyme (30 kilounidades/µL). Após a incubação à temperatura ambiente por 5 minutos em agitação lenta, as suspensões celulares foram deixadas em gelo por 30 minutos, sendo então centrifugadas a 13000 rpm por 25

minutos para eliminar a fração insolúvel. Os sobrenadantes foram armazenados para análise da expressão. As frações insolúveis foram resuspensas em solução de uréia 8 M e também foram analisadas quando a presença da proteína recombinante.

As colônias que apresentaram maiores níveis de expressão da proteína recombinante foram cultivadas em maior escala, de 250 mL de meio LB com carbanicilina. Todos os demais procedimento de cultivo foram idênticos aos descritos acim, e para a extração das proteínas foi utilizado 20 mL do reagente *BugBuster* contendo 25 µL de benzonase e 2 µL de rLysozyme.

3.7.5.4. Cromatografia de afinidade em resinal de níquel

Para a purificação da proteína rPsPPS contendo cauda de poli-histidina foi utilizada cromatografia de afinidade em metal. Os íons metálicos são imobilizados à fase fixa por um agente quelante, que disponibiliza o metal e permite a aderência da proteína recombinante com cauda de poli-histidina à fase fixa. Após a eluição das demais proteínas, a proteína recombinante é eluída da coluna utilizando uma solução contendo imidazol, que tem maior afinidade ao níquel (Ni^{+2}) do que a histidina. As dimensões da coluna são 4,6 mm de diâmetro interno x 100mm de comprimento, preenchida com a resina POROS MC 20 (Life Technology®). O programa utilizado consiste em uma etapa inicial para equilibrar a coluna com 10mL do tampão Tris-HCl (20mM de Tris-HCl, 200 mM de NaCl, pH 7,9), seguido de 5 mL do tampão contendo 500mM de EDTA, novamente 10mL do tampão Tris-HCl para eliminar o excesso de EDTA, seguido de 10 mL da solução de solução aquosa de sulfato de níquel a 100mM, e por fim 10 mL do tampão Tris-HCl. A próxima etapa foi injetar 5 mL da amostra na

coluna (500µg do extrato proteico), seguida de uma etapa de lavagem com 10 mL do tampão Tris-HCl para eluir as proteínas não ligadas. Para eluição da proteína recombinante, foi utilizado um gradiente inicial de imidazol variando de 0 a 500mM. A proteína rPsPPS foi eluída em aproximadamente 350 mM de imidazol.

3.7.5.5. Ensaio de conversão enzimática com rPsPPS

A fração purificada da enzima foi testada quanto à capacidade de catalizar a formação do isoeugenol a partir do acetato de coniferila. Para a reação, com volume final 200 µL em solução contendo 50mM do tampão Mes-KOH (pH 6,5), foram utilizados 5 µg da fração proteica com rPsPPS, 1mM do precursor acetato de coniferila e 1mM de NADPH. A reação foi finalizada após 30 minutos de incubação a 28°C e os produtos foram extraídos com hexano (3 X 500µL). Como controle foi preparada uma reação contendo todos os componentes com exceção à enzima recombinante. Todos os padrões e produtos foram analisados em UPLC-UV, utilizando o método 1 (**item 3.1**).

3.7.6. Proteína dirigente

A primeira informação de proteína dirigente em *P. solmsianum* foi obtida da amplificação de um fragmento de 300 pb da região, utilizando-se iniciadores degenados PD degen. Direto 5'-KGTGTTYGAYGAYCCYATTACYBTWGACAAC-3' e PD degen. Reverso 5'-GAAATAAACATCTCCYTCAWATGMATCRGT-3' (Xia et al., 2000). A região amplificada apresentou BlastX para proteína dirigente. Para obtenção da sequência completa do cDNA de proteína dirigente foi utilizado a técnica RACE e confirmada por PCR preparada com 2 µL de cDNA; 1 U de

Taq Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene®, EUA) termoestável e de alta fidelidade; 10 mM de dNTPs; 10 µM de cada iniciador e 1,5mM de cloreto de magnésio com volume final de 20µL. Os iniciadores utilizados foram PD Direto 5'-ATGGAAATTAGTAGCAGCAAAGTTCATC-3' e PD Reverso 5'-TTAATAACACTCATATAGCTTGATATC-3', com o programa: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos. A sequência completa do gene foi clonada no vetor pCR4 e sequenciada para confirmação.

3.7.6.1. Construção do vetor para expressão heteróloga do gene PsPD

Após a obtenção e confirmação da sequência codificante do gene PsPD, esta foi tratada para a inserção no vetor pART17, indicado para a clonagem em células de plantas (Gleave, 1992).

Para a ligação do produto de PCR no vetor de clonagem pART17 foi necessária a modificação prévia da sequência do gene através da introdução de sequências complementares das enzimas de restrição *Eco*R1 e *Hind*III. Os primers utilizados foram: PsPD+*Eco*R1 Direto 5'-CGAATTCATGGAAATTAGTAG-3' e PsPD+*Hind*III Reverso 5'-CAAGCTTTTAATAACACTCATATAGCTT-3', com as mesmas condições da PCR descritas acima. Os produtos da reação foram inseridos no vetor pCR-4 e confirmados por sequenciamento (Figura 9).

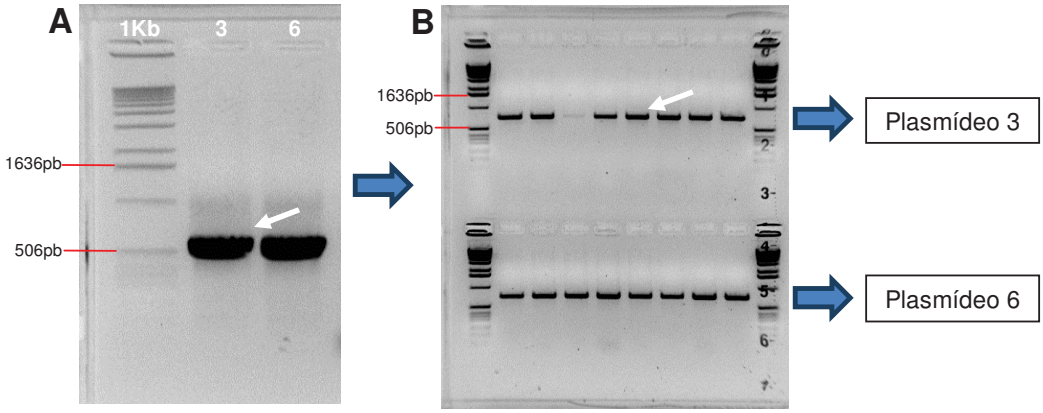


Figura 9. Inserção das regiões de corte das enzimas de restrição *Eco*R1 e *Hind*III na sequência de PsPD. **A**: Amplificação do gene PsPD com regiões de corte. **B**: Plasmídeos pCR-4 para sequenciamento.

Uma amostra do vetor pART17, mantido em células *E. coli* Top 10 a -80°C, foi plaqueada em placa de Petri contendo meio LB com o antibiótico carbanicilina a 100 µg.mL^{-1} e mantida em estufa a 37°C *overnight*. Após esse período, as colônias selecionadas foram submetidas a extração e purificação dos plasmídeos. O mesmo procedimento foi empregado para as bactérias contendo o gene PsPD e ambos plasmídeos purificados foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição *Eco*R1 e *Hind*III (BioLabs), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (Figura 18).

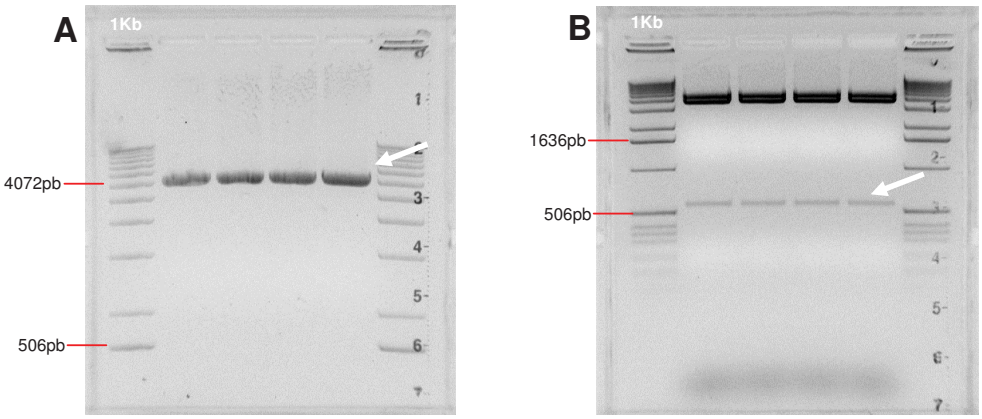


Figura 10. Digestão com enzimas de restricão *Eco*R1 e *Hind*III. **A**: plasmídeo linear pART17. **B**: gene PsPD com os sítios de restrição.

Para a reação de ligação entre o gene PsPD e o vetor, foi utilizado o kit *Rapid DNA ligation* (nº cat.: 1635379, Roche®), de acordo com o protocolo do fabricante. O produto da reação de ligação foi subclonado em *E. coli* Top 10 e sequenciado para confirmação, com os iniciadores para o plasmídeo pART17: OCS Rev 5'-GAGCTACACATGCTCAGG-3' e 35S Dir 5'-CTGACGTAAGGGATGACG-3' e para o gene alvo. Após o sequenciamento para confirmar a integridade da ligação e da sequência do gene, os plasmídeos pART17 contendo o gene foram extraídos e purificados para o procedimento de biobalística.

3.7.6.2. Biobalística

O vetor pART17 contendo a sequência de proteína dirigente de *P. solmsianum* foi inserido nas células de tomate (*Lycopersicon peruvianum*) (Hellwig et al., 2004) através do método de biobalística, que consiste em aderir o gene alvo a partículas biologicamente inertes de ouro e bombardeá-las sob alta pressão através das células cultivadas (Kikkert et al., 2004). As células de

tomate foram cultivadas em 20 mL de meio LP líquido composto por meio Murashige-Skoog (pH 5,0), contendo vitaminas Nitshe (110 $mg.L^{-1}$), tiamine (0,2 $mg.L^{-1}$), mioinositol (20 $mg.L^{-1}$), ácido α-naftaleno acético (5$mg.L^{-1}$), 6-benzilaminopurina (1 $mg.L^{-1}$) e sacarose (30 $g.L^{-1}$). Após 7 dias de culltivo, o meio LP foi substituído por meio fresco, gentilmente agitado por 10 minutos para lavagem das células, sendo removido e novamente reposto por 10 mL de meio fresco. A supensão das células (2 mL) foram transferidas para placas de 6 cm de diâmetro contendo o meio LP sólido, utilizadas no bombardeamento. O gene PsPD, clonado no vetor pART17, foi aderido a partículas de ouro de 1 µm (gold microcarriers, BioRad®) através da precipitação por cálcio-espermidina. A biobalística foi realizada com as seguintes condições: 27mm de Hg na câmara de vácuo, pressão do gás He de 1100 psi no bombardeamento e 6 cm de distância das placas em sistema PDS-1000/He system (BioRad®).

As células transformadas (2mL) foram recuperadas das placas após 24 horas, transferidas para 6 mL de meio LP fresco e incubadas em shaker orbital (100 rpm; 25 °C) por uma semana. As células foram então selecionadas em placas contendo o meio LP e canamicina a 75 $\mu g.mL^{-1}$. Após 15 dias do bombardeamento, foi observada a diferenciação de algumas células, cujo crescimento se sobressaia da cultura (Figura 11). Essa células, que contêm o inserto e o gene de resistência, foram transferidas para novas placas e cultivadas sob luz em estufa a 37°C para formação de calos.

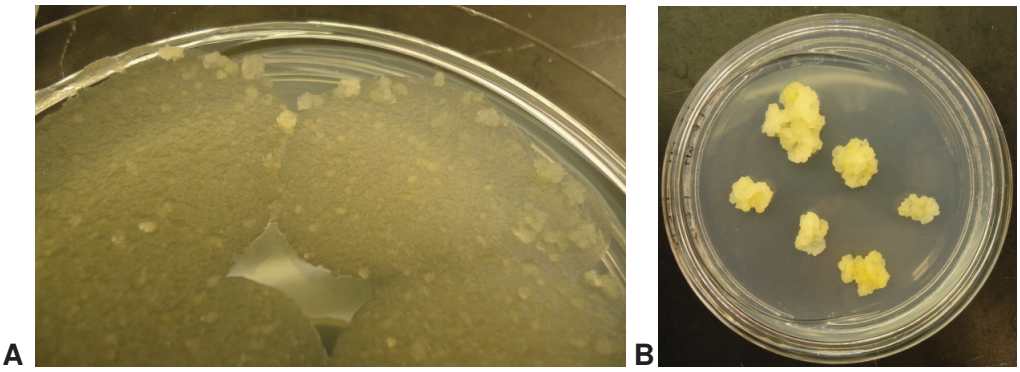


Figura 11. **A:** Placas de meio LP seletivo contendo as células de tomate 5 dias após o bombardeamento. **B:** Calos selecionados, após 21 dias de crescimento.

Os níveis de expressão do gene PsPD foram analisados por PCR utilizando iniciadores específicos para o gene. Os calos com maiores níveis de expressão foram selecionados para o preparo das suspensões celulares e mantidos em placas de meio LP com canamicina 75 $\mu g.mL^{-1}$. A suspensão celular foi preparada inoculando um calo em 10 mL de meio LP com canamicina. A suspensão celular teve a escala de produção aumentada através de inoculação das células em novo meio, com intervalos de crescimento de 7 dias, até 6L. Cinco dias após a inoculação final, as células foram colhidas por filtração a vácuo (papel filtro Whatman n° 5) e a fração de proteínas ligadas à parede foi obtida por filtração após agitação com tampão fosfato (0,1 M, pH 5,0) contendo 75 mM e 150 mM KCl, respectivamente. As frações foram combinadas e submetidas a fracionamento em coluna *SP-Sepharose fast flow* (GE Healthcare®) (80mL). As proteínas foram eluídas com o tampão fosfato 0,1 M (pH 5,0) contendo 1M de NaCl, e submetidas a precipitação em gradiente de $(NH_4)_2SO_4$, seguidas de centrifugação a 10.000 rpm a 4°C por 30 minutos. O *pellet* contendo as proteínas foram armazenados a -20°C até o fracionamento.

3.7.6.3. Purificação da proteína rPsPD

O perfil das proteínas em gel de poliacrilamida indicou bandas com o tamanho esperado para a rPsPD nas frações precipitadas com 40-80% de $(NH_4)_2SO_4$. Essas frações foram ressupensas em 30 mL de tampão MES 40mM, pH 5,0 (tampão A), concentradas e desalinizadas em *Centricon plus*-70 10K (nº cat.: UFC701008, Millipore®) a um volume final de 350 µL. Este extrato proteico (~20 mg de proteínas totais) foi fracionado em coluna Mono-S 5/50 *column* (5 × 50 mm, GE He.lthcare®) pré-equilibrada em tampão A com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$. Para eluição das proteínas, foi utilizado um gradiente de 0 a 333 mM de Na_2SO_4 (tampão B, 40mM de MES, 333 mM Na_2SO_4, pH 5,0). O gradiente utilizado está descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Gradiente de eluição utilizado na FPLC.

Tempo (min)	% tampão B
0,01	0
7	0
8	40
34	40
34	50
68	50
68	60
100	60
100	70
140	70
140	100
180	100
184	0

A fração contendo a proteína de tamanho esperado para rPsPD foi eluida com aproximadamente 200 mM Na_2SO_4. Estas frações foram concentradas e desalinizadas como descrito anteriormente, a um volume de 250 µL. As proteínas foram aplicadas em coluna Superdex 75 HR 10/30 (Amershan

Biosciences), pré-equilibrada com tampão fosfato 0,1 M contendo 150mM de KCl (pH 5,0), e em modo isocrático (fluxo 0,5 $mL.min^{-1}$). A proteína rPsPD foi eluida com aproximadamente 25 mL. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida.

3.7.6.4. Ensaio de conversão enzimática com rPsPD

A conversão enzimática foi realizada utilizando-se 200 µg de rPsPD, lacase isolada de *Trametes versicolor* como agente oxidante, 720 µM de álcool coniferílico como substrato, em tampão MES 40mM (pH 5,0), em uma reação com volume final de 250 µL. Após a incubação sob agitação por 4 horas a 28°C, a reação foi extraída com acetato de etila (500 µl × 2), as frações orgânicas foram secas a vácuo, resuspensas em MeOH:H_2O (1:1 v/v) e analisadas por UPLC-UV, utilizando o método 2 (**item 3.1**). Como controle, foi preparada uma reação contendo todos os componentes, com exceção à rPsPD.

3.7.6.5. Amplificação do gene de proteína dirigente em espécies de *Piper*

Para as análises da proteína dirigente das espécies *P. solmsianum*, *P regnellii, P. cernuum* e *P. cubataonum,* o DNA de cada espécie foi extraído a partir de folhas frescas, conforme procedimentos descritos no **item 3.3.2**. Para a reação de PCR foi utilizado o par de iniciadores PD-Direto: 5′-KGTGTTYGAYGAYCCYATTACYBTWGACAAC-3′ e PD-reverso: 5′-GAAATAAACATCTCCYTCAWATGMATCRGT-3’ (Xia et al., 2000).

Para a reação de amplificação foram usados 1 µL de DNA, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 1µM de cada iniciador e 0,25 µL de Taq DNA

polimerase. A reação em termociclador seguiu a programação: 1 ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 8 minutos; 35 ciclos de: desnaturação a 96°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos, extensão 72°C por 2 minutos; e 1 ciclo final de extensão a 72°C por 1 minuto.

3.7.6 6. Perfil químico e de expressão dos genes PsPPS e PsPD

Os amostras dos tecidos e de folhas jovens e maduras de *P. solmsianum* (K-1368) foram coletadas dos indivíduos 1 e 2 cultivados na estufa do IBC-WSU, Pullman. Para análise do perfil de expressão por qPCR, as amostras foram imediatamente congeladas em N_2 líquido e submetidas à extração do RNA. Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA. As reações foram preparadas com o kit Platinum SYB Green qPCR supermix-UDG (nº cat.: 11733-038, Invitrogen®) e as análises foram realizadas em um sistema a MX3005PTM Real-Time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA). Os resultados foram analisados com o software MxPro (Stratagene, La Jolla, CA). Os iniciadores utilizados nesta análise estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Sequência dos iniciadores para PsPPS e PsDP utilizados na qPCR.

Iniciadores	Sequências	Tamanho do amplicon (pb)
PsPPS		
PPS Rev	5'-CTATGACAGGAAAGATGAGTACAC-3'	280
PPS Dir	5'-CTTCATAAGCATCGGTACTAATGG-3'	
PsDP		
DP Rev	5'-CTTCAGAGTATGGACATGAAGTGG-3'	250
DP Dir	5'-GATCTGTGGGTGGAGTAGATAGT-3'	
18S		
18S Rev	5'-TCCTATTGTGTTGGCCTT-3'	300
18S Dir	5'-GCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	

Para a análise do perfil químico, as amostras em triplicata foram liofilizadas por 12 horas. O material seco foi pulverizado com N_2 líquido. Alíquotas de 100 mg do material foram extraídas com 10 mL de acetato de etila. Para a quantificação relativa dos compostos, foi adicionado 50 µL da solução de (+/-)-pinoresinol (3,7 $mg.mL^{-1}$) em cada extrato. Foi construída uma curva analítica com o padrão pinoresinol, na concentração 0,08; 0,4 e 4 $mg.mL^{-1}$ (Figura 12). O material foi submetido ao ultrassom por 30 segundos e deixado em maceração no escuro a temperatura ambiente por 3 dias. Os extratos e padrões foram analisados por CLAE-UV e RMN de ^1H (Figuras 13 e 14, respectivamente).

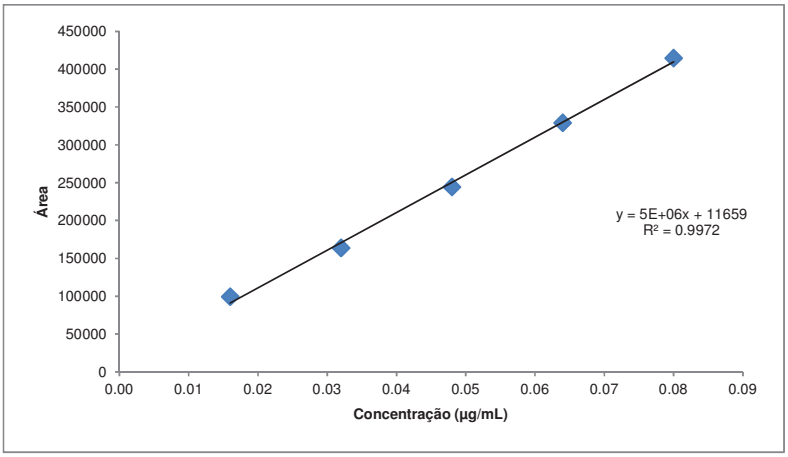


Figura 12. Curva de calibração do padrão pinoresinol, obtida por CLAE-UV (280nm).

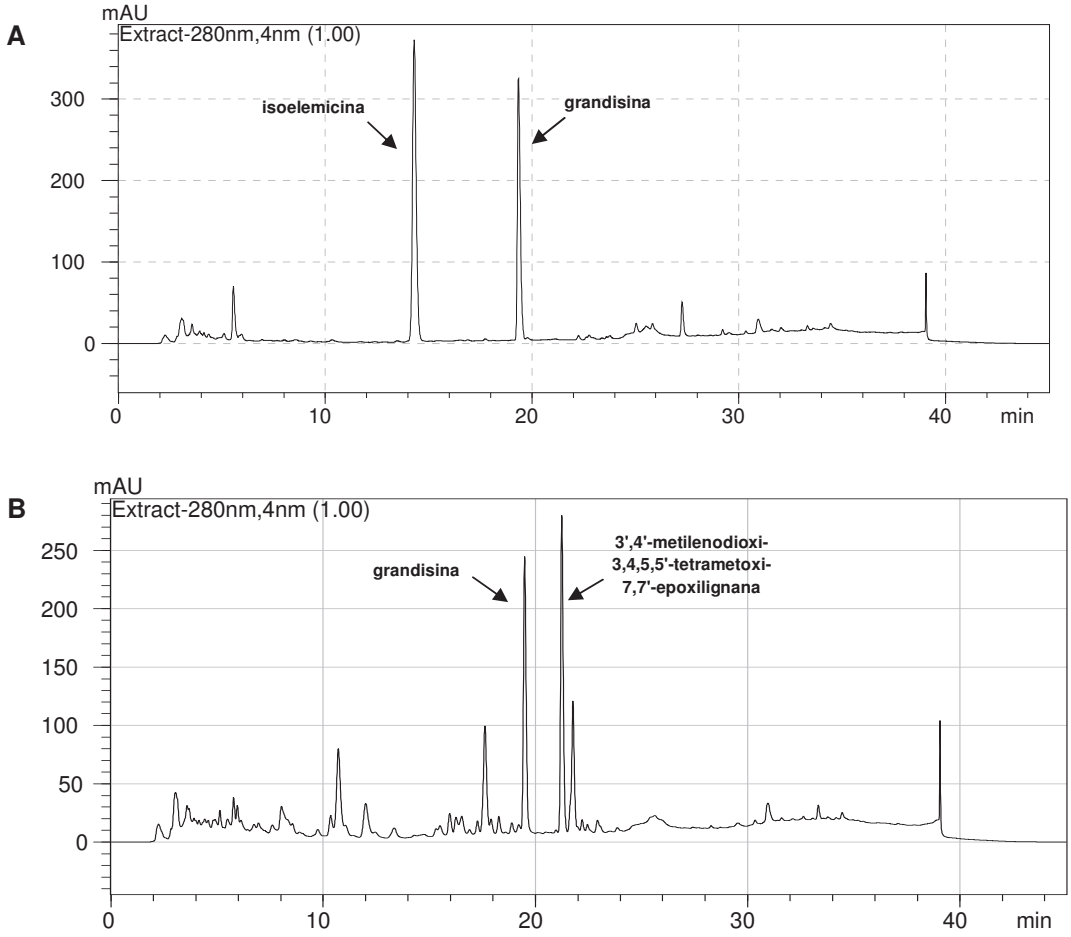
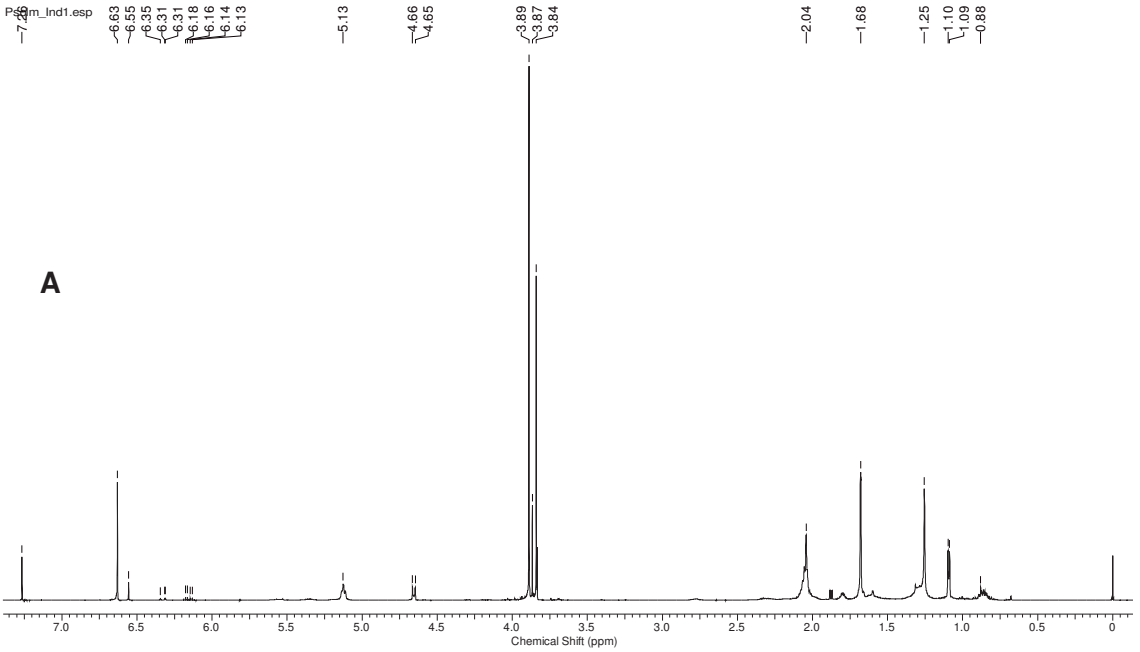


Figura 13. Cromatograma CLAE-UV (280 nm) do extrato das folhas de *P. solmsianum*, dos indivíduos 1 (**A**) e 2 (**B**) (método no **item 3.1**).

Acquisition Time (sec)	4.0894	***Comment***	Nidia_Pipersolmsianum1_leavesEtOAcext_1H_30Aug2011			***Date***	30 Aug 2011 11:47:28
Date Stamp	30 Aug 2011 11:47:28			***File Name***	C:\Users\nidiayoshida\Psolmsianum\extracts\1\fid		
Frequency (MHz)	500.13	***Nucleus***	1H	***Number of Transients***	128	***Origin***	spect
Original Points Count	32768	***Owner***	root	***Points Count***	32768	***Pulse Sequence***	zg
Receiver Gain	35.90	***SW(cyclical) (Hz)***	8012.82	***Solvent***	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	3493.4795	***Spectrum Type***	STANDARD	***Sweep Width (Hz)***	8012.58	***Temperature (degree C)***	25.000



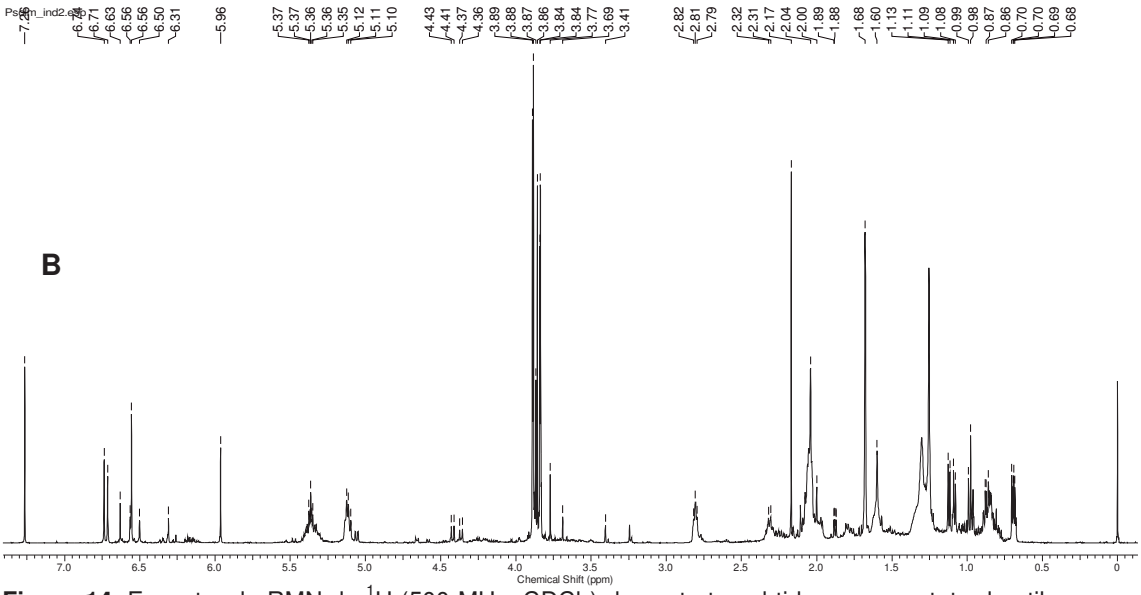


Figura 14. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) dos extratos obtidos com acetato de etila das folhas de dois indivíduos de *P. solmsianum.* **A**: indivíduo 1. **B**: indivíduo 2. Ambos espectros foram adquiridos nas mesmas condições de análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise filogenética e distribuição dos principais metabólitos secundários em espécies de *Piper*

Com o intuito de investigar os padrões de diversificação entre as espécies de *Piper*, foi realizada uma análise filogenética da região de DNA nuclear ITS (internal transcribed spacer) e *psbA-trnH* (*ch*DNA), através do método de máxima parcimônia e análise Bayesiana. Embora a região *psbA-trnH* consista em uma alternativa de marcador para análise filogenética, a politomia gerada na análise desta região amplificada para *Piper* não ofereceu diferenciação satisfatória entre as espécies (Apêndice 4, Figura 96).

As seqüências da região de ITS estão sendo descritas pela primeira vez para as espécies da região Neotrópicos: *P. arborescens*, *P. permucronatum, P. magnificum, P. malacophyllum, P. regnellii* (Figura 15), *P. reitzii, P. pellitum, P. hemmendorffii, P. Lhotzkycuyabanum*, *P. aleyreanum P. carniconnectivum, P. Lucaenum* e *P. mikanianum* (Apêndice 4, Fig. 99).

O resultado da análise das sequências de ITS foi bastante congruente com análises anteriores que empregaram dados moleculares juntamente com dados de morfologia floral, a fim de determinar o padrão de diversificação em *Piper* (Jaramillo et al., 2001, Jaramillo et al., 2008). As novas espécies foram distribuídas nos clados previamente determinados de acordo com a origem geográfica e características morfológicas de cada indivíduo. Entretanto, quando se considera a ocorrência e distribuição das principais classes de metabólitos secundários nos clados de *Piper*, foi possível constatar um padrão de distribuição relativamente restrito (Figuras 16-19).

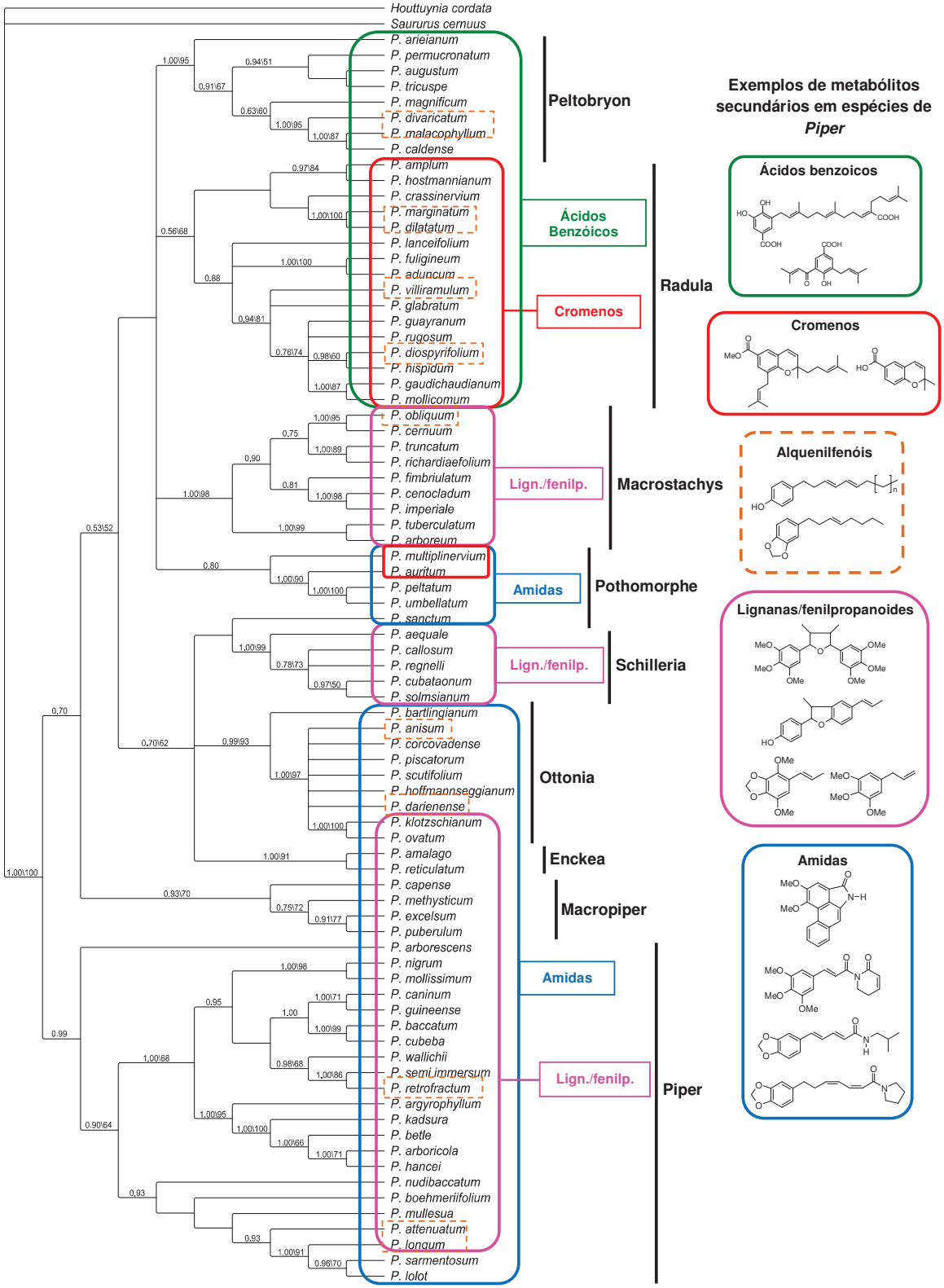


Figura 15. Árvore mais parcimoniosa baseada em sequências de ITS em *Piper*. *Saururus* e *Houttuynia* foram usadas como grupos externos. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia/valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número

total de caracteres da matriz: 716, dos quais 116 foram eliminados. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap* = 1000; comprimento da árvore = 1412 passos; índice de consistência (CI) = 0,532; índice de homoplasia (HI) = 0,370; índice de retenção (RI) = 0,720; algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 282; 200 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1592. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportion invariant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 59000. Barras verticais (em negro) indicam seções do gênero *Piper* (Jaramillo *et al.,* 2001). Em cores, destaca-se as classes de metabólitos secundários produzidos pelas espécies (reconstrução de caracteres químicos **seção 4.1.1.**).

4.1.1. Reconstrução dos caracteres químicos em *Piper*

A reconstrução de caracteres ancestrais consiste em mapear os caracteres sobre a árvore filogenética e obter inferências sobre seu estado ancestral. Esta análise é baseada no princípio de parcimônia, ou seja, avaliando os estados que requerem o menor número de mudanças evolutivas para levar ao estado de caracter observado (Schmitt and Barker, 2009; Wink and Mohamed, 2003). Este método é considerado uma abordagem importante para compreender as origens dos caracteres e os fatores evolutivos que levaram os organismos vivos a desenvolvê-los.

A reconstrução dos caracteres químicos em *Piper* realizada sobre a árvore filogenética mais parcimoniosa baseada na região de ITS (Figuras 27-30) permitiu reconstruir a história evolutiva de espécies de *Piper* (Cunningham, 1999; Royer-Carenzi et al., 2013).

Para esta análise foram selecionadas 40 espécies brasileiras e foram incluídas 40 outras espécies de *Piper* que ocorrem em diversos países. Foram selecionadas apenas as espécies cujo perfil fitoquímico já havia sido descrito.

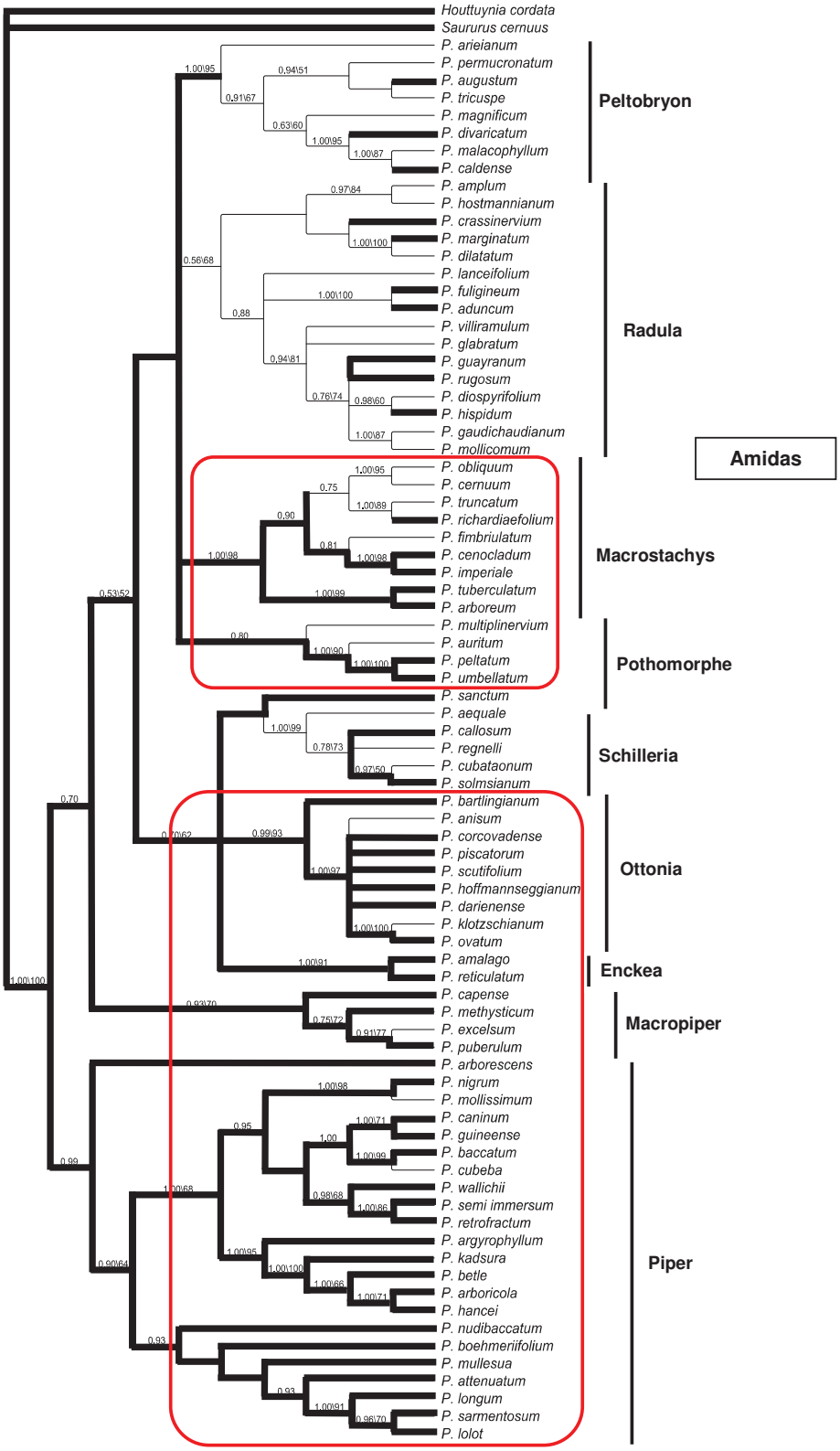


Figura 16. Reconstrução do caracter químico amida sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem amidas.

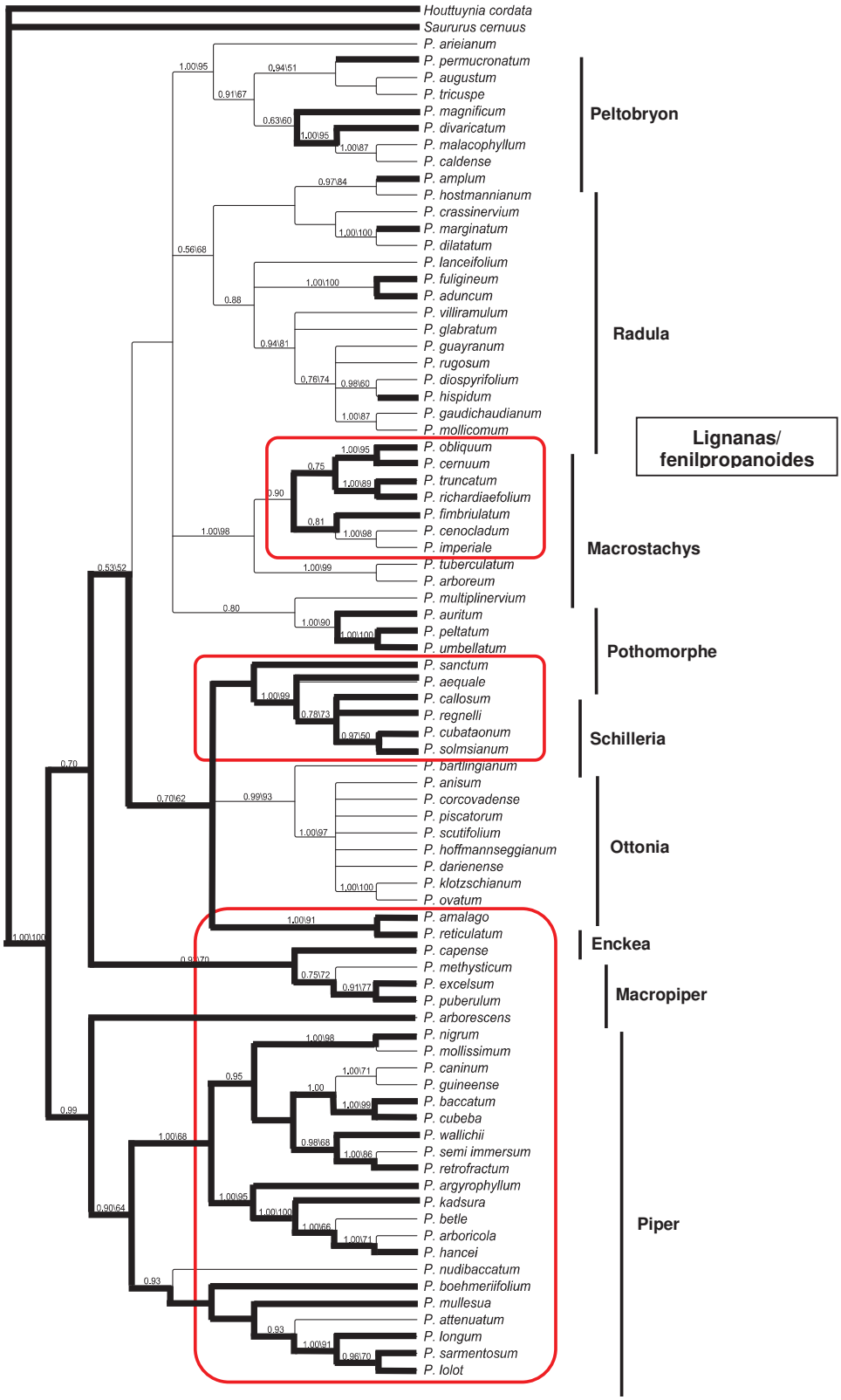


Figura 17. Reconstrução dos caracteres químicos lignanas/fenilpropanoides sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem lignanas/fenilpropanoides.

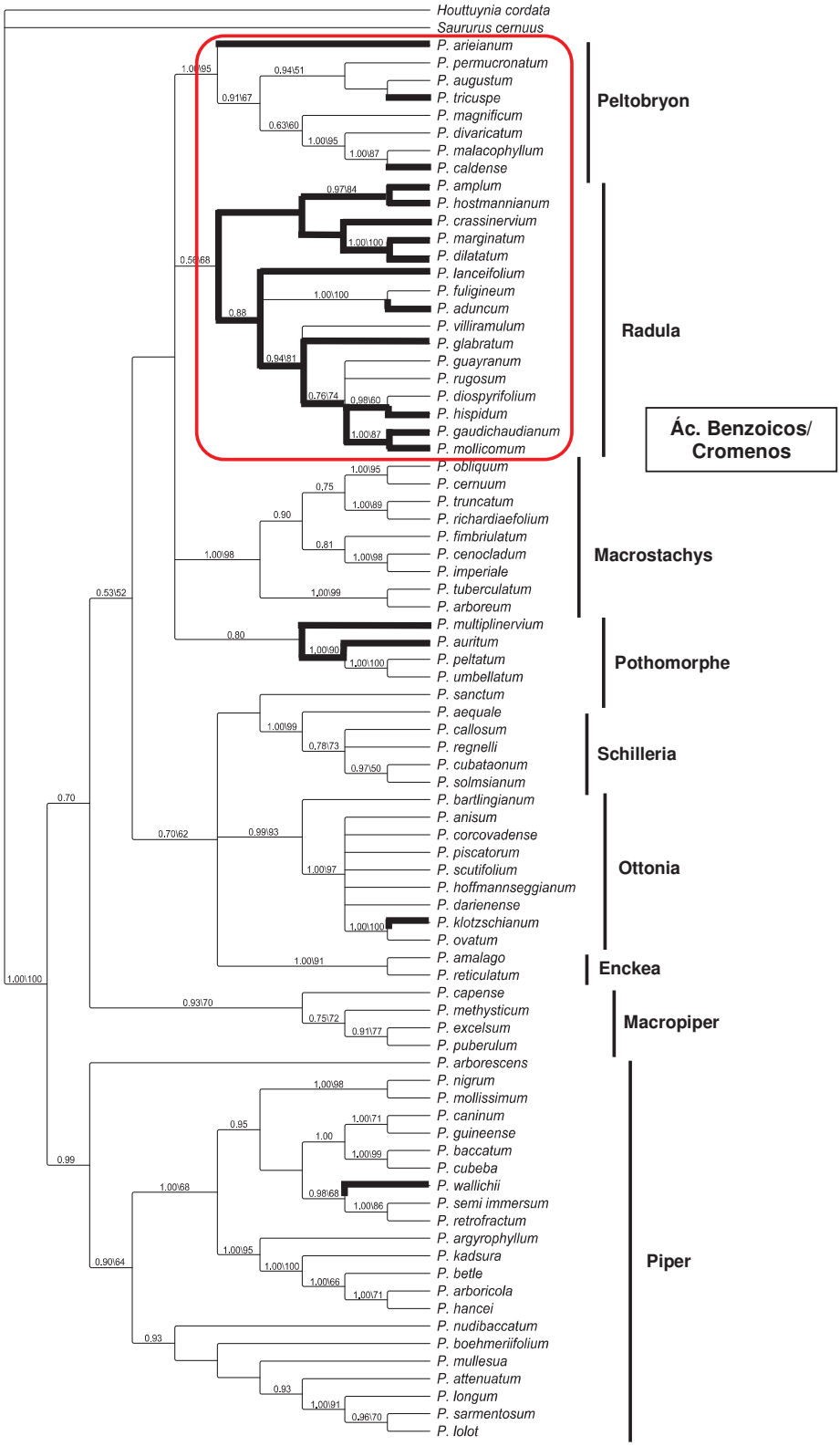


Figura 18. Reconstrução dos caracteres químicos ácidos benzoicos e cromenos sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem ácidos benzoicos e cromenos.

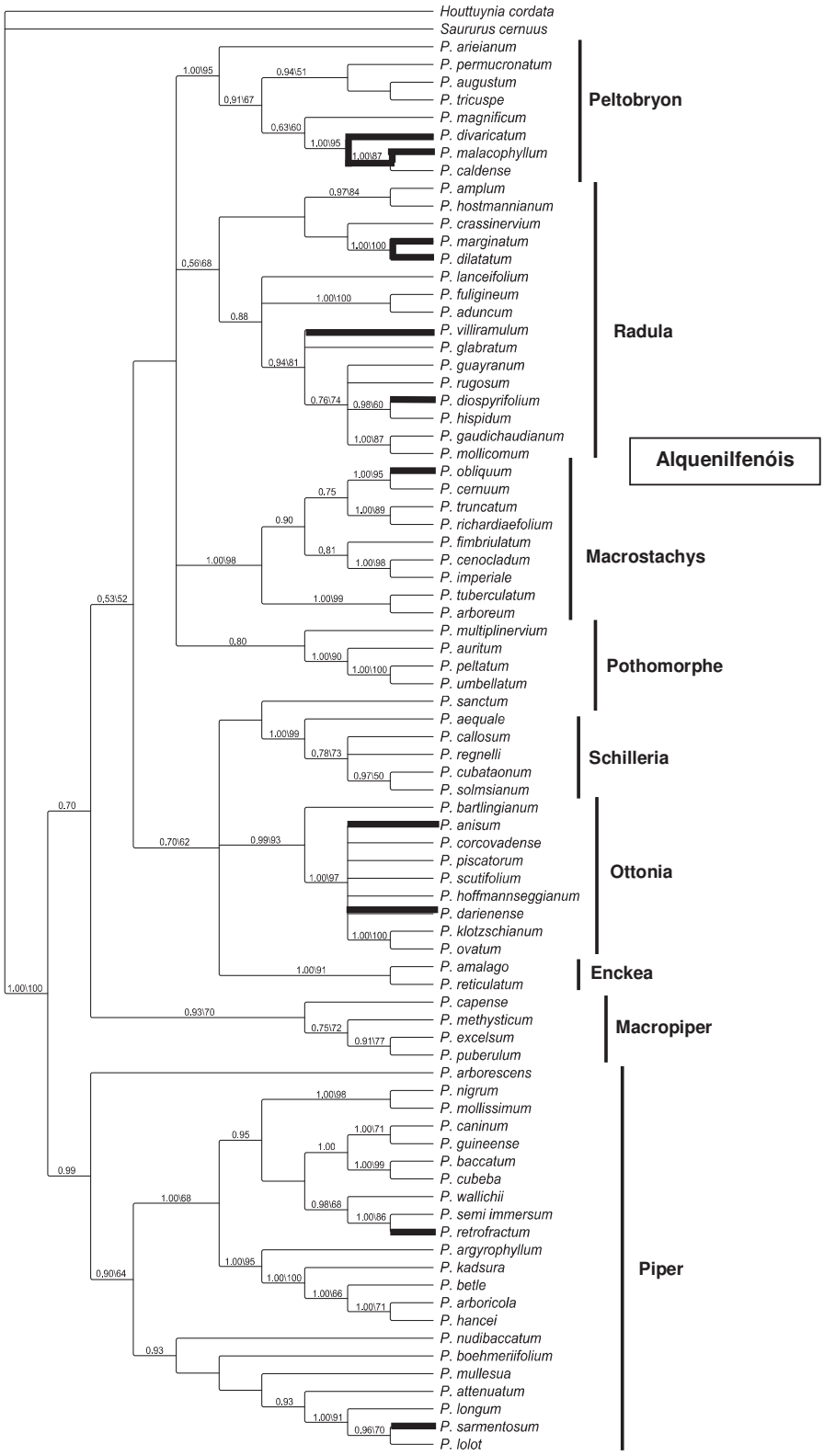


Figura 19. Reconstrução do caracter químico alquenilfenol sobre a árvore mais parcimoniosa obtida da análise da região do ITS. Em negrito estão destacadas as espécies que produzem os alquenilfenóis.

A análise filogenética e a reconstrução dos caracteres químicos fornecem uma evidência robusta para dar suporte aos clados gerados a partir da análise das seqüências de DNA, com elevados valores de *bootstrap* e probabilidades posteriores, distinguidos pela produção de amidas, lignanas/fenilpropanoides, ácidos benzoicos, cromenos e alquenilfenóis (Figuras 27-30). A mesma análise foi realizada para todos os caracteres selecionados.

As amidas, lignanas e fenilpropanoides constituem-se em temas estruturais bastante comuns em espécies de *Piper*. Pode-se observar a ocorrência destas classes de produtos naturais nos grupos externos, o que é sugestivo de um traço pleisiomórfico (condição primitiva de um caracter) que teria surgido no início do processo de especiação do gênero *Piper* (Figuras 27 e 28). Entretanto, espécies que não produzem amidas ou lignanas/fenilpropanoides, mas que derivam de ancestrais produtores, provavelmente ainda contém genes que codificam para a biossíntese destes metabólitos, porém estes genes podem encontrar-se latentes ou inativos.

Por outro lado, a ocorrência de determinadas classes de produtos naturais em clados não relacionados indica a atuação de fatores e mecanismos de seleção de genes não totalmente conhecidos. Portanto, sua ocorrência em dois táxons não é necessariamente uma indicação de relação monofilética, podendo ser resultante de um processo evolutivo convergente ou de expressão diferencial. Além disso, alguns genes adquiridos podem estar desligados e serem ativados posteriormente por algum fator de indução (Wink, 2003; Wink and Waterman, 1999). Uma observação semelhante foi feita sobre os iridóides em Asteridae. Os iridóides são reconhecidos como um grupo de metabólitos secundários cuja distribuição reflete a relação filogenética, e sua ocorrência indica a origem Asteridae. A distribuição na maioria dos clados de Asteraceae também aponta que a capacidade de sintetizar este composto tenha sido adquirida em uma ancestral comum a todo este táxon e que a

não expressão desta classe de metabólitos provavelmente deve-se à perda de expressão dos genes envolvidos na biossíntese dos iridóides (Grayer et al., 1999; Waterman, 2007).

Em *Piper*, a produção de cromenos e ácidos benzoicos caracteriza um clado monofilético (todas as espécies oriundas de uma única espécie ancestral) (Figura 29), sugestivo que estas classes de metabólitos são caracteres evolutivamente derivados e que seriam sinapomorfias químicas (condição de um caracter compartilhada por clados irmãos) deste clado. Por outro lado, a ocorrência de espécies em outros clados pode ser considerada um traço autapomórfico (caracter derivado que está presente em um única espécie terminal), onde uma espécie pode ter evoluído independentemente durante o curso da evolução.

Resultados similares foram obtidos por Wink (Wink, 2003) no trabalho análise da relação evolutiva da distribuição de metabólitos secundários mapeados sobre a árvore filogenética mais parcimoniosa. Quando comparados membros das tribos Mimosoideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae, foi observado que a ocorrência de alcalóides quinolizidinicos é restrita a um clado específico dentro de Papilionoideae. Quando se considera a distribuição de alcalóides tropânicos e esteroidais, da nicotina e de withanolideos, a ocorrência destes metabólitos nos clados analisados é mutuamente exclusiva.

Os alquenilfenóis apresentam ocorrência rara na natureza e são limitados aos membros de *Piper* (Figura 30) (Avella et al., 1994; Galinis and Wiemer, 1993; Likhitwitayawuid et al., 1987; Tuntiwachwuttkul et al., 2006; Valdivia et al., 2008). Diferente do observado para ácidos benzóicos e cromenos, esta classe tem distribuição randômica dentro de *Piper*, e pode constituir-se num traço recente na evolução do grupo.

Os clados Radula e Peltobryon destacaram-se por produzir diferentes classes

incluindo cromenos e ácidos benzoicos, sendo que algumas espécies produzem ainda alquenilfenóis. Foi observado que o possível ancestral comum que deu origem às espécies produtoras desses metabólitos apareceu recentemente na história evolutiva. Sob o ponto de vista filogenético e evolutivo, os clados Radula e Peltobryon podem ser considerados os mais dinâmicos.

No caso das novas espécies adicionadas a árvore de ITS (Apêndice 4, Figura 97) os estudos fitoquímicos estão sendo realizados com a finalidade de analisar se há congruência entre a distribuição das espécies nos clados que acumulam preferencialmente determinada classe de metabólitos secundários.

A habilidade de sintetizar o mesmo tipo de substância pode ter sido originado independentemente em duas ou mais espécies não relacionadas. As vias biossintéticas para produzir tal substância podem ser diferentes nos táxons e, neste caso, o mesmo metabólito representa diferentes caracteres. Entretanto, a via biossintética pode também ser a mesma, especialmente se for relativamente simples a biossíntese a partir de um metabólito primário, como no caso das amidas e alcalóides. Por esta razão, representantes da mesma classe de produtos naturais são frequentemente encontrado em táxons não relacionados. Uma inferência mais precisa se a presença de certo constituinte em dois táxons seria baseado em uma relação verdadeira ou em convergências envolveria investigar se este fato está correlacionado com outros caracteres naquele táxon. Se estiver correlacionado com muitas outras características, ambos os químicos como os de outros campos, isto pode ser utilizado como um marcador filogenético (Grayer et al., 1999).

Existem alguns exemplos nos quais a abordagem combinada de análises filogenéticas e quimiotaxonômica foi utilizada com sucesso para esclarecer relações de parentesco entre espécies e também para direcionar a busca por classes específicas de produtos naturais. Para autenticar amostras da espécie *Zingiber*

officinale popularmente conhecida como gengibre e amplamente utilizada na medicina e culinária, foram comparados os perfis metabólicos obtidos por CG-EM e CLAE com as árvores filogenéticas geradas com dados moleculares de *rps*16 e *trnL-F*. Os dados químicos foram capazes de gerar essencialmente a mesma relação filogenética obtida com os dados de DNA (Jiang et al., 2006), podendo ser utilizados como marcadores químicos em um processo preliminar de identificação das espécies medicinais. A análise filogenética combinada com quimiotaxonomia foi utilizada para classificar os líquens Pertusariaceae e corroborar relações de parentescos antes não resolvidas (Schmitt and Lumbsch, 2004). A proximidade filogenética das cianobactérias *Oscillatoria* baseadas nas sequências do gene 16S rRNA foi utilizada como um guia para a detecção e isolamento de novas variantes de produtos bioativos (Engene et al., 2011).

Deve-se reassaltar que a classificação não deve ser baseada apenas nos caracteres químicos. Embora estes possam ser considerados caracteres robustos para a classificação de *Piper*, eles devem ser utilizados em conjunto com caracteres de outros campos, tais como moleculares, morfológicos e biogeográficos. A razão para tal precaução consiste no fato de que em certas plantas os caracteres químicos podem sofrer variações circadianas e sazonais, o que dificulta a reprodutibilidade do perfil químico a ser analisado. Mesmo com o pronunciado avanço das técnicas analíticas de detecção, muitos metabólitos permanecem não identificados, além do fato e que cada planta tem capacidade de sintetizar um arsenal químico com aproximadamente 30.000 diferentes compostos (Verpoorte et al., 2005). Outro ponto a ser considerado é que a ausência de dados químicos muitas vezes constitui-se em um obstáculo na análise da distribuição destes dados junto a filogenia.

Fica claro, portanto, que os perfis químicos podem ser utilizados para analisar a relação natural entre as espécies de *Piper*. A análise molecular combinada com a

reconstrução dos caracteres químicos evidenciou a proximidade filogenética de espécies que produzem e acumulam uma classe específica de metabólitos, indicando que esta é uma ferramenta importante a ser considerada nos critérios de classificação das espécies, além de servir como um excelente modelo para ser utilizado como base para estudos fitoquímicos racionais.

4.1.2. Distribuição de lignóides nos clados Schilleria e Macrostachys

No início dos anos 90, Gottlieb prôpos um método racional para a busca por neolignanas bioativas, que considerava a distribuição dos lignóides e a afinidade entre as famílias que produzem metabólitos similares. Desta maneira, a finalidade do estudo fitoquímico para as famílias que potencialmente produziriam as neolignanas poderia ser direcionada (Gottlieb, 1991).

Nesta mesma linha de pensamento, Umezawa realizou um mapeamento da ocorrência de mais de 60 lignanas no qual foram observados aspectos evolutivos da biossíntese destes metabólitos em relação à distribuição filogenética (Umezawa, 2003a; Umezawa, 2003b).

No presente trabalho o modelo de reconstrução dos caracteres químicos foi realizado sobre a árvore filogenética mais parcimoniosa gerada pela análise da região de ITS, e foi constatado que as espécies que acumulam preferencialmente lignanas/fenilpropanoides apresentaram-se agrupadas nos clados Macrostachys e Schilleria. Estes dois clados foram assim investigados quanto à distribuição das classes de lignanas/fenilpropanoides, no intuito de lançar luz aos aspectos evolutivos desta classe de metabólitos comum e altamente expressa nas espécies de *Piper*.

O clado Schilleria é considerado de difícil caracterização, por conter muitos caracteres pleisiomórficos. São arbustos de médio porte, a maioria apresentando

uma grande ramificação. Abrange cerca de 200 espécies, ocorrendo na América Central e na Mata Atlântica brasileira, onde se concentra a maior diversidade de espécies (Jaramillo et al., 2008). As espécies do clado Schilleria contêm fenilpropanoides e seus dímeros, tais como as lignanas tetraidrofurânicas e neolignanas benzofurânicas (Yoshida et al., 2012) (Tabela 12). Entre as 8 espécies deste clado, 7 acumulam monolignóis/lignóides (Figura 20).

É notável a capacidade de alguns indivíduos destes clados de produzirem determinado representante de um tipo estrutural. Destaca-se a espécie *P. solmsianum*, na qual os lignóides são os principais componentes dos extratos, mas em particular, a lignana tetraidrofurânica (–)-grandisina (Tabela 12) que perfaz 70% da massa seca do extrato das folhas (m/m) (Martins et al., 2000; Martins et al., 2003). Outras variedades classificadas como *P. solmsianum* também expressam majoritariamente as lignanas benzofurânicas, sendo um interessante alvo de investigação de sua biossíntese. As espécies *P. regnellii e P. aequale* destacam-se pelo acúmulo de fenilpropanoides e de neolignanas benzofurânicas, como o (+)-conocarpano e eupomatenoides (Tabela 12) (Benevides et al., 1999; Maxwell et al., 1999). As espécies *P. mikanianum*, *P. cubataonum* e *P. xylosteoides* apresentam um elevado acúmulo de fenilpropanoides, que representam de 65 a 80% da composição de seus óleos essenciais (Abreu et al., 2002; Dognini et al., 2012; Leal et al., 2005; Potzernheim et al., 2006; Silva et al., 2009b) (Tabela 12).

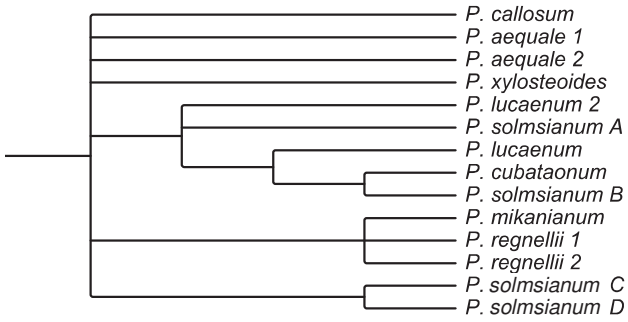


Figura 20. Ampliação da seção Schilleria do gênero *Piper,* obtida da árvore filogenética gerada da análise da região de ITS (Apêndice 4, Figura 97). Os números 1 e 2 representam as coletas. A-D representam espécies de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades.

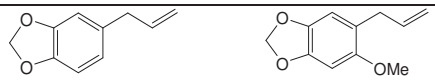
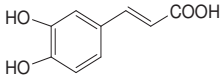
Tabela 12. Metabólitos secundários das espécies de *Piper* pertencentes ao clado Schilleria.

Seção de *Piper*	Espécie	Estruturas das lignanas	Referência
Schilleria	*P. aequale*	conocarpano R_1=OMe; R_2= ; R_3=H (2*R*,3*R*)-2,3-diidro-2-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-3-metil-5-(*E*)-propenil benzofurano R_1=OH; R_2=H eupomatenoide-6 R_1=OH; R_2=OMe eupomatenoide-5 R_1,R_2=-OCH_2O- eupomatenoide-3 R_1=H; R_2=CHO; R_3=H decurrenal R_1=H; R_2=OMe; R_3= (2*R*,3*R*)-2,3-diidro-2-(4-hidroxifenil)-5-metoxi-3-metil-7-propenilbenzofurano 2-(3,4-metilenodioxifenil)-3-metil-5-(2-oxopropil) benzofurano 2-(3,4-metilenedioxifenil)-5-(1,2-diidroxipropil)-3-metilbenzofurano Dímero de eupomatenóide-6	(Maxwell et al., 1999)

Tabela 12. Continuação.

Seção de *Piper*	Espécie	Estruturas das lignanas	Referência
Schilleria	*P. regnellii*	apiol, dilapiol, miristicina, conocarpano, eupomatenoide-3, eupomatenoide-5, eupomatenoide-6, decurrenal regneliina metil (7*R*,8*R*)-4-hidroxi-8 ',9 '-dinor-4',7-epoxi-8,3'-neolignan-7'-ato	(Benevides et al., 1999; Luize et al., 2006; Sartorelli et al., 2001)
	P. solmsianum var. *solmsianum* **(D)**	conocarpano, eupomatenoide-3, eupomatenoide-5	(da Silva et al., 2010; de Campos et al., 2007; de Campos et al., 2005; Moreira et al., 2001)
	P. solmsianum **(A, B e C)**	apiol dilapiol miristicina elemicina isoelemicina (–)-grandisina rel-(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (7*R*, 8*R*, 7'*S*, 8'*R*)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana. rel-(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimethylenedioxy-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana	(Amaral, 2008; Martins, 2002; Martins et al., 2000; Martins et al., 2003)

Tabela 12. Conclusão.

Schilleria	*P. callosum*	 safrol asaricina  ácido cafeico	(Facundo et al., 2000; Genderen et al., 1999)
	P. cubataonum	Apiol, dilapiol	(Silva et al., 2009b)
	P. mikanianum	safrol (82% OE das folhas)*, apiol (64,89% OE das folhas)**	(Abreu et al., 2002; Leal et al., 2005)
	P. xylosteoides	safrol (47,83 % OE das folhas) 2 outras variedades produzem safrol com concentração de 84,1% e 75,8% (OE folhas)	(Dognini et al., 2012; Ferraz et al., 2010)
	P. lucaenum	**?**	

A-D= espécimens de *P. solmsianum* coletados em diferentes localidades. **?**= ausência de dados fitoquímicos descritos.

Macrostachys é uma linhagem muito rica em espécies da região Neotropical com cerca de 200-500 espécies, muitas delas ocorrendo na Mata Atlântica do Brasil, com alguns poucos representantes na Amazônia, na região da América Central e Norte dos Andes (Jaramillo et al., 2008). As plantas deste clado são arbustos de tamanho médio ou pequenas árvores. As espécies do clado Macrostachys acumulam preferencialmente lignanas do tipo dibenzilbutirolactônicas e furofurânicas. Das 9 espécies que compõem o clado Macrostachys, 5 delas acumulam lignóides (Figura 21, Tabela 13). *P. richardiaefolium* produz uma variedade de lignanas, principalmente do tipo dibenzilbutirolactônicas e furofurânicas (Silva, 2008; Yamaguchi et al., 2011). *P. cernuum* produz lignanas dibenzilbutirolactólicas e *P. fimbriulatum* lignanas furofurânicas (Solis et al., 2005; Yamaguchi et al., 2011).

A biossíntese proposta para as lignanas dibenzilbutirolactônicas inicia-se com dimerização de monolignóis como o álcool coniferílico, mediado pela ação de peroxidases e proteínas dirigentes, para a formação de lignanas de esqueleto

furofurânico. Essas lignanas sofrem redução mediada por enzimas do tipo PLR (pinoresinol-lariciresinol redutases), levando ao intermediário 9,9'-diidróxi-dibenzilbutano que, por sua vez, sofre oxidação pela enzima do tipo SDH (secoisolariciresinol-desidrogenase) gerando as lignanas dibenzilbutirolactônicas.

As lignanas furofurânicas frequentemente ocorrem como misturas enantioméricas, enquanto que as lignanas dibenzilbutirolactônicas são opticamente puras (sempre levorotatórias, com raras exceções) e são produtos finais da via biossintética. As espécies que produzem estes tipos de lignanas encontram-se agrupadas em um clado, como acontece em espécies de *Linum* (Schmidt et al., 2010) e nas espécies de *Piper*. Esta observação indica que a capacidade de sintetizar as lignanas mais complexas, tais como as dibenzilbutirolactônicas, provavelmente foi herdado de um ancestral comum. Este fato é sugestivo de que a distribuição dos esqueletos nas espécies seja também correlacionada com um fator evolutivo, e o acúmulo predominante de um tipo de lignana provavelmente ocorreu no início da especiação com um recrutamento e eventual evolução da via biossintética que leva a estas estruturas (Schmidt et al., 2010; Umezawa, 2003a).

As espécies *P. cenocladum* e *P. imperiale* são muito próximas no ponto de vista evolutivo e apresentam amidas como constituintes principais em seus perfis químicos (Dodson et al., 2000; Richards et al., 2001; Richards et al., 2005). A análise da reconstrução de lignanas/fenilpropanoides (Figura 18) sugere que a capacidade de produzir tal composto deixou de ser expressa no último ancestral comum que levou a este ramo.

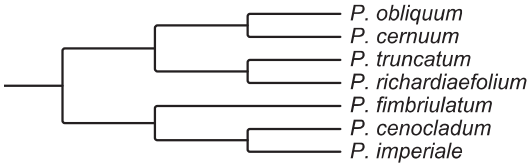


Figura 21. Ampliação da seção Macrostachys do gênero *Piper,* obtida da árvore filogenética gerada da análise da região de ITS (Apêndice 4, Figura 97).

Tabela 13. Metabólitos secundários das espécies de *Piper* pertencentes ao clado Macrostachys.

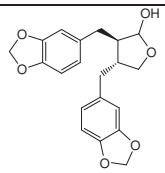
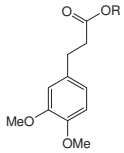
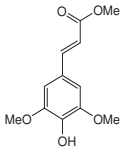
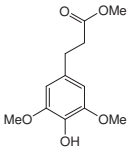
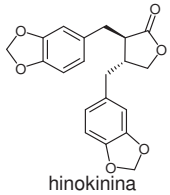
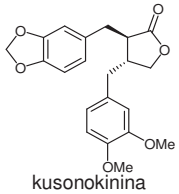
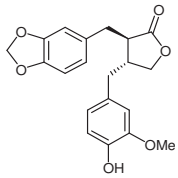
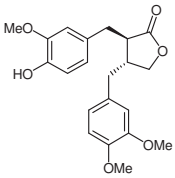
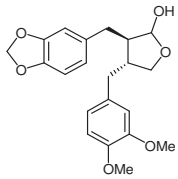
Seção de *Piper*	Espécie	Estruturas das lignanas	Referência
Macrostachys	*P. obliquum*	safrol (45,83% OE)	(Guerrini et al., 2009)
	P. cernuum	 cubebina  R=H R=Me  sinapato de metila  diidrosinapato de metila	(Danelutte et al., 2005)
	P. richardiaefolium	cubebina  hinokinina  kusonokinina  haplomirfolina  arctigenina  3',4'-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxicubebina	(Silva, 2008; Yamaguchi et al., 2011)

Tabela 13. Conclusão.

Seção de *Piper*	Espécie	Estruturas das lignanas	Referência
Macrostachys	*P. richardiaefolium*	sesamina kobusina ferulato de bornila cumarato de bornila	
	P. truncatum	eudesmina	(Raimundo et al., 2009)
	P. fimbriulatum	3,4,5'-trimetoxi-3',4'-metilenodioxi-7,9':7',9 diepoxilignana 7'-epi-sesartemina diayangambina	(Solis et al., 2005)
	P. imperiale	N.D.	
	P. cenocladum	N.D.	

N.D.= não foram detectados lignóides nos extratos destas espécies nos estudos descritos.

4.1.3. Análise de componente principal (PCA) das espécies brasileiras de *Piper* utilizadas na análise filogenética

Na tentativa de analisar a ocorrência e distribuição das principais classes de compostos nas espécies de *Piper*, a análise do perfil químico de RMN de ^{1}H dos extratos brutos das folhas foi realizada por métodos quimiométricos como o PCA.

As espécies que acumulam preferencialmente lignanas/fenilpropanoides apresentam-se agrupadas na análise por PCA, enquanto as amostras que acumulam cromenos ou ácidos benzoicos tendem ao agrupamento, embora apresentem-se mais dispersas (Figura 22). Este tratamento explicou 47% da variância dos dados, sendo 35% deles explicados por PC1 e 12% por PC2.

No grupo das espécies que acumulam cromenos/ácidos benzoicos, os sinais em δ 1,5-1,9 ppm foram os que mais influenciaram na separação dos grupos e são referentes as múltiplas metilas presentes nas prenilas ligadas aos cromenos, como no ácido gaudichaudianico (Lago et al., 2004) e nos ácidos benzoicos, como o ácido caldensinico (Freitas et al., 2009) (Figuras 22 e 23).

Por outro lado, algumas espécies que acumulam lignanas benzofurânicas, tal como *P. regnellii* (Benevides et al., 1999), apareceram agrupadas com as espécies produtoras de cromenos/ácidos benzoicos. Este fato deveu-se à presença dos sinais intensos de metilas H-9 e H-9' presentes na estrutura das lignanas benzofurânicas, que aparecem em δ 1,6-2,0 ppm e influenciaram o agrupamento de *P. regnellii* neste grupo.

Para o grupo formado por espécies que acumulam lignanas/fenilpropanoides, os sinais em δ 3,8-3,9 ppm relativos à metoxilas, que ocorrem com frequência nesta classe de metabólitos, foram os que mais influenciaram na formação deste grupo. A proximidade entre espécies que acumulam lignanas e amidas pode ser explicada pela presença de metoxilas na estrutura de amidas, tal como na piplartina, o produto

majoritário de *P. tuberculatum* (Bezerra et al., 2008b; Felipe et al., 2007; Navickiene et al., 2000). As espécies que acumulam amidas apresentaram-se dispersas entre os grupos, pelo fato de possuírem características estruturais e, consequentemente sinais nos espectros de RMN de ^{1}H semelhantes.

Apesar de ser possível visualizar uma tendência ao agrupamento das espécies de acordo com o perfil de metabólitos produzidos por estas, a porcentagem de resolução por PC1 e PC2 desta análise pode ser considerada baixa pois uma análise robusta requer valores acima de 70%. Embora o objetivo da análise de componente principal seja constatar possíveis agrupamentos de indivíduos que compartilhem características comuns e apontar os principais dados que influenciam no agrupamento destes, os resultados desta análise devem ser interpretados com cautela quando se utiliza uma grande variedade de espécies. Este tipo de análise não supervisionada gera resultados mais robustos quando aplicada para analisar populações ou grupos limitados de espécies (Yamaguchi et al., 2011).

Em conclusão, a análise por PCA dos extratos de espécies de *Piper* apontou uma tendência de agrupamento das espécies de acordo com o acúmulo de lignanas/fenilpropanoides e cromenos/ácidos benzóicos. Não foi possível observar separação das espécies que produzem amidas em um único grupo, por apresentarem características estruturais comuns às demais classes analisadas. Entretanto, na análise por PCA empregando dados de massas (ESIMS) de espécies produtoras de amidas, observou-se a formação de agrupamentos de acordo com o tipo estrutural das amidas acumuladas por estas espécies (Yamaguchi et al., 2011).

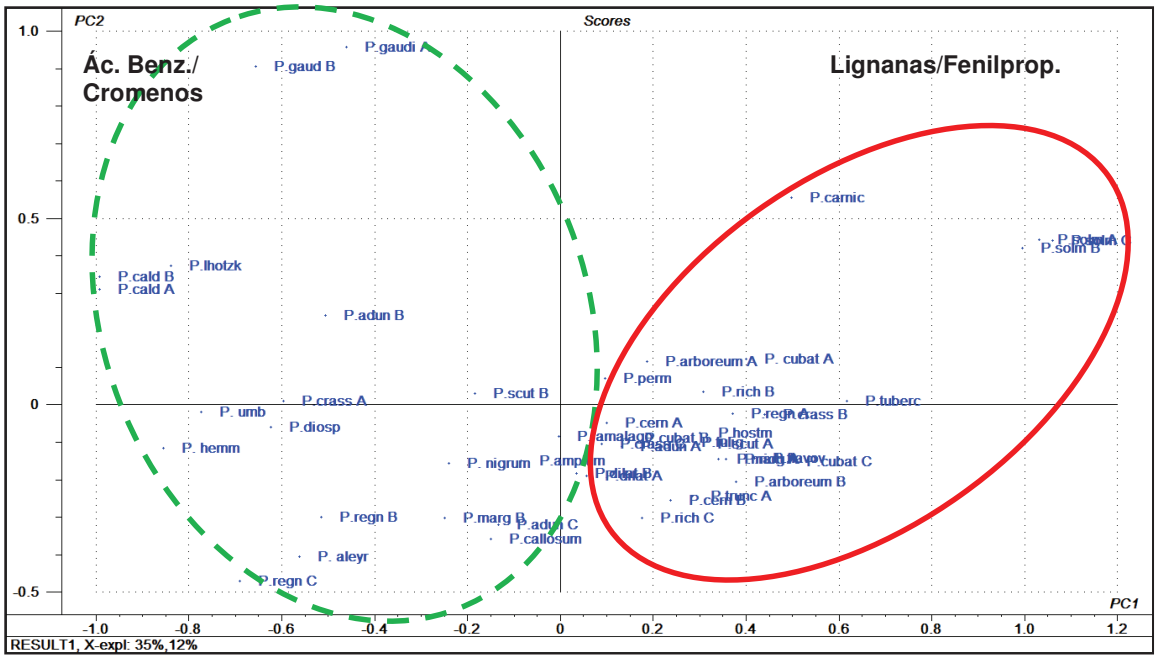


Figura 22. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética.

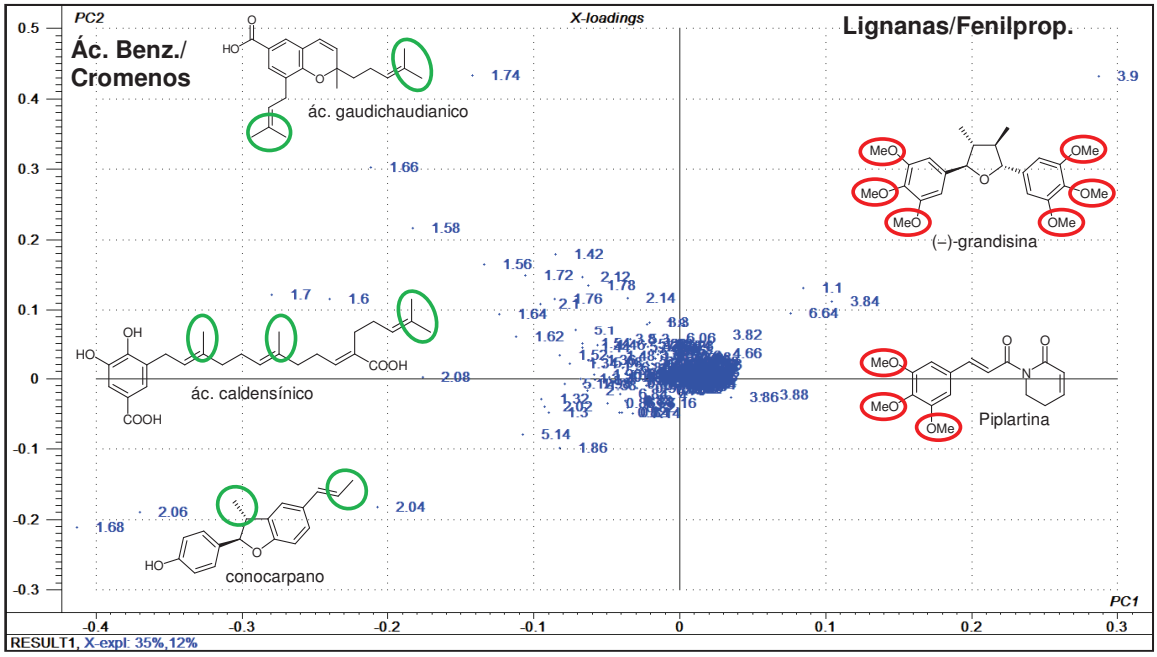


Figura 23. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética. As estruturas representam exemplos de metabólitos que mais influenciaram a separação das espécies. As cores detacam nas estruturas os substituintes que contribuiram para a formação dos grupos.

Na análise dos espectros de RMN de ^{1}H da fração hidroalcoólica foram observados sinais indicativos da presença de açúcares e aminoácidos, mas com pouca resolução entre os grupos quando analisados por PCA (Apêndice 3, Figuras 91 e 92).

4.1.4. Análise de componente principal das espécies de *Piper* pertencentes aos clados Schilleria e Macrostachys

A metodologia de PCA foi empregada na análise das espécies pertencentes aos clados Macrostachys e Schilleria. Neste caso o PCA pôde explicar 84% da variância dos dados, sendo 74% explicado por PC1 e 10% por PC2. Foi observada a formação de dois grupos de acordo com os clados de origem (Figura 35). Os principais sinais que influenciaram na formação do grupo Macrostachys foram os das metoxilas em δ 3,86 e 3,88 ppm e os sinais em δ 2,06-2,87 ppm comum aos hidrogênios H-7, H-8, H-7' e H-8' em lignanas dibenzilbutirolactônicas. No grupo de espécies pertencentes a Schilleria, *P. solmsianum* apresentou-se separada devido os intensos sinais da lignana grandisina em δ 3,84, 3,90 e 6,64 ppm. Os sinais da região aromática em δ 7,1-7,5 ppm contribuíram para o agrupamento das demais espécies deste clado (Figura 36).

A resolução da análise por PCA para separação de espécies pertencentes aos clados Macrostachys e Schilleria foi bastante satisfatório, indicando ser um método de análise robusto quando se trata de diferenciar espécies que produzem tipos diferentes de lignanas.

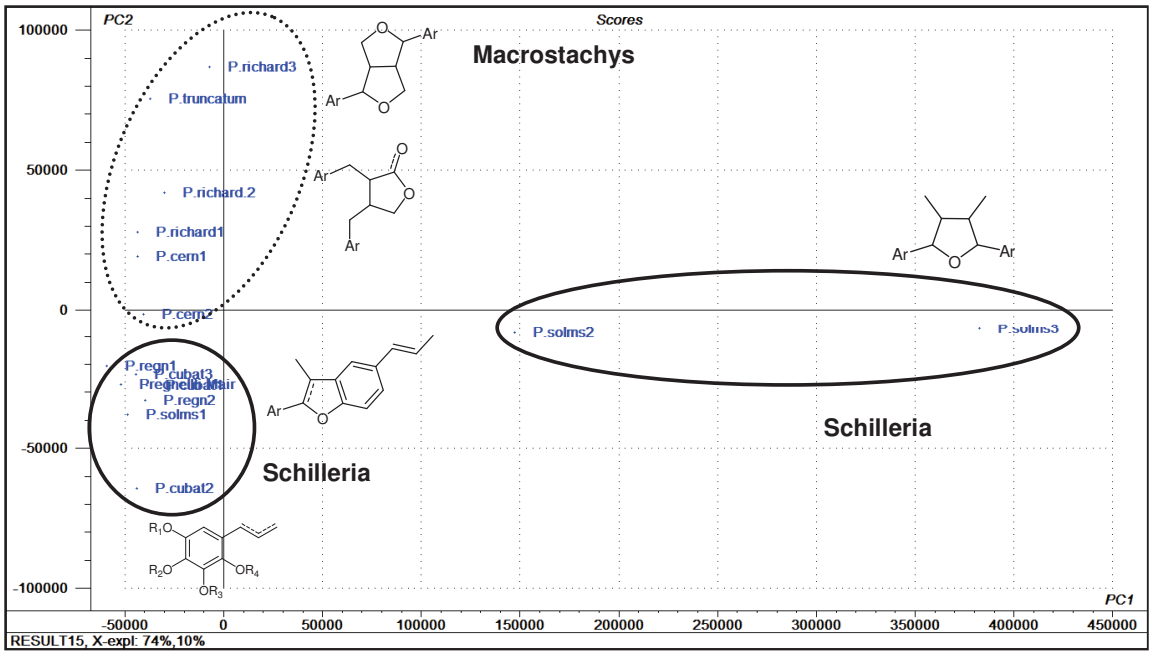


Figura 24. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* pertencentes aos clados Macrostachys (linha pontilhada) e Schilleria (linhas cheias). As estruturas representam as classes de lignanas presentes nos grupos. Ar: substituinte aromático, frequentemente um grupo fenólico (1,4) com substituição nas posições 3, 4 e 5.

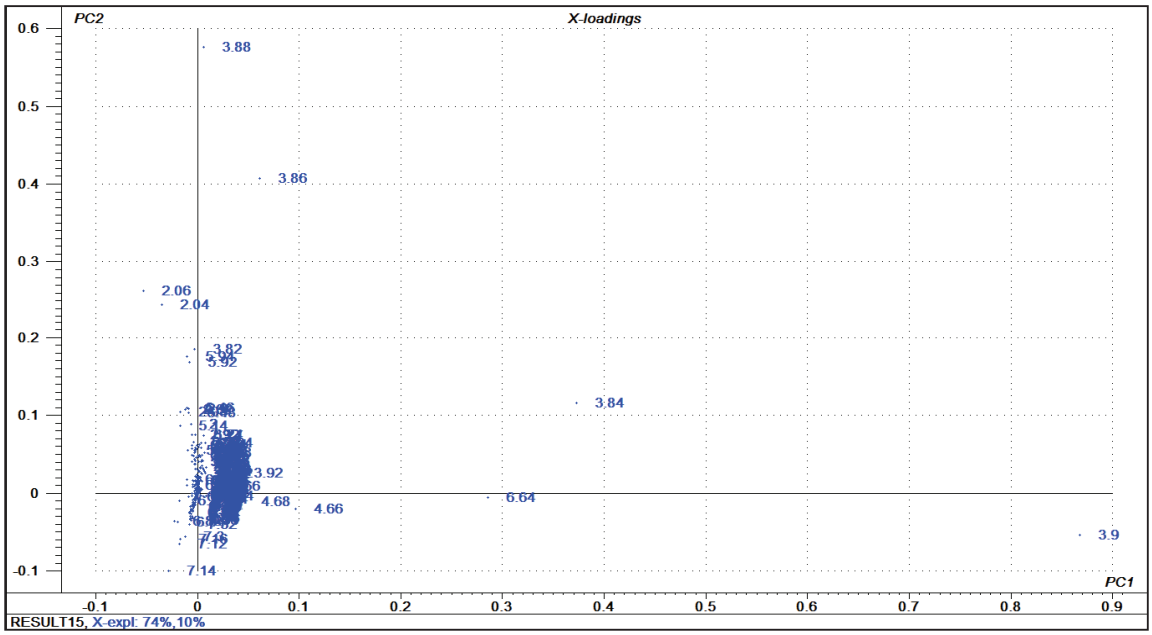


Figura 25. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécies de *Piper* pertencentes aos clados Macrostachys e Schilleria.

4. 2. Variabilidade química e genética em *Piper solmsianum*

4.2.1. Diferenças morfológicas e químicas entre as populações de *P. solmsianum*

O estudo químico de espécies identificadas como *P. solmsianum* amostradas nas regiões de São Paulo e Rio de Janeiro revelou um perfil bastante diferenciado entre as populações de acordo com o local de origem, bem como acentuadas diferenças morfológicas (Figuras 26-27). Na análise filogenética utilizando a região de ITS (Figuras 15 e 99), as espécies de *P. solmsianum* coletadas em localidades distintas apresentaram-se em clados separados, apontando uma possível segregação destas espécies. Portanto fez-se necessário o emprego de técnicas que permitem avaliar a variabilidade intra- e inter-populacional em *P. solmsianum*, e para tal, foram comparados o perfil metabólico dos extratos das folhas com o resultado das análises genéticas empregando marcadores de microssatélites desenvolvidos para a espécie alvo deste estudo.

4.2.2. Distribuição geográfica de *P. solmsianum*

P. solmsianum é uma espécie arbustiva, de 1,5-4,5 metros de altura, glabro, ocorrendo em florestas ombrófila densa montana e alto montana. Espécie freqüente na mata com luz difusa, em planícies alagadiças, semi-paludosas ou brejos, não raro ocorrendo em capoeiras ou matas de encostas e restingas. Sua distribuição ocorre em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e em todos os estados da Região Sul. Floresce e frutifica de outubro a junho (Medeiros, 2006; Monteiro and Guimarães, 2009).

Figura 26. Folhas de *P. solmsianum* coletadas no Brasil. **A**: *P. solmsianum* [K-1384 (CUASO, SP)] (Medeiros, 2006); **B**: *P. solmsianum* C. DC. [K-1368 (Ubatuba, SP)]; **C**: *P. solmsianum* [K-1329 (Teresópolis, RJ)] (Medeiros, 2006); *P. solmsianum* var. *solmsianum* **D**: [K-1316 (Itatiaia, RJ)] (Monteiro and Guimarães, 2009).

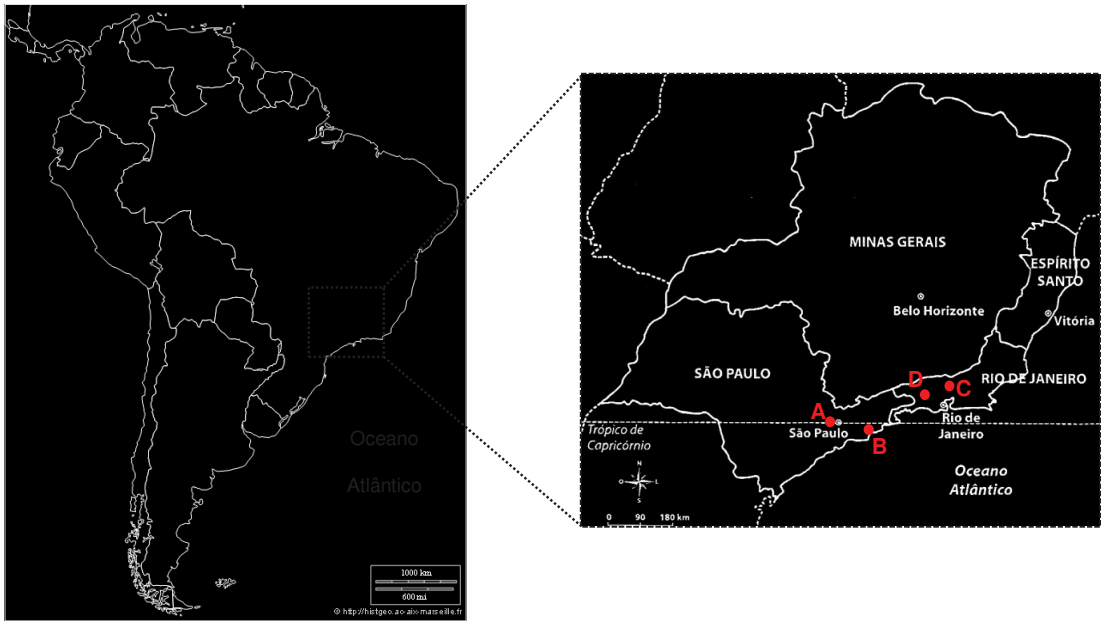


Figura 27. Mapa dos locais de coleta, com ampliação na região sudeste do Brasil. Destacado em vermelho: locais de coleta de *P. solmsianum*. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ).

4.2.3. Composição química e atividades biológicas

P. solmsianum destaca-se pela elevada expressão e acúmulo de produtos oriundos do metabolismo fenilpropanoídico. A lignana (–)-grandisina é o produto majoritário em folhas dos indivíduos da população do grupo **B**. Trata-se de uma substância cristalina de fácil obtenção a partir dos extratos brutos e que possui uma potente atividade (IC_{50}= 5 µg/mL) contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, que é o agente causador da Doença de Chagas nas regiões tropicais do planeta (Lopes et al., 1998). Uma série de trabalhos estão sendo desenvolvidos explorando a gama de atividades biológicas apresentadas pela grandisina: atividade antiniciceptiva e anti-inflamatória (Carvalho et al., 2010), citotóxica e angiogênica (Valadares et al., 2009), larvicida contra larvas do mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* (Cabral et al., 2009). Lignanas tetraidrofurânicas com padrão de substituição com grupos metilenodioxila em um ou em ambos sistemas aromáticos (Tabela 13) também apresentaram potente atividade tripanocida (Martins et al., 2003). No caso de *P. solmsianum* var. *solmsianum*, variedade frequentemente encontrada no Rio de Janeiro, foram obtidos como produtos principais o conocarpano e eupomatenoide-5, que apresentaram atividade antinociceptiva (da Silva et al., 2010), antifúngica (de Campos et al., 2005) e potente atividade antibacteriana (de Campos et al., 2007). O óleo essencial destas espécies contêm como constituinte majoritário (aprox. 40%) o 1-alil-2-metoxi-4,5-metilenedioxibenzeno (asaricina), que apresentou efeitos psicofarmacologicos de depressão do sistema nervoso central (Moreira et al., 2001).

Tais relatos indicaram a acentuada expressão da via fenilpropanoídica nestas populações, o que reflete a tendência das espécies de *P. solmsianum* em produzir e acumular preferencialmente compostos da via fenilpropanoídica. Ainda que os metabólitos acumulados por estas espécies sejam relevantes sob o ponto de vista

de atividade biológica com consequente necessidade de uma identificação e classificação das populações, um estudo de variabilidade genética associado ao potencial biossintético constitui-se em um aspecto bastante interessante.

Para análise do perfil metabólico e genético de *P. solmsianum*, foram selecionadas 58 espécimens coletados em diferentes localidades entre os estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Tabela 6, Figuras 26 e 27), sendo coletados de 13 a 16 espécimens de cada local, com uma distância mínima de 50 metros entre cada indivíduo, a fim de maximizar a diversidade genética e minimizar a variação ambiental. Os principais metabólitos presentes nos extratos foram identificados com o auxílio de técnicas de RMN uni e bidimensionais, CLAE-EM, e comparação com dados da literatura (Figuras 13 e 28, Apêndices 1 e 2). Os extratos foram analisados por RMN de ^{1}H, e os dados obtidos das análises multivariadas (*Principal Component Analysis* - PCA) e por microssatélites confirmaram a diferença significativa entre os perfis metabólicos e genéticos das populações de regiões distintas.

A fim de obter o máximo de informação de cada indivíduo, foram testados métodos de extração, e o método de escolha foi composto por $CHCl_3$ e $CH_3OH:H_2O$ (1:1 v/v). Este método melhorou a visualização dos lignóides na fase orgânica, refinando a resolução do espectro principalmente entre δ_H 3-5 ppm, região comum aos sinais de açúcares que se sobrepõem os sinais de metoxilas, de hidrogênios H-7 e H-7' das cadeias laterais em fenilpropanoides e de hidrogênios carbinólicos dos anéis tetraidrofurânicos e benzofurânicos em lignanas.

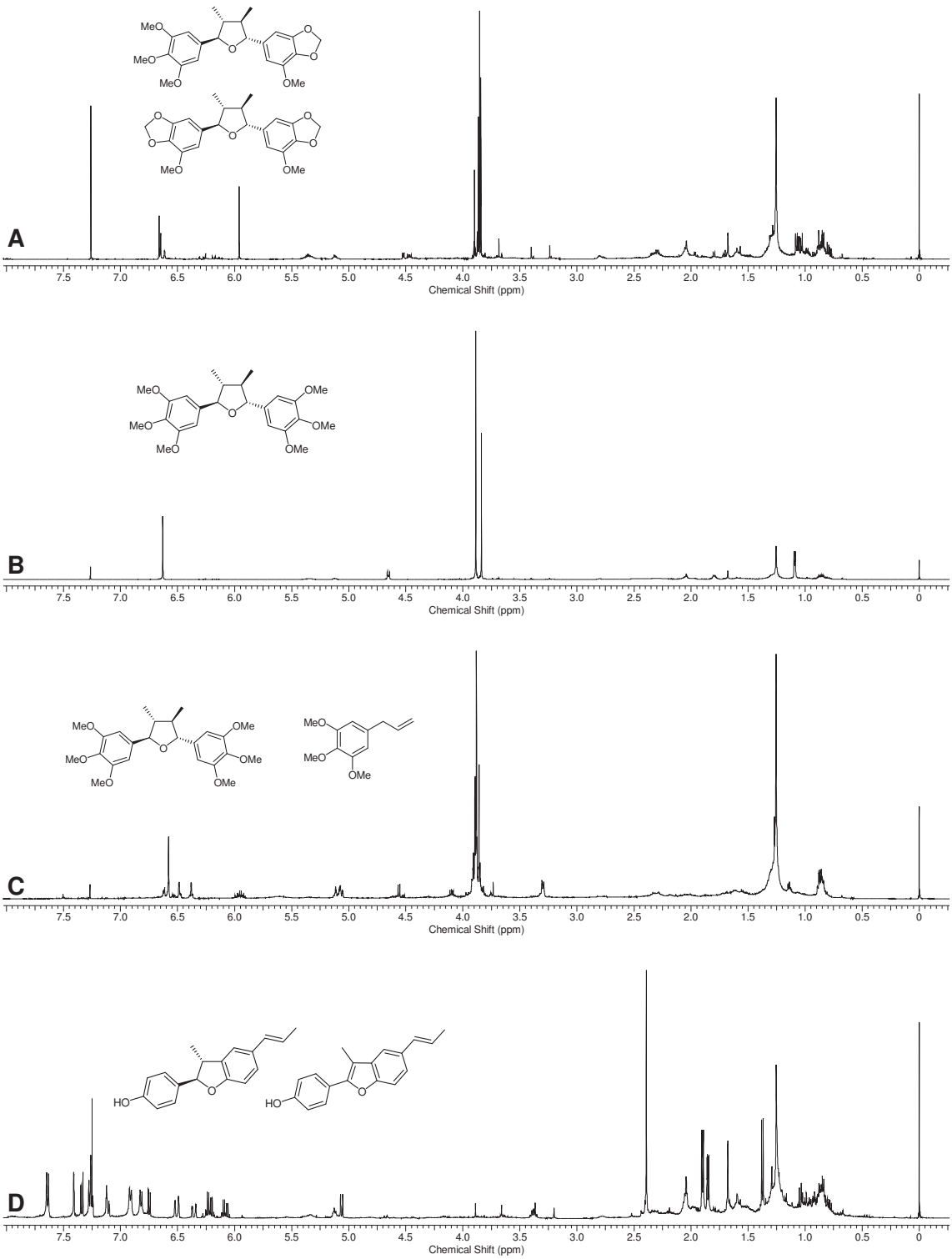


Figura 28. Espectros de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) dos extratos brutos (fração $CHCl_3$) das folhas de espécimens de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ).

4.2.4. Variabilidade intra-populacional em *P. solmsianum*

4.2.4.1. Grupo A (CUASO, SP, sigla K-1384)

Espécies de *P. solmsianum* do grupo **A** (k-1384, CUASO - São Paulo-SP) apresentaram em seus perfis químicos dos extratos a presença de lignana tetraidrofurânica com padrão de substituição nos anéis aromáticos 3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi como principal constituinte. Os indivíduos **A2** e **A3** apresentaram-se destacados do cluster principal, influenciados pelos sinais intensos de metoxilas em δ 3,86 e 3,88 ppm indicando o teor elevado de lignanas em relação às demais amostras de outros indivíduos. Os indivíduos **A1, A8** e **A11** distanciaram-se dos demais por apresentarem uma redução significativa dos sinais na região aromática e de metoxilas, dando lugar a um conjunto de sinais intensos na região alifática, responsáveis pela separação desses indivíduos do cluster principal (Figuras 29 e 30). A análise de PCA evidenciou 83% dessa diferença, sendo 57% resolvido pela variável PC1 e 26% pela PC2.

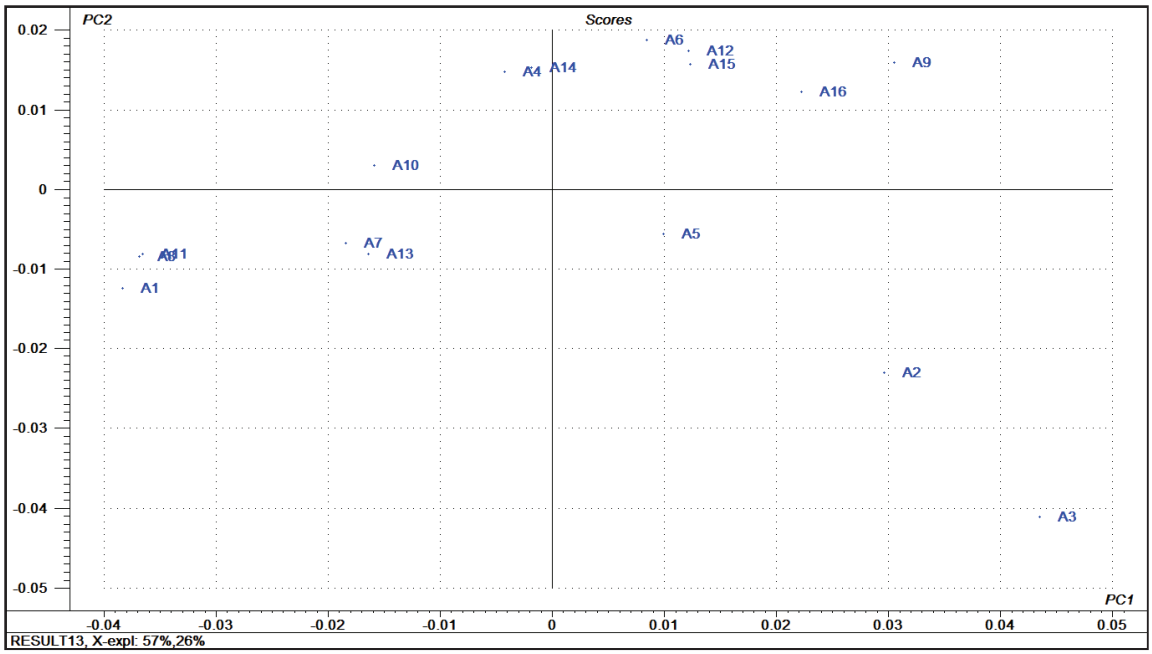


Figura 29. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **A**. Sigla e local de procedência: K-1384, CUASO - São Paulo.

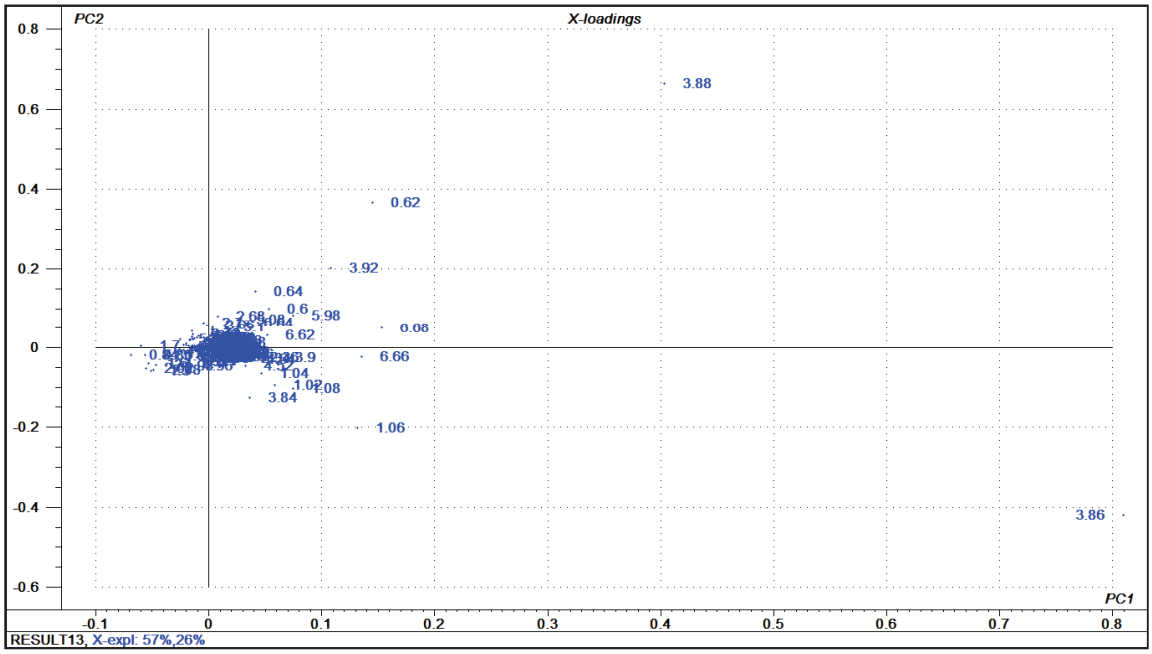


Figura 30. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **A**. Sigla e local de procedência: K-1384, CUASO - São Paulo.

4.2.4.2. Grupo B (Ubatuba, SP, sigla K-1368)

As espécies do grupo **B** chamaram atenção pelo pronunciado conteúdo da lignana grandisina nos extratos. Alguns indivíduos também apresentaram em seus perfis químicos o fenilpropanoide isoelemicina em mistura com a grandisina. Na análise de PCA foi observada uma tendência ao agrupamento de acordo com as proporções de grandisina e isoelemicina nas amostras (Figuras 31 e 32). Um total de 90% da variância entre as indivíduos pode ser evidenciada pela análise de PCA, sendo 80% por parte da PC1 e 10% pela PC2.

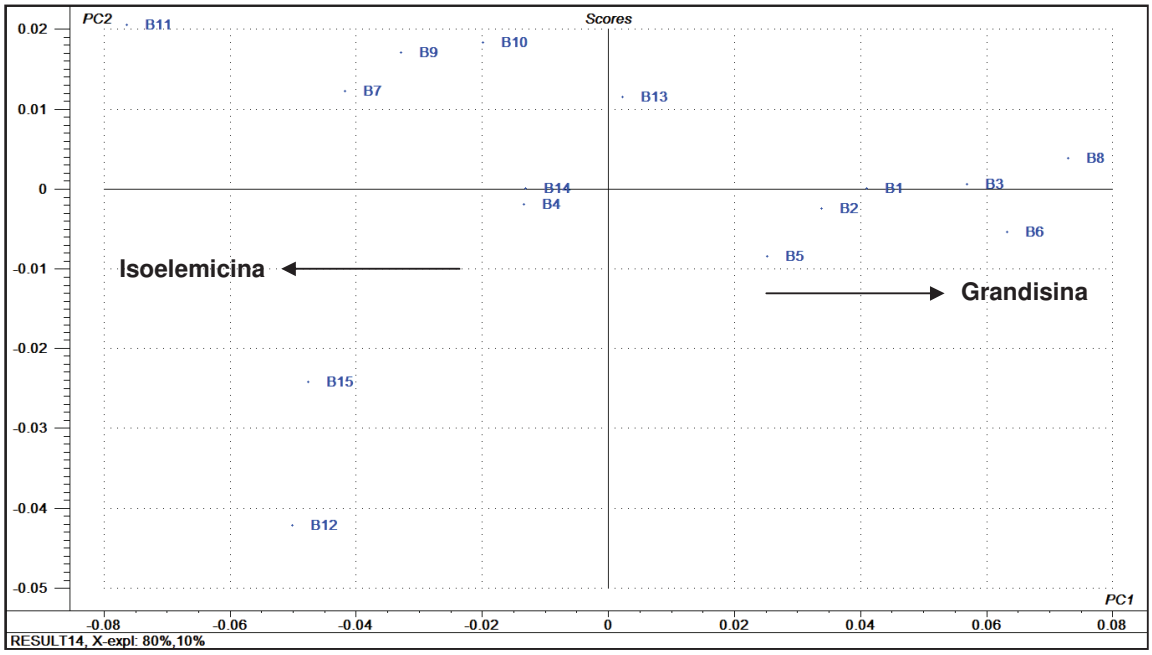


Figura 31. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **B**. Sigla e local de procedência: K-1368, Ubatuba - São Paulo.

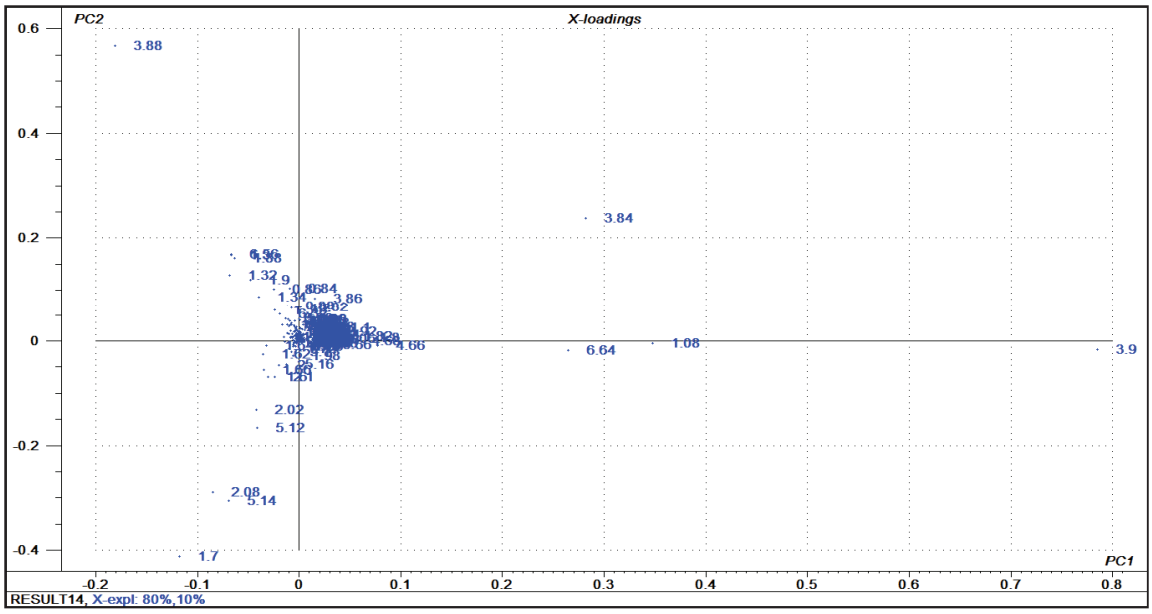


Figura 32. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **B**. Sigla e local de procedência: K-1368, Ubatuba - São Paulo.

4.2.4.3. Grupo C (Teresópolis, RJ, sigla K-1329)

As espécies do grupo **C** são caracterizadas pelo acúmulo de lignanas tetraidrofurânicas e fenilpropanoides. Três indivíduos dessa população distanciaram-se do cluster principal, destacando-se uma única espécie **C9** com perfil metabólico semelhante ao das espécies do grupo **D**, as quais acumulam preferencialmente lignanas do tipo benzofurânicas. Para os indivíduos **C2** e **C4** foi observado um decréscimo bastante acentuado nos sinais característicos de lignanas (aromáticos e de metoxilas), que deram lugar a um conjunto de sinais intensos na região alifática que influenciaram significativamente na separação desses espécimens dos demais no gráfico de *scores* gerados na analise de PCA (Figuras 33 e 34), situação semelhante ao observado para três representantes do grupo **A** (Figuras 29 e 30). O PCA pôde explicar 90% da variância entre as amostras, sendo 77% explicado pela PC1 e 13% pela PC2.

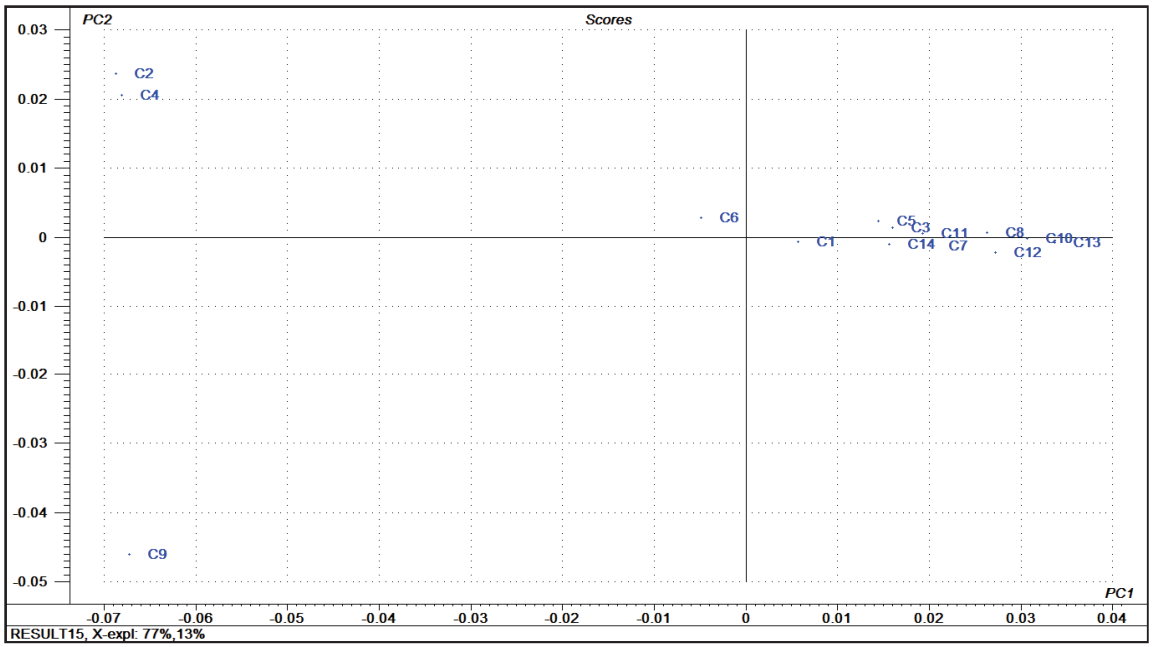


Figura 33. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **C**. Sigla e local de procedência: K-1329, Teresópolis, Rio de Janeiro.

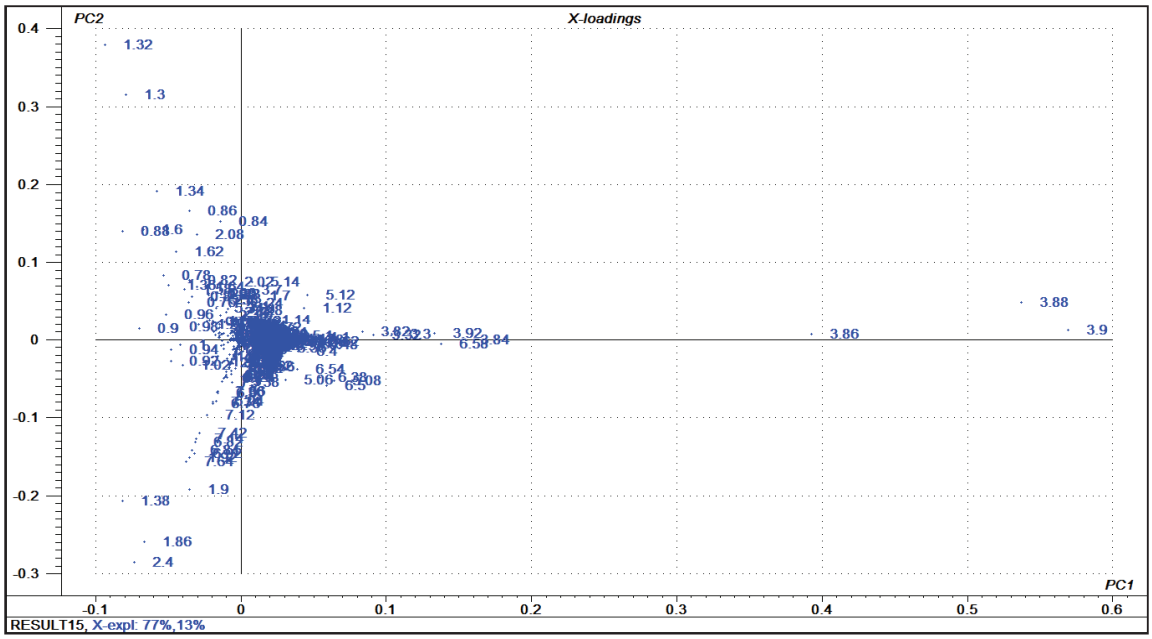


Figura 34. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **C**. Sigla e local de procedência: K-1329, Teresópolis, Rio de Janeiro.

4.3.4.4. Grupo D (Itatiaia, RJ, sigla K-1316)

O perfil químico das espécies do grupo **D** foi caracterizado pela presença acentuada de lignanas benzofurânicas. Entretanto, os espécimens **D4**, **D6** e **D9** acumulam fenilpropanoides como principais produtos, levando a separação destes indivíduos do cluster principal, sendo essa diferença explicitada pela análise de PCA em 83%, sendo 59% resolvido pela PC1 e 24% pela PC2 (Figuras 35 e 36).

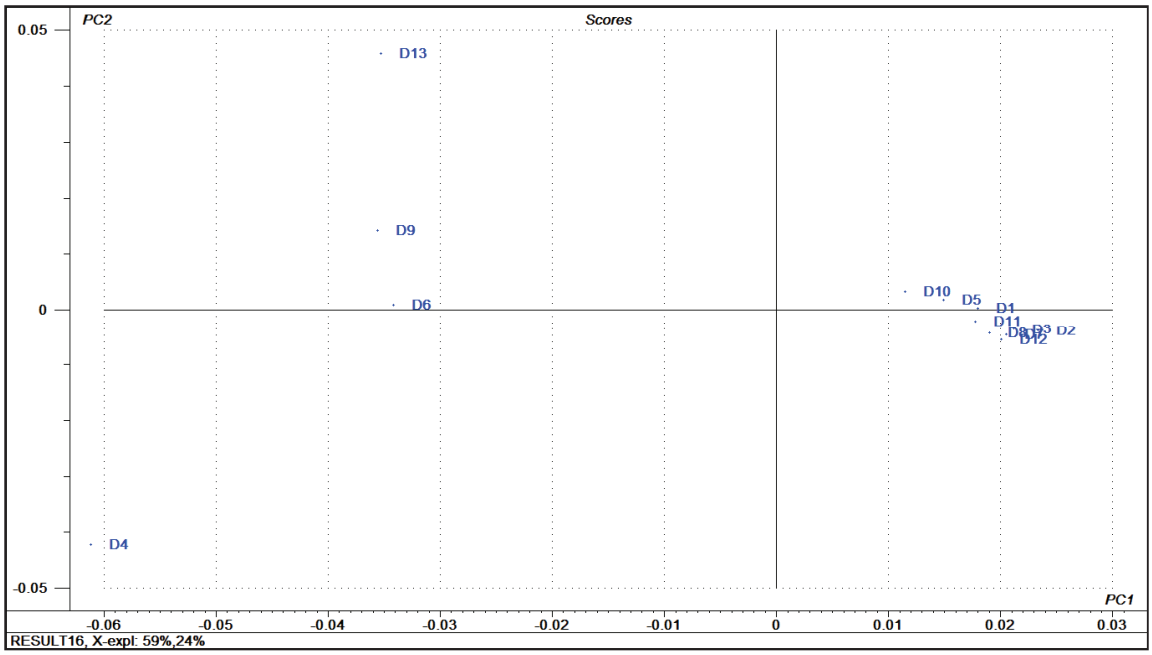


Figura 35. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum* pertencentes ao grupo **D**. Sigla e local de procedência: K-1316, Itatiaia, Rio de Janeiro.

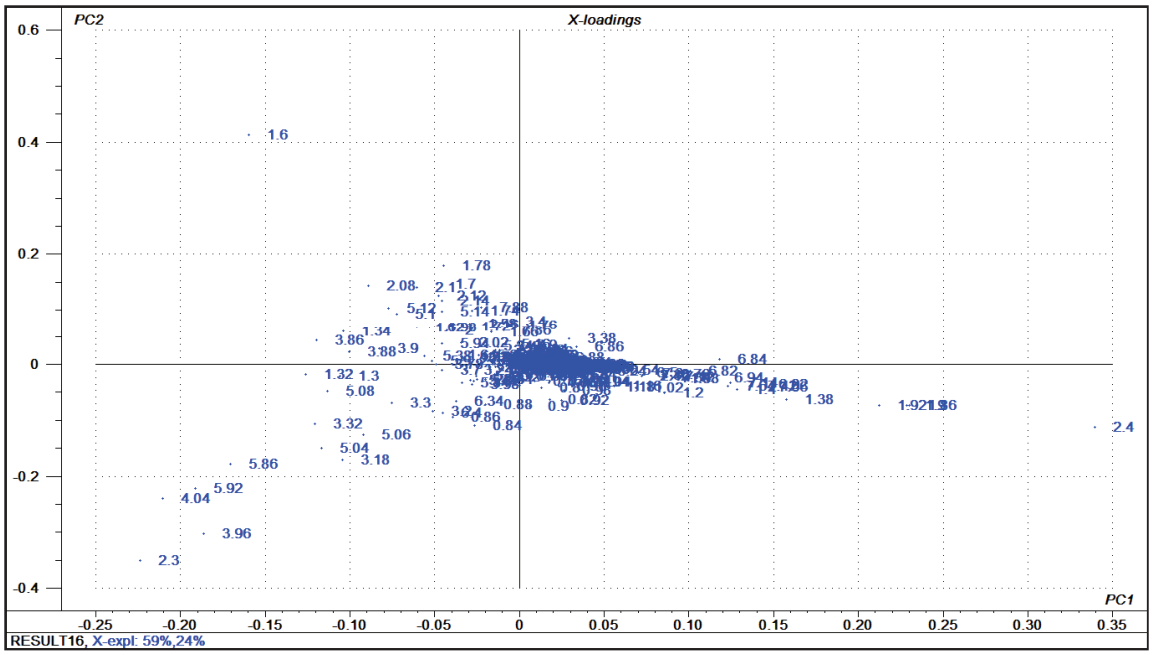


Figura 36. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* pertencentes os grupo **D**. Sigla e local de procedência: K-1316, Itatiaia, Rio de Janeiro.

4.2.5. Análise inter-populacional em *P. solmsianum*

A análise do diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H dos extratos brutos de *P. solmsianum* permite distinguir quatro grupos principais que foram consistentes com o conjunto de espécies de cada localidade de coleta (Figuras 37 e 38).

O perfil químico das espécies que compõem o grupo **A** é caracterizado pela presença dos fenilpropanoides apiol e miristicina e de lignanas tetraidrofurânicas com o padrão de substituição 3,4,5-trimetoxi e 3,4-metilenodioxi-5-metoxi (Amaral, 2008). O atributo que se destacou no perfil químico destas espécies foi o sinal em δ 5,96 ppm (s, 2H), indicando a presença de um grupo metilenodioxifenílico, e os sinais intensos de metoxilas em δ 3,86 (s, 3H) e 3,88 ppm (s, 3H), que influenciaram a formação deste agrupamento.

Dentre as populações analisadas, o grupo **B** foi a que apresentou o maior conteúdo de (–)-grandisina, sendo que em 1/3 dos indivíduos amostrados também

apresentaram isoelemicina em seus perfis metabólicos. A (–)-grandisina consiste em uma lignana tetraidrofurânica com sinais característicos no espectro de RMN de 4 metoxilas nas posições 3 e 3'-OCH_3, 5 e 5'-OCH_3 em δ 3,84 ppm (s, 12H) e mais 2 metoxilas nas posições 4 e 4'- OCH_3 em δ 3,89 ppm (s, 6H), do sinal em δ 6,64 (s, 4H) referente aos 4 hidrogênios aromáticos H-2, H-6, H-2' e H-6', além da metila δ 1,08 (d, J=6,6 Hz, 3H) em H-9 e H-9'. Sua configuração toda *trans* conduz à coincidência dos sinais relativos aos hidrogênios do anel tetraidrofurânico, sendo portanto observado apenas um sinal referente aos H-7 e H-7' em δ 4,66 ppm (d, J=6,6 Hz, 2H) e um sinal em δ 1,75 ppm (m, 2H) para os H-8 e H-8'. No espectro da isoelemicina, os sinais característicos são as metoxilas das posições 3-OCH_3 e 5-OCH_3 em δ 3,84 ppm (s, 6H), os hidrogênios aromáticos de H-2 e H-6 em δ 6,55 ppm (s, 2H) e os sinais olefínicos de H-8 em δ 6,40 ppm (m, 1H). Os valores de deslocamento químico dos H-8 em fenilpropanoides são bastante influenciados pela configuração da dupla ligação ou pela substituição na cadeia lateral sendo, portanto, uma importante aspecto para a identificação dessas lignanas.

Nas amostras do grupo **C** foi possível notar uma diminuição da intensidade dos sinais referentes a grandisina e o incremento dos sinais relativos ao fenilpropanoide elemicina. Este grupo exibiu homogeneidade na proporção do teor de metabólitos, com apenas três indivíduos diferenciados por apresentarem sinais típicos de lignanas benzofurânicas, fato que induziu alguns espécimens do grupo **C** a se agruparem com o grupo **D**.

A diferença entre os perfis das amostras do grupo **D** e dos demais grupos é bastante pronunciada, uma vez que os sinais de metoxilas praticamente desaparecem e dão lugar a um novo padrão de sinais ocorrendo na região alifática e aromática, que influenciaram a formação de um agrupamento consistente para o grupo **D**. Destacam-se os sinais em δ 1,37 (d, J= 6,8 Hz, 3H, H-9) e 1,86 ppm (dd,

J=6,6 e 1,75 Hz, 3H, H-9') que são atribuídos às metilas H-9 presentes nas estruturas de neolignanas diidrobenzofurânicas como o conocarpano, e os sinais em δ 1,90 (dd, J=6,6 e 1,75 Hz, 3H, H-9) e δ 2,40 ppm (s, 3H, H-9) referentes as metilas H-9 e H-9' das lignanas benzofurânicas, como os eupomatenoides. Outro conjunto de sinais bastante diferenciados foi observado na região entre δ 6,0-7,0 atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-7' e H-8' entre δ 7,0-8,0 ppm relativos aos hidrogênios aromáticos comuns nas posições 2, 3, 5, 6, 2', 5' e 6'.

Este tratamento evidenciou 85% da variância entre os dados, sendo 72% deles explicados por PC1 e 13% por PC2.

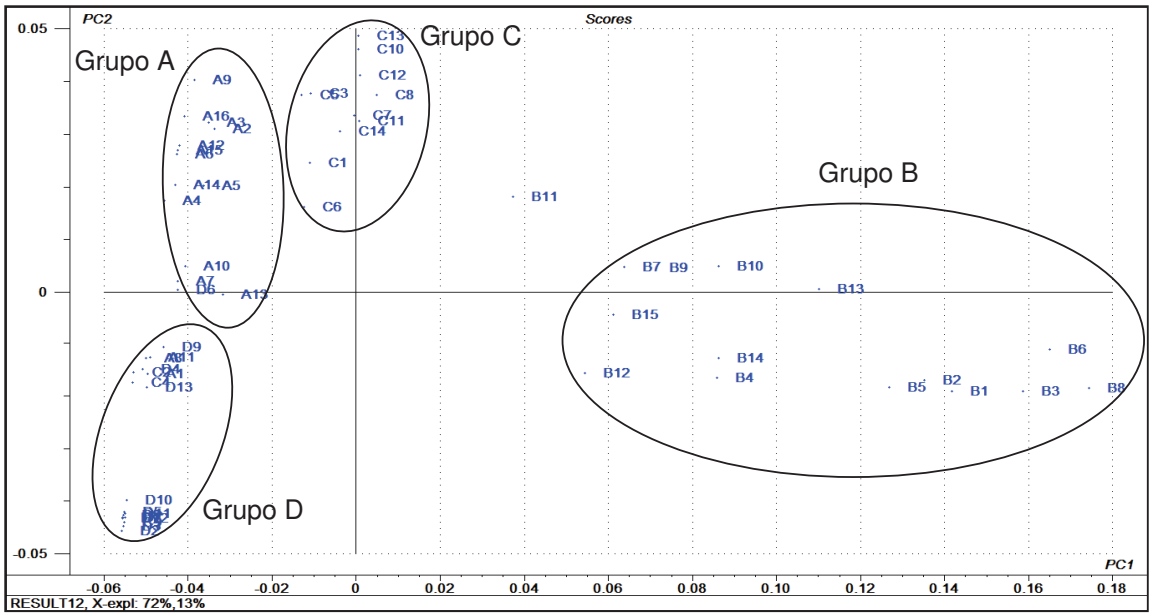


Figura 37. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de todos os espécimens de *P. solmsianum*. Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ).

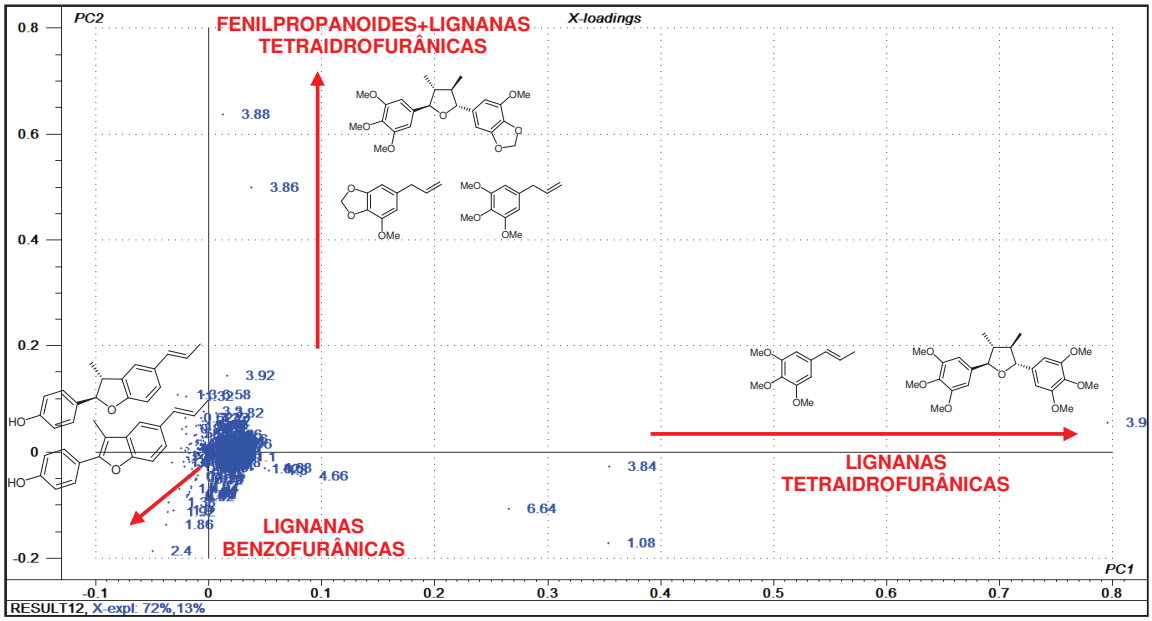


Figura 38. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum.* Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ).

No espectro de RMN de ^{1}H da fração hidroalcoólica, pode-se observar sinais indicativos da presença de açúcares e aminoácidos. Os indivíduos dos grupo **A** apresentaram-se agrupados em um cluster, entretanto, as demais amostras não demonstraram diferenças significativas, sendo pouco informativas para distinção das espécies de acordo com seus perfis químicos (Apêndice 3, Figuras 93, 94 e 95).

A análise do perfil químico somado à técnica de PCA têm sido utilizado com sucesso na classificação metabólica e diferenciação de cultivares de plantas comercializadas ou com aplicações farmacêuticas e medicinais, tais como *Cannabis sativa* (Choi et al., 2004), *Camellia sinensis* (Le Gall et al., 2004), *Panax ginseng* (Lee et al., 2009), *Ilex paraguariensis* (Kim et al., 2010b) e *Withania somnifera* (Bhatia et al., 2013).

Considerando todos os resultados nesta análise, o uso de dados de RMN de ^{1}H combinados com a análise multivariada apresentou-se como uma ferramenta promissora para a o agrupamento dos espécimens de *P. solmsianum* de acordo com seus perfis metabólicos, característicos das populações de cada região amostrada. O PCA mostrou-se sendo uma técnica consistente, rápida, reprodutível e informativa, e que permitiu uma separação eficiente entre as populações de *P. solmsianum* sem qualquer passo de pré-purificação.

4.2.6. Variabilidade genética utilizando marcadores de microssatélites (*simple sequences repeats* - SSR)

Os microssatélites foram descritos no início dos anos 80, através de experimentos utilizando ultracentrifugação das moléculas de DNA. Foi observado que, quando as moléculas de DNA são ultracentrifugadas em presença de cloreto de césio, sal que permite a formação de um gradiente de densidade na solução, são formadas fases acima e abaixo da maior parte do DNA. Essas frações foram

analisadas, e descobriu-se que consistiam de pequenas sequências repetidas em *tandem*. A natureza da variação entre os indivíduos e populações é o número de repetições que existem dos microssatélites, o que demonstrou a utilidade desses marcadores na caracterização de polimorfismos (Ferreira and Grattapaglia, 1996; Matioli and Passos-Bueno, 2001).

Com o intuito de dar consistência a análise química, foram realizados estudos combinados com a técnica de microssatélite. As análises de microssatélites têm sido amplamente utilizadas para definir a diversidade genética e as relações de parentesco em plantas, inclusive para alguns representantes de *Piper*, como *P. nigrum* (Menezes et al., 2009) e *P. polysyphonum* (Liao et al., 2009). O mapeamento e a análise dos microssatélites para *P. solmsianum* (Anexo 1) foram desenvolvidos no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em colaboração com o Dr. Carlos Colombo.

Para a análise do perfil genético de *P. solmsianum* foram selecionados 72 espécimens, dos quais 58 deles correspondem aos mesmo indivíduos submetidos à análise química incluindo replicatas adicionadas para dar robustez à análise. Os microssatélites foram utilizados para avaliar o polimorfismo entre os indivíduos e entre as populações. O programa *Structure* (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para a obtenção da estrutura genética dos indivíduos de acordo com seguintes parâmetros: (*i*) 500.000 simulações de cadeia de Markov Monte Carlo, (*ii*) *burn in* (descarte inicial) de 500.000, (*iii*) modelo de ancestralidade se miscigenação e (*iv*) modelo de frequências alélicas correlacionadas. As simulações de agrupamento (*K*) foram estimadas no programa de acordo com o método descrito por Evanno (Evanno et al., 2005) e variam de 1 a 10. A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrograma gerado pela de matriz de distâncias genéticas de Nei (Nei, 1987) e pelo critério de agrupamento UPGMA (Sokal and Michener,

1958), através do programa NTSYS (Rohlf, 2000).

As quatro coletas iniciais que compunham os 72 genótipos foram submetidas à análise de grupos genéticos independentes através do programa *Structure* (Pritchard et al., 2000), que indica o número mais provável de populações através da determinação do valor de *K*. Essa análise identificou *clusters* com base no ajuste de proporções de Hardy-Weinberg e seus equilíbrios de ligação. O número mais provável de grupos distintos (*K*) de acordo com o procedimento de Evanno (Evanno et al., 2005) foi de três *clusters*, ou seja, K = 3 (Figura 39). Esse resultado revela que os indivíduos coletados em duas regiões distintas, Teresópolis e Itatiaia, ambas no estado do Rio de Janeiro (RJ) formam uma única população (grupos **C** e **D**, destacados em verde na Figura 39). Já as duas outras coletas nas regiões de Ubatuba e da CUASO-USP, ambas no Estado de São Paulo, apresentaram-se como populações distintas, mantendo a separação inicial na ordem de coleta (destacados em vermelho e azul na Figura 39, respectivamente).

Os mesmos genótipos foram classificados pelo método UPGMA a partir das relações de distâncias genéticas calculadas entre eles. O dendrograma (Figura 39) revela grande semelhança com os grupos revelados pela análise bayesiana do programa *Structure*, muito embora a estruturação revelada pelo método UPGMA tenha sido mais bem sucedida para agregar indivíduos de mesmas localidades de coleta.

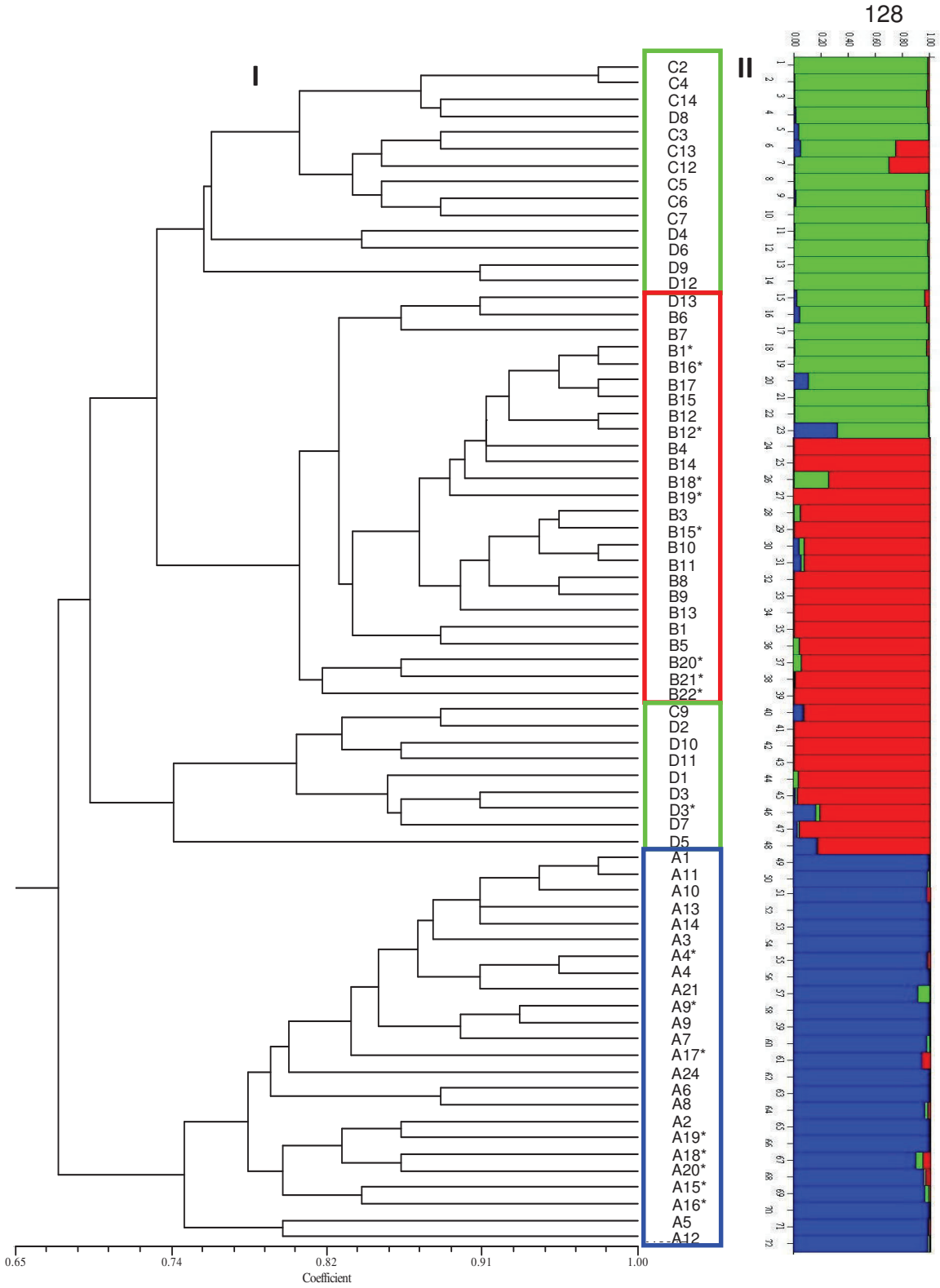


Figura 39. (I) Dendrograma da distância genética entre os 72 indivíduos de *P.solmsianum* definido pelo critério de agrupamento UPGMA, baseado no índice de Jaccard, gerado pelo software NTSYS. **(II)** Gráfico de barras indicando o número de *clusters* obtido pelo software *Structure*. Indivíduos são representados pelas barras verticais. Indivíduos com as mesmas cores indicam que pertencem ao mesmo *cluster*. Gráfico em verde: população formada pelos indivíduos das coletas das regiões de

Teresópolis e Itatiaia, RJ (grupos **C** [K1329] e **D** [K1316]); Gráfico em vermelho: população formada pelos indivíduos da coleta da região de Ubatuba, SP (grupo **B** [k1368]); Gráfico em azul: população formada pelos indivíduos da coleta da região da CUASO, SP (grupo **A** [k1384]).(*): Indica indivíduos coletados como replitcatas.

Os locos SSR desenvolvidos para *P. solmsianum* são inéditos e foram suficientemente informativos para estabelecer relações de parentesco entre os acessos avaliados e estruturar a diversidade genética. Dos 9 locos adotados, sete deles apresentaram desvios significativos quanto ao equilíbrio de Hardy-Weimberg esperado, sugerindo que as populações estão sofrendo alguma pressão seletiva ou que a amostragem realizada não foi suficientemente representativa para caracterizá-las geneticamente. O índice de fixação intra-populacional estimado apresentou valor médio de endogamia relativamente baixo, sugerindo o predomínio de fecundação cruzada entre indivíduos, caracterizando tendência para alogamia. De fato, do total de diversidade encontrada, a maior parte (aproximadamente 70%) está alocada para variações intra-populacionais e o restante (30%) para variações inter-populacionais, o que é esperado para espécies alogâmicas. Em relação à estruturação da diversidade genética, houve clara tendência de grupamento dos genótipos do estudo em função de suas localidades de coleta. A metodologia bayesiana do programa *Structure* (Figura 39, **II**) revelou três grandes grupos, dois deles formados em função das localidades de coleta (grupos **A** e **B**), enquanto que em um terceiro grupo foram alocados tanto genótipos de Itatiaia quanto de Teresópolis (grupos **C** e **D**). Muito embora essas duas localidades representem ambientes geográficos de mesma altitude, que possa explicar semelhanças adaptativas idênticas para os genótipos dessas localidades (Gavrilets et al., 1998; Smith et al., 2008), os mesmos indivíduos foram separados em grupos distintos por meio do modelo UPGMA.

Os caracteres taxonômicos tais como porte, formato das folhas, pilosidade,

tipos de inflorescências e frutos são usualmente empregados para identificação das espécies de *Piper.* Entretanto, as espécies de *Piper* são caracterizadas pelas suas infrutescências e flores primitivas, fato que pode representar uma adversidade para as identificações. Portanto, faz-se necessário somar as técnicas de análise do perfil químico e de marcadores moleculares com os dados morfológicos, a fim de aperfeiçoar o processo de classificação taxonômica. Esforços nesse sentido têm avançado em estudos com outras espécies.

O emprego da correlação positiva entre a diversidade química e genética foi analisada para a populações selvagens e cultivadas da espécie de interesse comercial e medicinal *Panax ginseng* (Schlag and McIntosh, 2013). Utilizando-se marcadores de polimorfismo pela técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) para avaliar a variabilidade genética dos indivíduos, foram gerados agrupamentos que apresentaram correspondência muito próxima aos quimiotipos determinados pela análise dos perfis químicos, deixando claro que o emprego destas técnicas combinadas podem ser de grande utilidade.

Embora seja possível uma clara distinção entre os espécimens de *P. solmsianum* através da análise dos perfis químicos, estes constituem-se em parte do fenótipo e estão sujeitos a oscilações no teor e composição em resposta à variações ambientais. Por outro lado, os microssatélites são independentes do efeito dessas variações e, portanto, são uma ferramenta imprescindível para a completa identificação das espécies. Além disso, torna-se possível acessar a variabilidade entre espécies e populações e apontar os processos que exercem pressão evolutiva sobre os indivíduos, abrindo assim uma nova perspectiva para direcionar esforços na conservação, manejo e exploração destas espécies.

Os resultados indicaram o potencial da análise do perfil químico e dos microssatélites para distinguir as espécies morfologicamente similares de *P.*

solmsianum, uma vez que os dados obtidos das análises químicas e genéticas foram bastante congruentes, apontando a formação de populações específicas de cada local de coleta.

4.3) Genes envolvidos na biossíntese de lignóides

A espécie *P. solmsianum* possui um perfil metabólico com clara produção e acúmulo de lignanas tetraidrofurânicas. Tal característica torna essa espécie um excelente modelo para o estudo da biossíntese de lignanas tetraidrofurânicas que envolvem reações de acoplamento oxidativo que requerem o desenvolvimento e o recrutamento de genes altamente específicos nas etapas de formação dos precursores e dimerização destes metabólitos.

A biossíntese proposta para as lignanas em *P. solmsianum* envolve a via do metabolismo fenilpropanoídico (Figuras 40 e 41), e inicia-se a partir da desaminação da fenilalanina gerando o ácido cinâmico que após etapas de redução e metilação leva a formação do álcool sinapílico. A redução do álcool sinapílico para gerar o acetato de sinapila requer a participação de uma enzima do tipo acetiltransferase (AcT), responsável pela acilação do álcool sinapílico na posição C-9, gerando um melhor grupo de saída. A posterior eliminação do grupo acetila é mediada pela ação da enzima propenilfenol sintase (PPS), gerando assim o *E*-5-metóxi-isoeugenol (Figura 40).

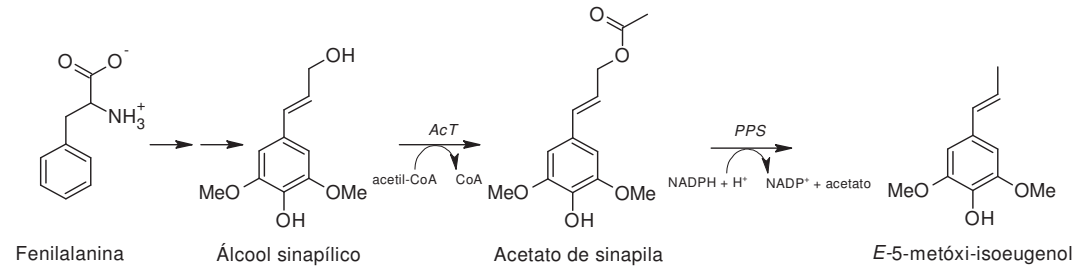


Figura 40. Biogênese proposta para a formação do *E*-5-metóxi-isoeugenol em *P. solmsianum.*

As lignanas tetraidrofurânicas em *P. solmsianum* seriam oriundas do acoplamento oxidativo de duas unidades de *E*-5-metóxi-isoeugenol que leva à di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina, que após uma etapa de metilação resultaria na (–)-grandisina (Figuras 40 e 41), o produto majoritário encontrado nessa espécie. Os ensaios *in vitro*, com preparações enzimáticas extraídas das folhas de *P. solmsianum*, demonstraram a enantiosseletividade da reação de acoplamento que promove a formação exclusiva do isômero (–)-di-*O*-4,4'-desmetilgrandisina (100% *ee*) a partir do *E*-5-metóxi-isoeugenol (Martins, 2002).

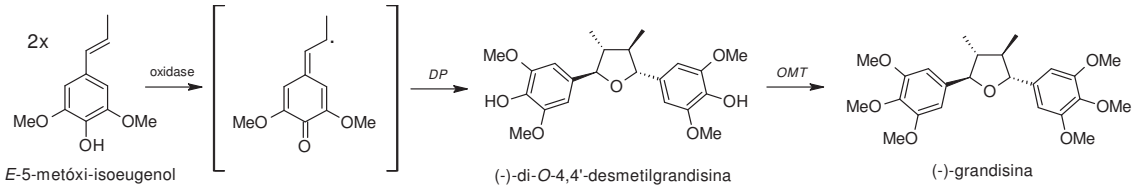


Figura 41. Biossíntese proposta para a (-)-grandisina em *P. solmsianum.*

O processo de formação de lignanas é mediado por ação de enzimas específicas e por esta razão as lignanas possuem um controle biossintético notável originando produtos enantiomericamente puros. Foi observado que este controle estéreo- e enantiosseletivo devia-se não às peroxidases atuantes, mas a uma classe

de proteínas denominadas proteínas dirigentes (Davin et al., 1997; Gang et al., 1999; Halls and Lewis, 2002; Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007).

A fim de lançar luz às relações entre os genes envolvidos na biossíntese de lignóides em *P. solmsianum* e suas funções, foram selecionados para o presente estudo os genes: acetiltranferase (AcT), propenilfenol sintase (PPS) e proteína dirigente (PD).

4.3.1. Acetiltransferase em *P. solmsianum* (PsAcT)

Para a amplificação da região do gene acetiltransferase em *P. solmsianum* (PsAcT), foram desenhados um conjunto de iniciadores baseados em sequências de peptídeos descritas de genes relacionados em *Petunia hybrida* (PhCFAT) (Dexter et al., 2007) e *Larrea tridentata* (Vassão et al., 2007) (Tabela 8, **item 3.7.4**). As bandas mais promissoras, que apresentavam o tamanho esperado para o amplificado, foram recuperadas dos géis, clonadas e sequenciadas (Figuras 42 e 43).

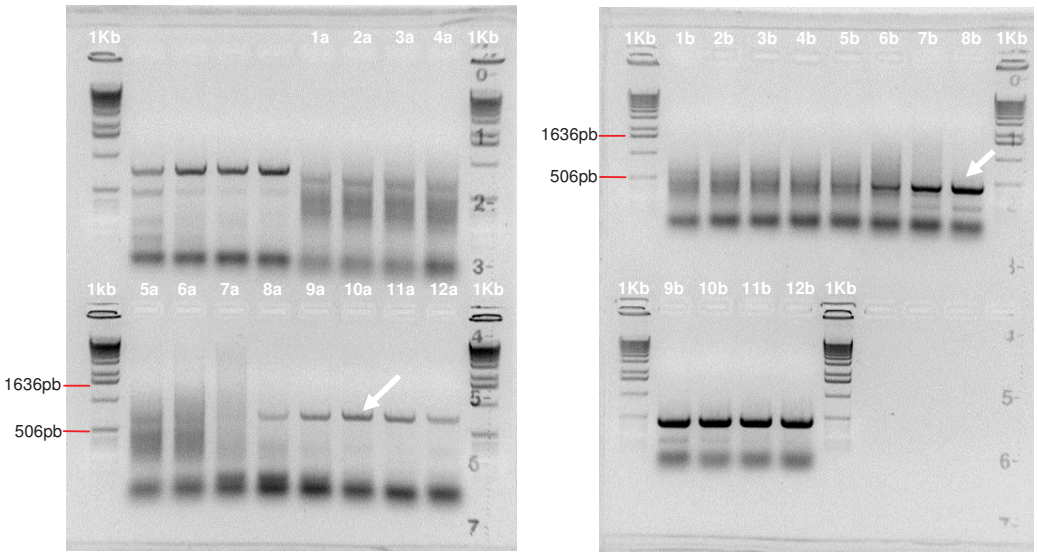


Figura 42. Géis de agarose 0,8% do amplificado com iniciadores para PsAcT. Os números de 1-12 indicam os gradientes de temperatura em cada uma das linhas do termociclador (Tabela 9). As letras que seguem os números respresentam o conjunto de iniciadores utilizados: a) AcT Dir1 + AcT Rev1. b) AcT Dir2 + AcT Rev1. As setas indicam as bandas recuperadas do gel.

A pesquisa no banco de dados NCBI com a ferramenta BlastX (Figuras 44 e 45) indicou que duas das bandas amplificadas, denominadas de PsAcT-1 (418 pb, equivalentes a 139 aminoácidos) e PsAcT-2 (386 pb, equivalentes a 128 aminoácidos) fazem parte da classe das enzimas acetiltranferases.

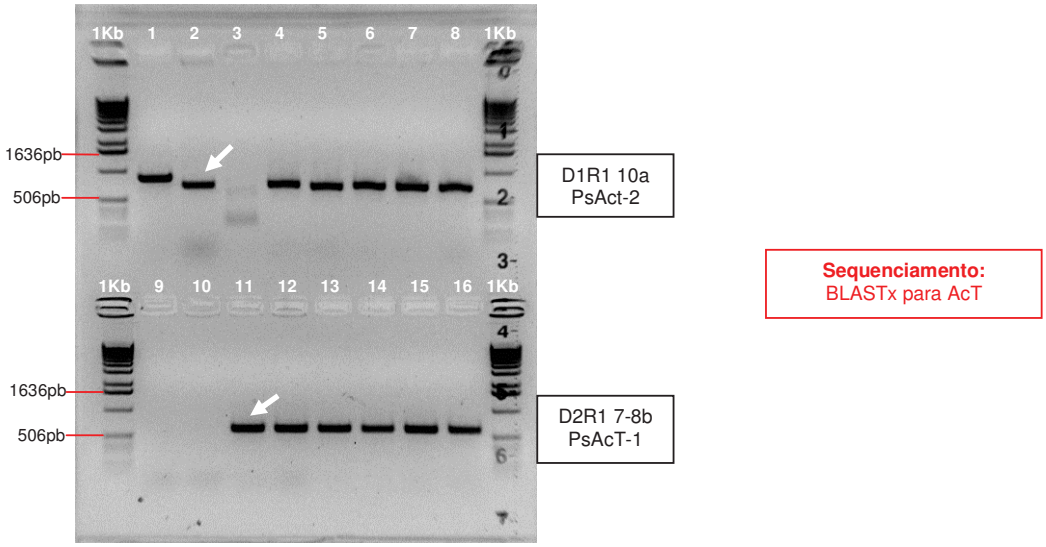


Figura 43. Gel de agarose 0,8% das bandas recuperadas da amplificação da região AcT com os iniciadores AcT Dir1+Rev1 e AcT Dir2+AcT Rev1, clonadas no vetor pCR-4.

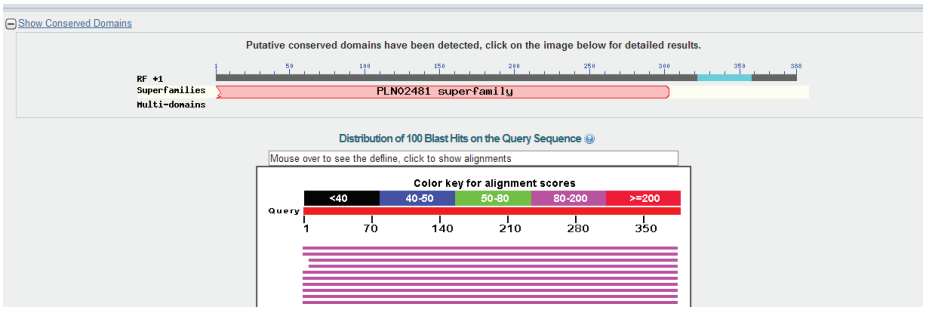


Figura 44. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para a sequência parcial do gene acetiltransferase de *P. solmsianum* PsAcT-1. Data de acesso: 26/06/2013.

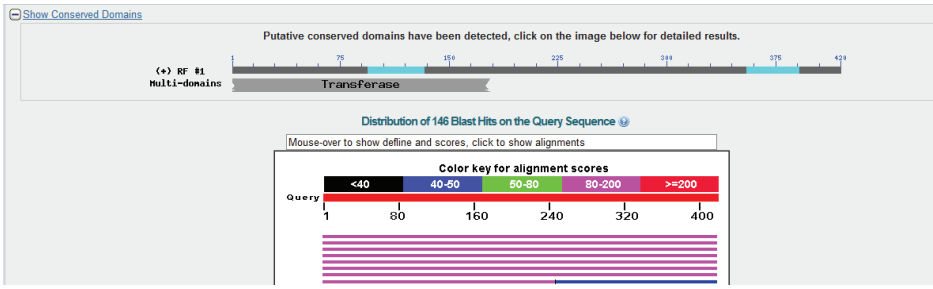


Figura 45. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para sequência parcial do gene acetiltransferase de *P. solmsianum* PsAcT-2. Data de acesso: 26/06/2013.

Estudos sobre a biossíntese do eugenol/isoeugenol apontaram que durante a formação destes importantes componentes do aroma de uma variedade de plantas, é utilizado como substrato um éster do álcool coniferílico (Dexter et al., 2007; Koeduka et al., 2009a; Koeduka et al., 2009b; Koeduka et al., 2006). A enzima responsável pela formação deste intermediário acetilado a partir do álcool foi caracterizada como *coniferyl alcohol acetyltransferase*, pertencente à família BAHD (Dexter et al., 2007). Os membros desta família de enzimas apresentam principalmente dois motivos conservados. O primeiro deles, HxxxD é localizado próximo a porção central das enzimas que utilizam como substrato os tioésteres da coenzima-A. O motivo DFGWG fica localizado próximo à porção C-terminal e não pôde ser visualizada nos fragmentos PsAcT. Praticamente todas as enzimas dessa classe apresentam estes motivos conservados, e mutações sítio-direcionadas demonstraram que deleções ou mutações em um ou ambos motivos reduzem grandemente a atividade das enzimas, indicando serem sítios catalíticos importantes (D'Auria, 2006; St Pierre and de Luca, 2000).A sequência PsAcT-1 apresentou 50% de identidade com a enzima *coniferyl alcohol acetylltransferase* de *Petunia hybrida* (PhCFAT) (número de acesso no NCBI: ABG75942), 49% com *HxxxD-type acyl-transferase* de *A. thaliana* (nº acesso: NP178020) e 54% com *HxxxD-type acyl-transferase* de *Theobroma cacao* (nº acesso: EOY26188) (Figura 44). A sequência

PsAcT-2 demonstrou 52% de identidade com PhCFAT (nº acesso ABG75942) e 57% com a enzima *HxxxD-type acyl-transferase* de *Arabidopsis thaliana* (nº acesso: NP178020) (Figura 45). As sequências PsAcT apresentaram similaridade quando alinhadas com as sequências já identificadas de BAHD obtidas do banco de dados, e a sequência PsAcT-1 exibiu o domínio conservado HxxxD, que caracteriza as BAHD (Figura 46).

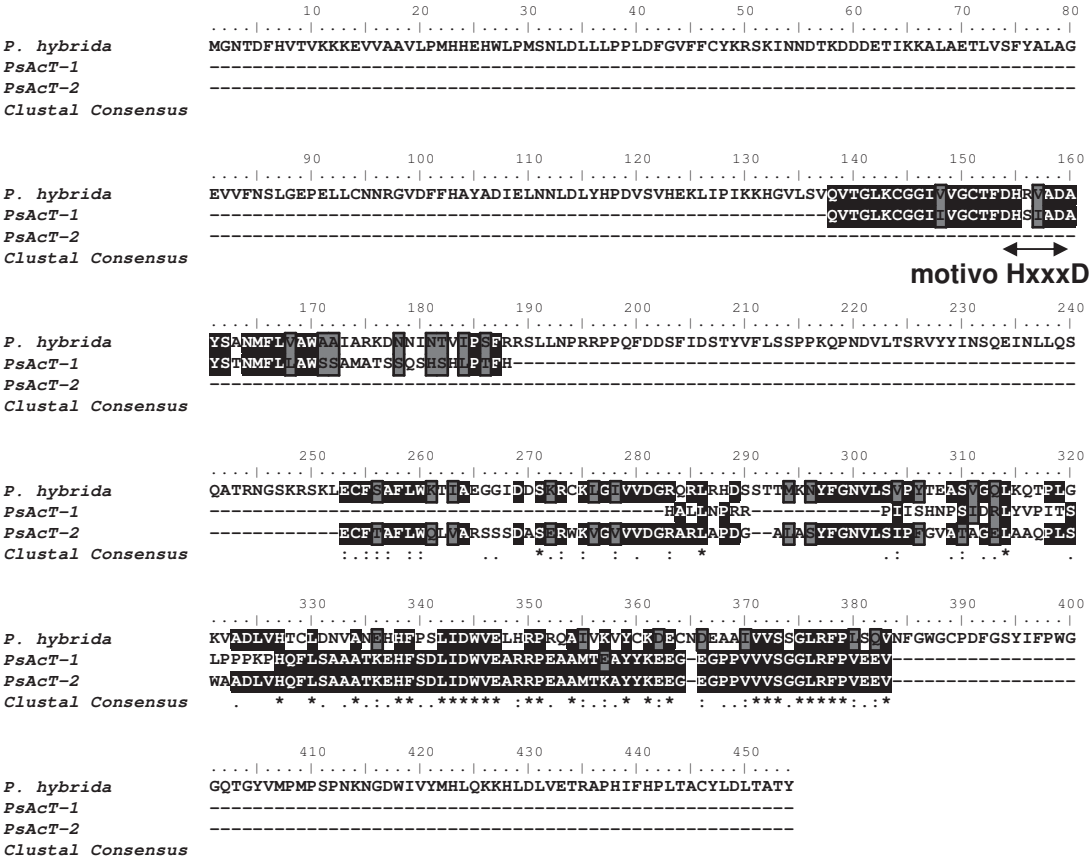


Figura 46. Alinhamento dos fragmentos do gene acetiltransferase (AcT) de *P. solmsianum* com a sequência da enzima coniferil álcool aciltransferase (*Petunia hybrida,* nº acesso ABG75942). PsAcT: região do gene acetiltransferase amplificado de *P. solmsianum* (os números 1 e 2 indicam sequências obtidas com diferentes iniciadores). A seta dupla indica um dos motivos conservados, HxxxD, característicos da família de BAHD aciltransferases (acesso dia 14/08/2012). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW).

Estes resultados evidenciaram a presença de aciltranferases em *P. solmsianum*, e a caracterização parcial das sequências obtidas de PsAcT apontaram seu proximidade com as enzimas que levam a formação dos fenilpropanoides.

4.3.2. Propenilfenol sintase em *P. solmsianum* (PsPPS)

Para a obtenção do gene PPS foram testados dois conjuntos de primers baseados em sequências já descritas na literatura para isoeugenol sintase (IGS) (Koeduka et al., 2008; Louie et al., 2007). Para a amplificação da sequência completa do gene PPS, foi empregada a técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), e a sequência completa da região codificante do gene foi clonada e sequenciada para confirmação (Figura 47). Este gene de 960 nucleotídeos codifica a proteína correspondente com 320 aminoácidos, com massa molecular estimada de 35745,30 Da e pI estimado de 5,75 (Figura 47 e 48).

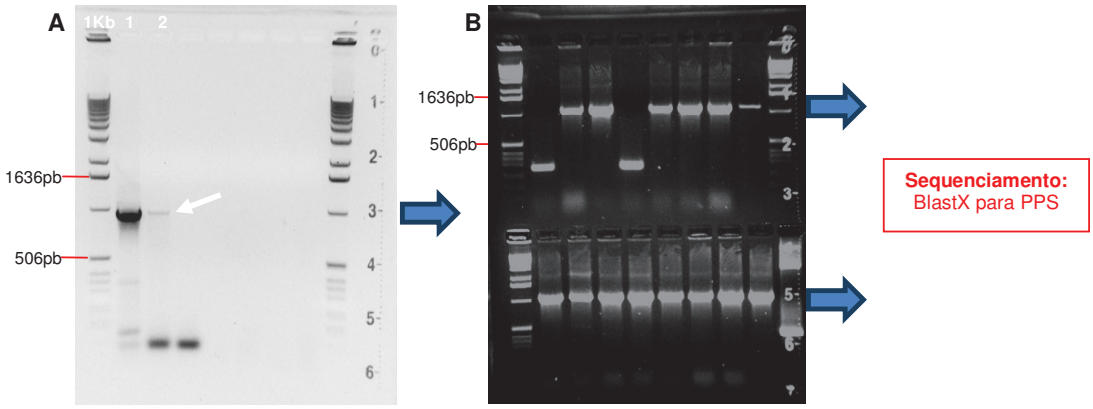


Figura 47. A: Gel de agarose 0,8% com o gene completo PsPPS amplificados nas reações 1 e 2. **B**: Gel de agarose das colônias contendo o inserto de PPS da reação 1 (acima) e 2 (abaixo).

```
BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07) Restriction Mapping Utility (c)1998,  Tom Hall

PPS_Psolm_NY4 Restriction Map
960 base pairs
         M  D  M  V  R  S  R  I  L  I  F  G  A  S  G  Y  L  G  K  Y  M  V  R  A  S  M  A
1       ATGGATATGGTGAGAAGTCGAATTCTTATCTTTGGTGCTAGTGGGTACCTGGGGAAGTACATGGTTAGGGCGAGTATGGC   80
1       TACCTATACCACTCTTCAGCTTAAGAATAGAAACCACGATCACCCATGGACCCCTTCATGTACCAATCCCGCTCATACCG   80

          M  G  H  P  T  L  V  F  V  R  P  I  D  A  S  A  P  P  S  K  L  E  V  I  E  E
81      CATGGGGCATCCCACCCTTGTGTTCGTCCGGCCAATTGATGCATCAGCTCCCCCCTCTAAATTGGAAGTTATCGAGGAGT   160
81      GTACCCCGTAGGGTGGGAACACAAGCAGGCCGGTTAACTACGTAGTCGAGGGGGGAGATTTAACCTTCAATAGCTCCTCA   160

        F  E  S  M  G  V  K  V  F  Q  G  D  L  S  D  H  G  K  L  V  S  V  I  K  Q  A  D
161     TTGAATCCATGGGTGTCAAAGTGTTTCAGGGAGATTTAAGTGATCATGGTAAGCTTGTTTCGGTCATCAAGCAGGCAGAT   240
161     AACTTAGGTACCCACAGTTTCACAAAGTCCCTCTAAATTCACTAGTACCATTCGAACAAAGCCAGTAGTTCGTCCGTCTA   240

         V  V  I  S  V  L  A  S  P  Q  H  L  D  Q  I  K  I  I  D  A  I  K  E  A  G  N  I
241     GTGGTGATTTCAGTCCTAGCAAGTCCTCAACATCTCGATCAAATCAAAATCATCGACGCCATAAAGGAAGCTGGTAACAT   320
241     CACCACTAAAGTCAGGATCGTTCAGGAGTTGTAGAGCTAGTTTAGTTTTAGTAGCTGCGGTATTTCCTTCGACCATTGTA   320

          K  R  F  V  P  S  E  Y  G  H  E  V  D  R  V  T  V  L  P  P  F  Q  A  L  L  D
321     CAAGAGGTTTGTGCCTTCAGAGTATGGACATGAAGTGGATAGGGTGACTGTCCTTCCACCCTTCCAAGCACTACTTGATA   400
321     GTTCTCCAAACACGGAAGTCTCATACCTGTACTTCACCTATCCCACTGACAGGAAGGTGGGAAGGTTCGTGATGAACTAT   400

        I  K  K  K  I  R  R  A  T  E  A  Q  G  I  P  H  T  Y  V  V  A  N  S  L  A  A  Y
401     TCAAGAAGAAGATCAGAAGAGCTACAGAGGCACAAGGGATCCCACACACTTACGTAGTGGCCAACTCCTTGGCTGCCTAC   480
401     AGTTCTTCTTCTAGTCTTCTCGATGTCTCCGTGTTCCCTAGGGTGTGTGAATGCATCACCGGTTGAGGAACCGACGGATG   480

         F  V  D  Y  L  L  H  P  R  D  Q  E  R  D  A  V  T  I  F  G  D  G  T  A  Y  A  V
481     TTTGTGGACTATCTACTCCACCCACGAGATCAAGAAAGAGACGCTGTGACGATTTTTGGCGATGGCACTGCCTATGCTGT   560
481     AAACACCTGATAGATGAGGTGGGTGCTCTAGTTCTTTCTCTGCGACACTGCTAAAAACCGCTACCGTGACGGATACGACA   560

          L  N  Y  E  E  D  V  A  S  Y  T  I  M  A  A  T  D  P  R  V  E  N  R  V  I  I
561     ACTAAACTACGAAGAAGATGTTGCTTCATATACAATCATGGCTGCAACTGACCCAAGAGTCGAGAACCGAGTTATCATAT   640
561     TGATTTGATGCTTCTTCTACAACGAAGTATATGTTAGTACCGACGTTGACTGGGTTCTCAGCTCTTGGCTCAATAGTATA   640

        L  R  P  P  G  N  I  V  S  Q  L  D  L  I  F  S  W  E  K  K  T  G  K  S  Y  K  R
641     TAAGGCCTCCTGGAAATATAGTTTCTCAGCTAGATTTGATCTTCTCGTGGGAGAAGAAGACTGGGAAGTCATATAAGAGG   720
641     ATTCCGGAGGACCTTTATATCAAAGAGTCGATCTAAACTAGAAGAGCACCCTCTTCTTCTGACCCTTCAGTATATTCTCC   720

         L  H  I  P  E  E  E  I  I  K  L  T  E  T  L  P  H  P  D  N  I  P  M  S  I  L  H
721     CTCCACATTCCCGAAGAAGAAATCATCAAGCTCACAGAAACTCTTCCGCATCCCGACAACATACCCATGTCAATCCTTCA   800
721     GAGGTGTAAGGGCTTCTTCTTTAGTAGTTCGAGTGTCTTTGAGAAGGCGTAGGGCTGTTGTATGGGTACAGTTAGGAAGT   800

          N  I  F  V  K  G  D  Q  M  G  F  E  L  R  E  D  D  L  E  A  S  A  L  Y  P  D
801     CAACATCTTCGTCAAGGGTGACCAGATGGGGTTTGAGCTCAGGGAAGATGATTTGGAGGCTTCTGCACTATACCCAGATT   880
801     GTTGTAGAAGCAGTTCCCACTGGTCTACCCCAAACTCGAGTCCCTTCTACTAAACCTCCGAAGACGTGATATGGGTCTAA   880

        Y  K  Y  T  C  V  D  S  F  L  A  R  C  V  V  D  P  P  K  P  K  L  A  T  F  A  *
881     ACAAATACACTTGTGTCGATAGTTTTTTGGCTCGTTGCGTTGTCGACCCGCCAAAACCAAAGTTAGCAACTTTTGCATAA   960
881     TGTTTATGTGAACACAGCTATCAAAAAACCGAGCAACGCAACAGCTGGGCGGTTTTGGTTTCAATCGTTGAAAACGTATT   960
```

Figura 48. Sequência completa do cDNA que codifica a proteína propenilfenol sintase de *P. solmsianum*.

4.3.2.1. Expressão heteróloga, seleção das colônias e purificação da proteína recombinante rPsPPS

O cDNA completo da região codificante do gene PsPPS apresentou elevada similaridade com membros da família de enzimas redutases PIP dependentes de NADPH (Figuras 49 e 50). A busca BlastX indicou 65% de identidade com os genes Isoeugenol sintase identificados de *Petunia hybrida* (número de acesso no NCBI: Q15GI3), 64% com *Theobroma cacau* (EOY25510), 56% com *Pimpinella anisum* (ACL13526) e 52% com *Clarkia breweri* (ABR24112).

```
                                10        20        30        40        50        60        70        80
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PsPPS                   MDMVRSRILIFGASGYLGKYMVRASMAMGHPTLVFVRPIDASAPPSKLEVIEEFESMGVKVFQGDLSDHGKLVSVIKQAD
P. hybrida              MTTGKGKILILGATGYLGKYMVKASISLGHPTYAYVMPLKKNSDDSKLQLLKEFESLGVTIFYGELSEHDKLVAVFKEVD
Clustal Consensus       *   :.:***:**:********:**:::**** .:* *:. .:  ***::::****:**.:* *:**:*.***:*:*:.*

                                90       100       110       120       130       140       150       160
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PsPPS                   VVISVLASPQHLDQIKIIDAIKEAGNIKRFVPSEYGHEVDRVTVLPPFQALLDIKKKIRRATEAQGIPHTYVVANSLAAY
P. hybrida              IVISTLAVPQYLEQLKVIEAIKEAGNIKRFVPSEFGNEVDRVRALPRFQAVLDNKKKIRRATEAAGIPFTFVSANSLTAY
Clustal Consensus       :***.** **:*:*:*:*:***************:*:***** .** ***:** ********** ***.*:* ****:**

                               170       180       190       200       210       220       230       240
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PsPPS                   FVDYLLHPRDQERDAVTIFGDGTAYAVLNYEEDVASYTIMAATDPRVENRVIILRPPGNIVSQLDLIFSWEKKTGKSYKR
P. hybrida              FVDYLLHPR-QKSEQVTIYGSGDAKAVLNYEEDVAAYTIKAADDPRAANRVLIIKPPKNIVSQLDLVSSWEKTTGSTLKM
Clustal Consensus       ********* *: : ***:*.* * **********:*** ** ***. ***:*::** ********: ****.**.: *

                               250       260       270       280       290       300       310       320
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PsPPS                   LHIPEEEIIKLTETLPHPDNIPMSILHNIFVKGDQMGFELRED-DLEASALYPDYKYTCVDSFLARCVVDPPKPKLATFA
P. hybrida              THISEQEIIKLSESINFPENIHASILHNIFIAGAQLSFELTQDHDLEASELYPNYNYTSVDEYLKICLVNPPKPKLATYA
Clustal Consensus        **.*:*****:*:: .*:**  *******: * *:.*** :* ***** ***:*:**.**.:*  *:*:********:*
```

Figura 49. Alinhamento da sequência do gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS) com a isoeugenol sintase de *Petunia hybrida* (nº de acesso: Q15GI3). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW).

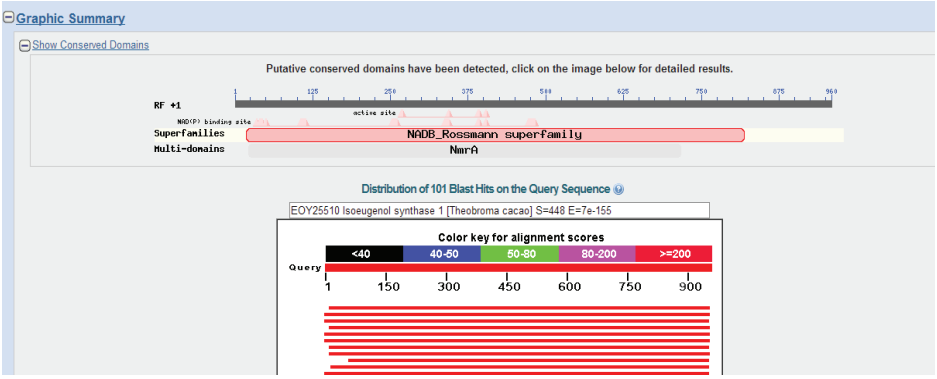


Figura 50. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para a sequência do gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* PsPPS. Data de acesso: 26/06/2013.

Após a identificação da informação completa do gene, o PsPPS foi inserido no sistema de expressão heteróloga em células de *E. coli* modificadas, utilizando-se o vetor pET 54 (Invitrogen), que expressa proteínas recombinantes fundidas com cauda His-Tag. As células foram cultivadas em meio liquido LB seletivo contendo 100µg.mL^{-1} do antibiótico carbanicilina.

Ao final de 24 horas de crescimento, as culturas que a apresentaram OD_{600}=0,5 foram submetidas à lise das células e extração das proteínas. Após a seleção visual da cepa com maior expressão da proteína de interesse (cepas C e D) no gel de poliacrilamida (Figura 51), foi realizado a *scale-up* da cultura para 1 L de meio LB contendo carbanicilina 100µg.mL^{-1}.

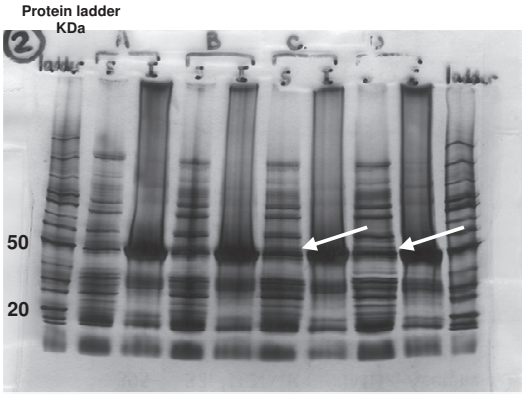


Figura 51. Gel (SDS-PAGE) com o perfil de proteínas expressas das colônias de *E. coli* modificadas contendo o gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* PsPPS. **Linhas A-D**: Colônias selecionadas. **S:** fração de proteínas solúveis. **I:** fração de proteínas insolúveis. As flechas indicam a banda de tamanho equivalente ao esperado para a proteína recombinante rPsPPS.

O extrato proteico foi submetido a fracionamento cromatográfico empregando coluna de afinidade de níquel, que permite a aderência da proteína recombinante com cauda de poli-histidina à fase fixa, sendo posteriormente eluída utilizando uma solução contendo imidazol. A análise destas frações indicou a presença de frações enriquecidas com a proteína recombinante rPsPPS, que foram utilizadas no ensaio de conversão enzimática (Figura 52).

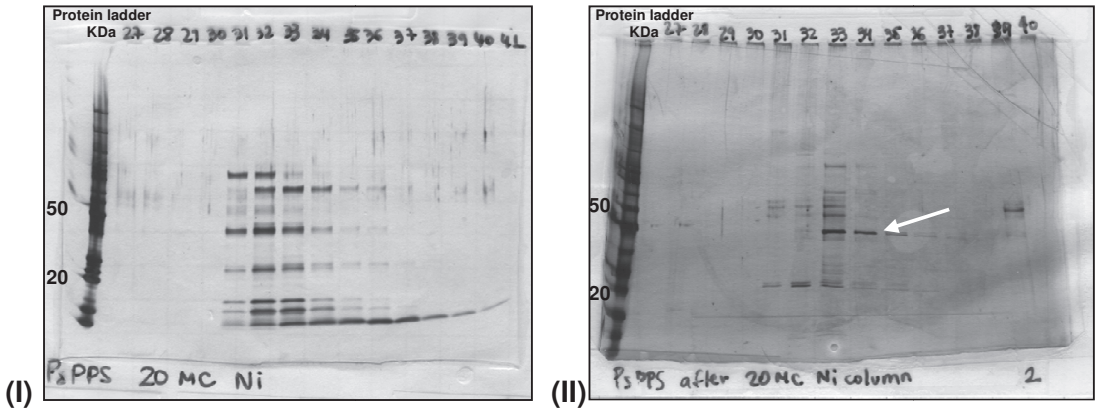


Figura 52. Géis (SDS-PAGE) das frações do extrato proteico das colônias **C** e **D** de *E. coli* modificadas contendo o gene propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS). **(I)**: frações oriundas do primeiro fracionamento cromatográfico; **(II)**: frações oriundas do segundo fracionamento cromatográfico, ambos em coluna de afinidade de níquel. A seta branca indica a banda purificada.

4.3.2.2. Reação de conversão enzimática do precursor isoeugenol pela enzima recombinante PsPPS

A fração purificada da enzima foi testada quanto à capacidade de catalizar a formação do isoeugenol a partir do acetato de coniferila. Para a reação, com volume final 200 µL contendo 50mM do tampão MES-KOH (pH 6,5), foram utilizados 5 µg da fração proteica enriquecida, 1mM de acetato de coniferila como precursor e 1mM de NADPH. Após 30 minutos de incubação a 28°C, a reação foi encerrada com a adição de hexano para extração dos produtos. Como controle foram preparadas reações sem a proteína recombinante.

A análise da mistura reacional através de UPLC-UV (utilizando o método 1 - **item 3.1**) e comparação com padrões, permitiu identificar o isoeugenol como o produto da conversão enzimática (Figuras 53-57).

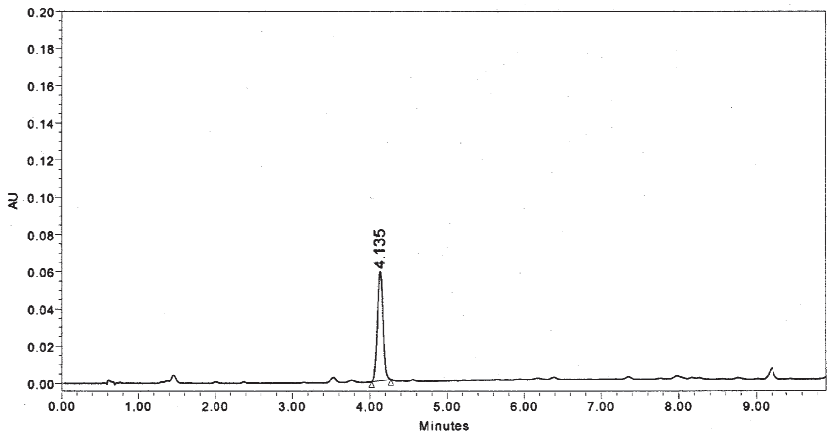


Figura 53. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do substrato acetato de coniferila, utilizando o método 1 (**item 3.1**).

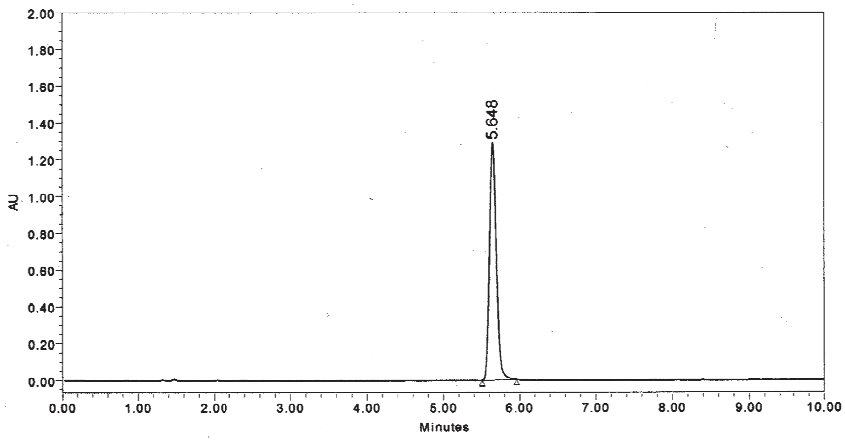


Figura 54. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do padrão eugenol, utilizando o método 1 (**item 3.1**).

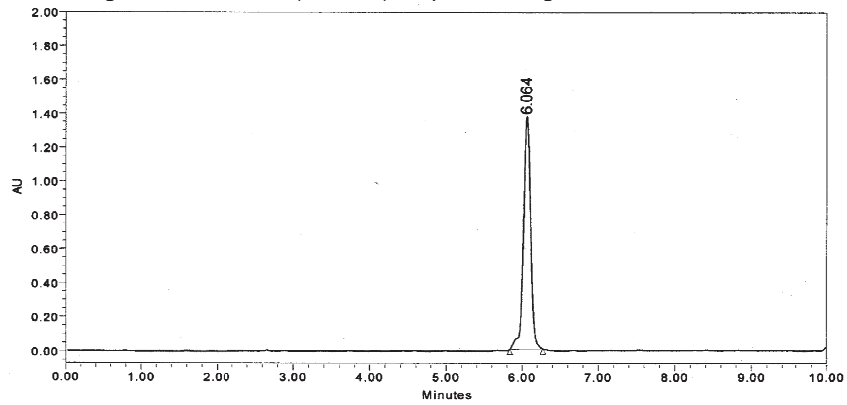


Figura 55. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do padrão isoeugenol, utilizando o método 1 (**item 3.1**).

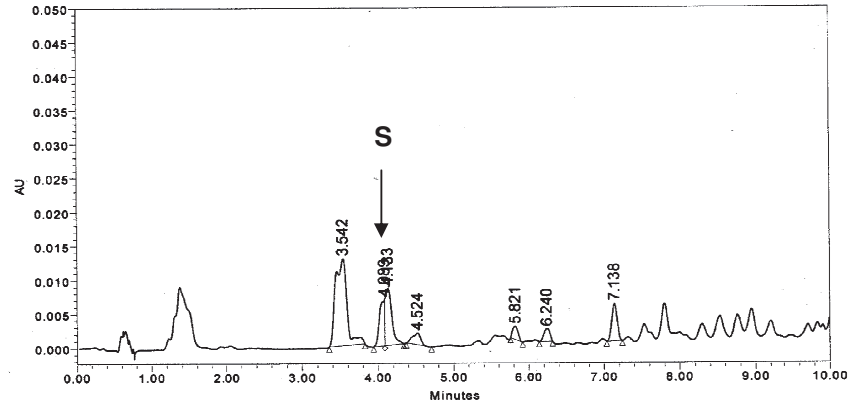


Figura 56. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) da reação controle, na ausência de rPsPPS, utilizando o método 1 (**item 3.1**). **S**: substrato (acetato de coniferila).

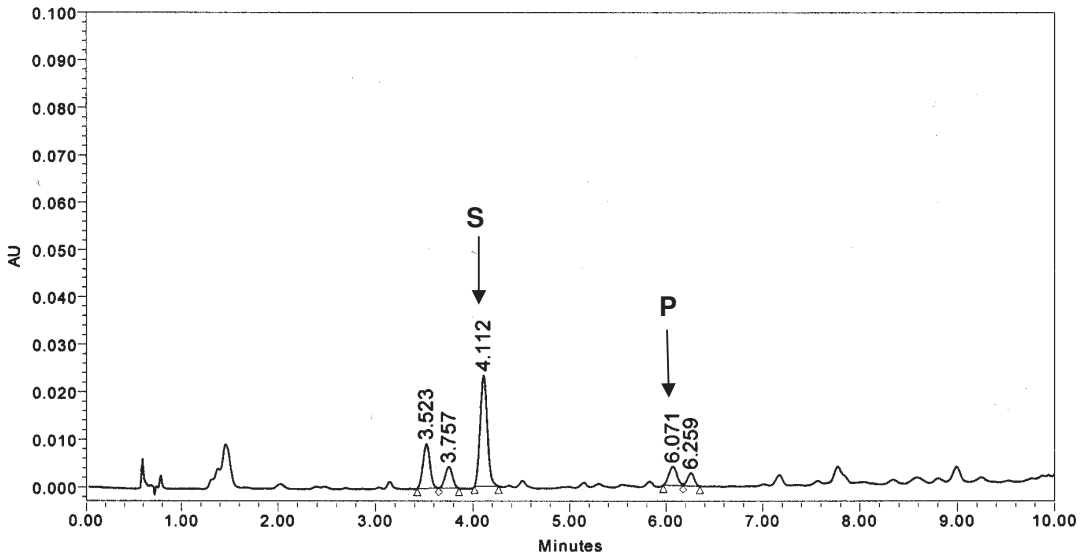


Figura 57. Cromatograma UPLC-UV (280nm) obtido da conversão enzimática do acetato de coniferila em isoeugenol, mediada pela enzima rPsPPS, utilizando o método 1 (**item 3.1**). **S**: substrato da reação (acetato de coniferila). **P**: produto da conversão (isoeugenol).

As enzimas PPS são específicas em relação à formação do produto gerado após a redução. Foi demonstrado que o ataque nucleofílico do hidreto, fornecido pelo NADPH, ocorre especificamente na posição C-9 para formar o isoeugenol (Koeduka et al., 2009a; Koeduka et al., 2009b; Koeduka et al., 2008; Koeduka et al., 2006; Vassão et al., 2006). O resultado do ensaio enzimático com a rPsPPS recombinante utilizando o acetato de coniferila como substrato levou à formação do isoeugenol (Figuras 57 e 58), indicando que a enzima rPsPPS atua como uma propenilfenol sintase.

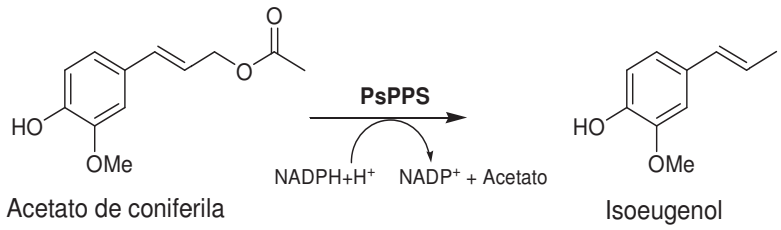


Figura 58. Proposta da conversão enzimática mediada pela enzima propenilfenol sintase de *P. solmsianum* (PsPPS).

4.3.3. Proteína dirigente em *P. solmsianum* (PsPD)

A primeira informação de proteína dirigente em *P. solmsianum* foi obtida da amplificação de um fragmento de 300 pb utilizando-se iniciadores degenerados. Essa região apresentou BlastX correpondente à proteína dirigente, com 80% de identidade com a (+)-*pinoresinol-forming dirigent protein* de *Schisandra chinensis* (nº acesso ADR30610) e 78% com proteína dirigente de *Forsythia intermedia* (AAF25358) (Figura 59).

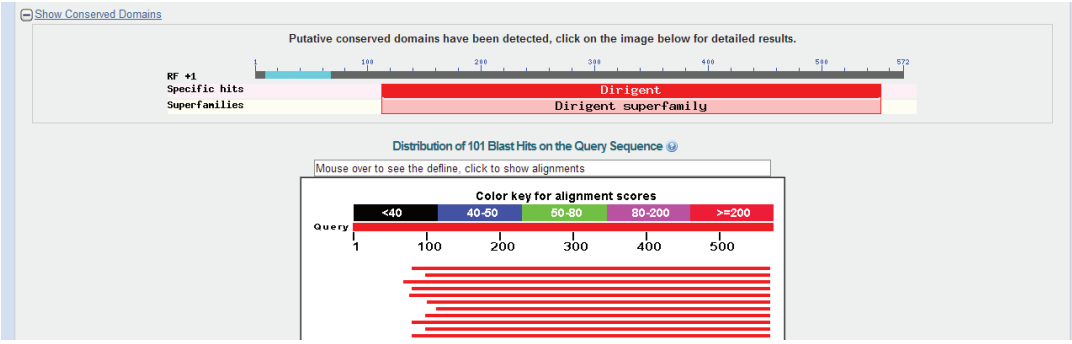


Figura 59. Resultado da busca BlastX no site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para sequência do gene de proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD). Data de acesso: 26/06/2013

Para obtenção do gene completo de proteína dirigente, foi utilizado a técnica RACE. Os primers internos foram desenhados a partir da sequência de 300 pb anteriormente obtida com iniciadores degenerados.

Posteriormente, o gene completo foi clonado no vetor pCR-4 e sequenciado para confirmação. O alinhamento da sequência completa de aminoácidos de PsPD (Figuras 60 e 61) apresentou 70% de similaridade com a proteína dirigente obtida de *Forsythia intermedia* (AF210061) e 70% de similaridade com a PD de *Schisandra chinensis* (HQ428029), indicando que a PsPD pertencente à classe das proteínas dirigentes.

```
BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07) Restriction Mapping Utility
(c)1998,  Tom Hall

23Nidia-NY-23 Restriction Map
4/19/2012 11:40:37 AM
570 base pairs
Translations:  1


Restriction Enzyme Map:

         M  E  I  S  S  S  K  V  H  L  V  S  F  F  L  L  L  L  I  L  G  S  S  A  K  P  L
1       ATGGAAATTAGTAGCAGCAAAGTTCATCTGGTTTCCTTCTTCCTGCTCCTCCTCATCCTTGGCTCCTCTGCCAAGCCCCT   80
1       TACCTTTAATCATCGTCGTTTCAAGTAGACCAAAGGAAGAAGGACGAGGAGGAGTAGGAACCGAGGAGACGGTTCGGGGA   80

         E  K  T  S  I  T  K  P  C  K  H  L  V  L  F  F  H  D  I  V  F  N  G  A  N  A
81      AGAGAAGACGAGCATCACCAAACCATGCAAACATTTGGTGCTGTTCTTTCATGACATTGTCTTCAACGGCGCCAATGCAA   160
81      TCTCTTCTGCTCGTAGTGGTTTGGTACGTTTGTAAACCACGACAAGAAAGTACTGTAACAGAAGTTGCCGCGGTTACGTT   160

        K  N  A  T  S  A  I  V  G  A  P  Q  W  G  N  L  T  I  L  A  G  Q  S  H  F  G  N
161     AGAACGCAACGTCGGCCATAGTGGGAGCACCGCAATGGGGCAACCTGACCATCTTGGCCGGCCAGAGCCACTTCGGCAAC   240
161     TCTTGCGTTGCAGCCGGTATCACCCTCGTGGCGTTACCCCGTTGGACTGGTAGAACCGGCCGGTCTCGGTGAAGCCGTTG   240

         I  V  I  F  D  D  P  I  T  L  D  N  N  L  H  S  P  P  V  G  R  A  Q  G  F  Y  I
241     ATTGTGATTTTCGACGACCCGATCACCCTCGACAACAACCTGCACTCGCCGCCGGTGGGAAGGGCTCAAGGGTTCTACAT   320
241     TAACACTAAAAGCTGCTGGGCTAGTGGGAGCTGTTGTTGGACGTGAGCGGCGGCCACCCTTCCCGAGTTCCCAAGATGTA   320

         Y  D  R  K  D  E  Y  T  A  W  L  G  F  S  F  V  L  N  S  T  D  Y  E  G  T  I
321     CTATGACAGGAAAGATGAGTACACTGCATGGCTCGGGTTCTCGTTTGTGCTTAATTCGACGGACTACGAAGGCACCATCA   400
321     GATACTGTCCTTTCTACTCATGTGACGTACCGAGCCCAAGAGCAAACACGAATTAAGCTGCCTGATGCTTCCGTGGTAGT   400

        N  F  A  G  A  D  P  L  M  H  K  T  R  D  V  S  I  I  G  G  T  G  D  F  F  M  T
401     ACTTCGCCGGCGCCGACCCGTTGATGCACAAGACGAGGGACGTCTCGATCATTGGTGGCACCGGCGACTTCTTCATGACG   480
401     TGAAGCGGCCGCGGCTGGGCAACTACGTGTTCTGCTCCCTGCAGAGCTAGTAACCACCGTGGCCGCTGAAGAAGTACTGC   480

         R  G  I  A  T  I  S  T  D  A  Y  E  G  E  V  Y  F  R  L  K  V  D  I  K  L  Y  E
481     AGGGGGATCGCCACCATTAGTACCGATGCTTATGAAGGAGAGGTTTACTTTCGACTCAAAGTTGATATCAAGCTATATGA   560
481     TCCCCCTAGCGGTGGTAATCATGGCTACGAATACTTCCTCTCCAAATGAAAGCTGAGTTTCAACTATAGTTCGATATACT   560

         C  Y  *
561     GTGTTATTAA   570
561     CACAATAATT   570
```

Figura 60. Sequência completa do cDNA que codifica a proteína dirigente de *P. solmsianum*.

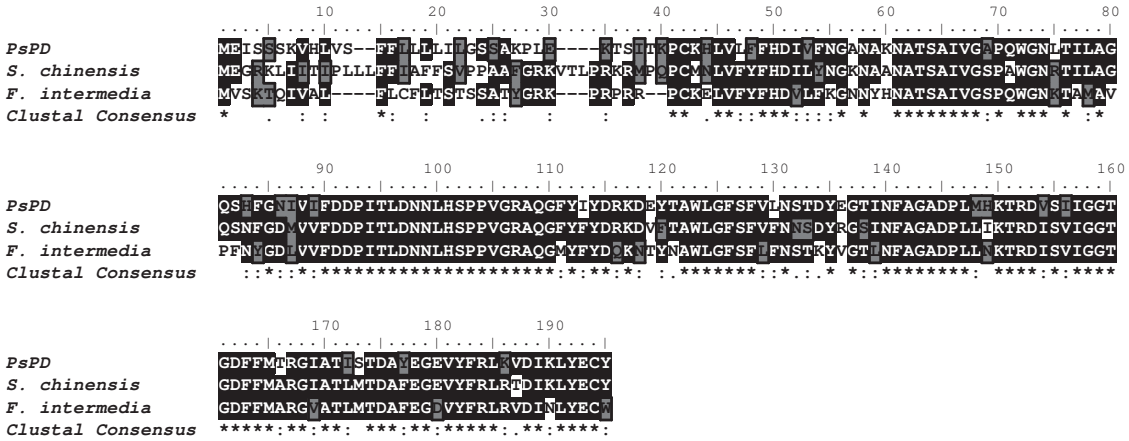


Figura 61. Alinhamento da sequência de aminoácidos de proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD) com as proteínas dirigentes obtidas de *Forsythia intermedia* (AF210061, 70% de similaridade) e de *Schizandra chinensis* (HQ428029, 70% de similaridade). As regiões de consenso estão marcadas com asterisco (alinhamento clustalW).

Após a obtenção e confirmação da informação referente ao gene completo que codifica a proteína dirigente em *P. solmsianum*, a sequência deste gene foi inserida no vetor pART17, indicado para a clonagem em células de plantas (Gleave, 1992), o gene PsPD foi inserido em células de tomate (*L. peruvianum*) através de biobalística, para obtenção da proteína recombinante rPsPD.

4.3.3.1. Análise da expressão do gene PsPD e seleção dos calos pós-bombardeamento

Após o bombardeamento, as células contendo o gene PsPD foram cultivadas em meio LP seletivo contendo canamicina 75 µg.mL^{-1}. Ao final de 3 semanas, os calos que se sobressaíram da placa seletiva foram extraídos para obtenção de RNA total, em seguida foram sintetizados os cDNA's e analisados por PCR qualitativa objetivando a seleção dos calos com maior nível de expressão da proteína.

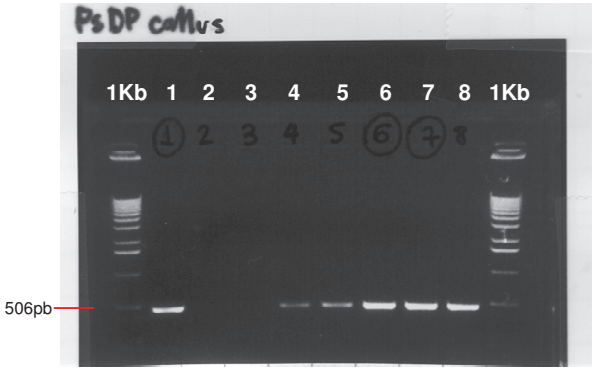


Figura 62. PCR qualitativa da expressão do gene de proteína dirigente de *P. solmsianum* (PsPD) nos calos bombardeados.

Os calos 1, 6 e 7, cujos perfis de expressão de rPsPD apresentaram-se mais intensos, foram selecionados para o *scale-up* da cultura em meio LP líquido (Figura 62). A amplificação do gene também é um indicativo da correta inserção do fragmento no plasmídeo e nas células. Os amplicons foram extraídos do gel, e enviados para sequenciamento, confirmando serem o gene PsPD.

Foi realizado o *scale-up* da cultura do calo PsPD#1 para 6L. Após vários passos de extração, o extrato proteico foi submetido aos processos de purificação.

4.3.3.2. Purificação da proteína recombinante PsPD

A proteína recombinante foi purificada através de métodos cromatográficos. Observou-se no gel de poliacrilamida (Figura 63), que o monômero resultante do processo de desnaturação corresponde a aproximadamente 20kDa, o esperado para a proteína PsDP, cuja massa molecular teórica é de 20925,91 Da.

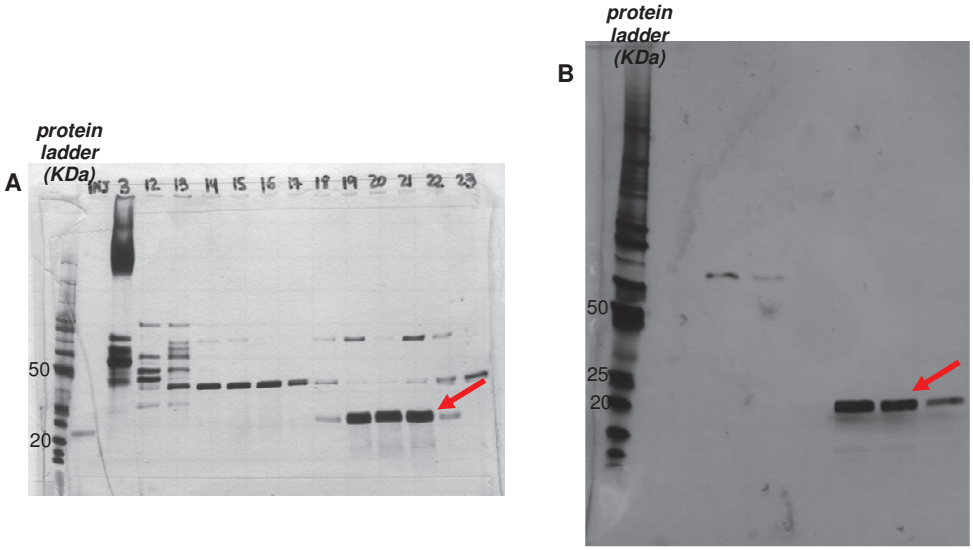


Figura 63. Gel (SDS-PAGE) das frações purificadas da proteína rPsPD. **A:** Frações provenientes da coluna Mono-S. **B:** Frações provenientes da coluna Superdex-75. As setas indicam bandas de proteínas com tamanho equivalente ao esperado para a proteína rPsPD.

Para o teste preliminar de atividade da proteína purificada, foi utilizado o ensaio anteriormente estabelecido para a conversão do álcool coniferílico em pinoresinol (Davin et al., 1997; Kim et al., 2012). A reação de conversão enzimática foi preparada utilizando-se 200 µg de rPsPD, lacase isolada de *Trametes versicolor* como agente oxidante, 720 µM de álcool coniferílico como substrato, em tampão MES 40mM (pH 5,0) e em uma reação com volume final de 250 µL. Após a incubação por 4 horas a 28°C, a reação foi extraída com acetato de etila (500 µl × 2), as frações orgânicas foram secas a vácuo, resuspensas em MeOH:H_2O (1:1 v/v) e analisadas por UPLC-UV utilizando o método 2 (**item 3.1**) (Figuras 64-66). No cromatograma obtido por UPLC-UV foi possível observar um aumento relativo na formação da lignana pinoresinol, quando comparado com a reação sem a adição da rPsPD (Figura 66, Tabela 14).

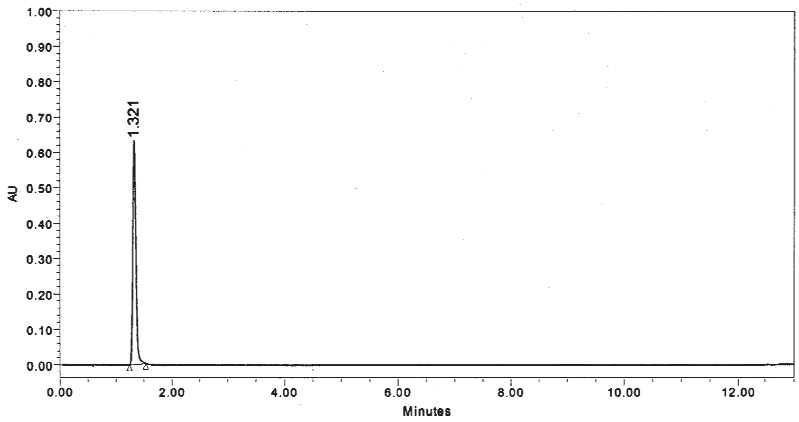


Figura 64. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) do substrato álcool coniferílico, utiilizando o método 2 (**item 3.1**).

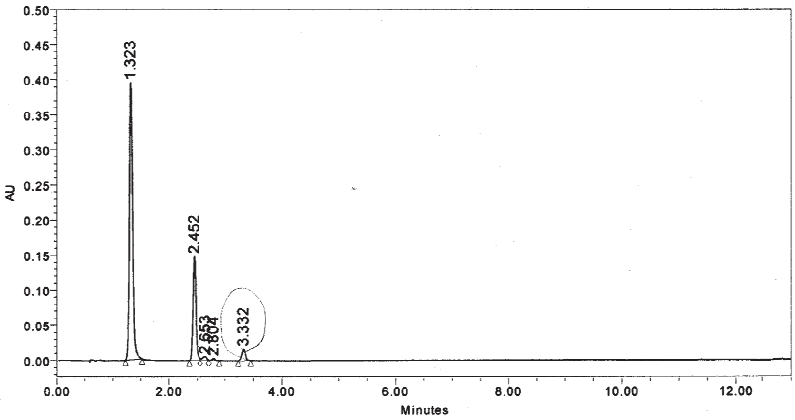


Figura 65. Cromatograma UPLC-UV (280 nm) da reação controle, na ausência de rPsPD utiilizando o método 2 (**item 3.1**).

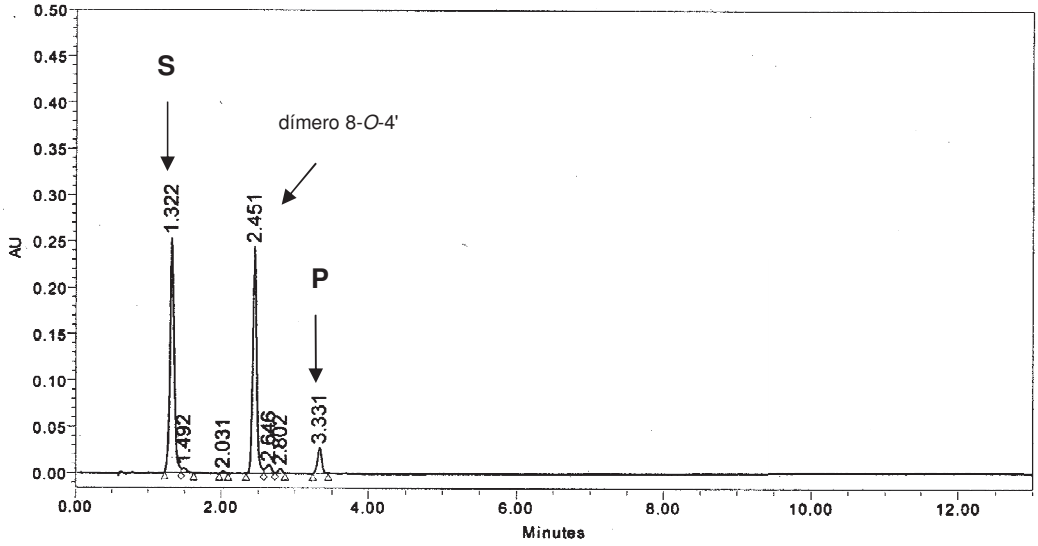


Figura 66. Cromatograma UPLC-UV (280nm) da conversão enzimática do álcool coniferílico em pinoresinol, mediada pela enzima rPsPD utiilizando o método 2 (**item 3.1**). **S**: substrato da reação (álcool coniferílico). **P**: produto da conversão (pinoresinol).

Tabela 14. Áreas dos picos obtidos na análise por UPLC-UV (280 nm) da reação de conversão álcool coniferílico em pinoresinol na presença de rPsPD.

	Substância	Pico (t_r, min)	% relativa das áreas
Reação	Álcool coniferílico	1,323	69,67
controle	Produto 8-*O*-4'	2,452	25,25
(sem rPsPD)	Pinoresinol	3,332	3,06
Conversão	Álcool coniferílico	1,322	47,29
enzimática	Produto 8-*O*-4'	2,451	42,91
com rPsPD	Pinoresinol	3,331	5,32

t_r: tempo de retenção no cromatograma obtido por UPLC-UV.

As proteínas dirigentes são responsáveis pela estereosseletividade do acoplamento dos monolignóis para formar lignanas. Neste sentido, as PD atuam na orientação da aproximação dos monolignóis e também na regiosseletividade do acoplamento. O acoplamento randômico que ocorre nas reações *in vitro* leva ao produto 8-*O*-4', cuja formação é favorecida dada a estabilidade do radical formado em OH-4, e aos produtos 8-8' e 8-5' (Gang et al., 1999). Por esta razão, o incremento do pico referente ao produto 8-8' (pinoresinol) é um indicativo da

atividade regiosseletiva do acoplamento na presença da rPsPD (Tabela 14). Embora a caracterização bioquímica e confirmação da atividade enzimática ainda careçam de análises detalhadas, estes resultados preliminares, juntamente com as dados sobre a sequência completa do gene, apontam as primeiras informações acerca das proteínas dirigentes em *P. solmsianum*.

4.3.4. Análise das relações filogenéticas baseadas na região do gene de proteína dirigente em espécies de *Piper*

Com base nas informações obtidas de *P. solmsianum*, foram utilizados primers degenerados para a busca de sequências de proteína dirigente em outras espécies de *Piper* objetivando uma análise global. Foram amplificadas sequências de 9 espécies de *Piper*, todas apresentando BlastX para proteína dirigente. Observa-se a presença de regiões bastante conservadas entre as seqüências de *Piper.* Em uma busca *nucleotide blast* no banco de dados NCBI por seqüências similares àquelas obtidas de *Piper*, foram encontradas 103 sequências com valores entre 67 à 75% de identidade (data de acesso: 10/06/2010). Dentre estas, foram escolhidas 15 seqüências de proteínas dirigentes para uma análise filogenética entre diferentes gêneros e espécies na tentativa de identificar os grupos de genes de proteínas dirigentes (Figura 69). As espécies analisadas foram: *Picea sitchensis* (DQ395255), *Picea engelmannii* (DQ395245), *Tsuga heterophylla* (AF210071), *Picea glauca* (DQ395258), *Thuja plicata* (AF210068), *Medicago truncatula* (BT051492), *Quercus suber* (DQ023705), *Sesamum indicum* (AY560651), *Forsythia intermedia* (AF210061), *Zea mays* (EU9607278), *Ricinum communis* (XM002509845), *Populus tricocarpa* (XM002297961), *Vitis vinifera* (XM002272108), *Glycine max* (BT091639) e *Fraxinus mandishurica* (AF210074).

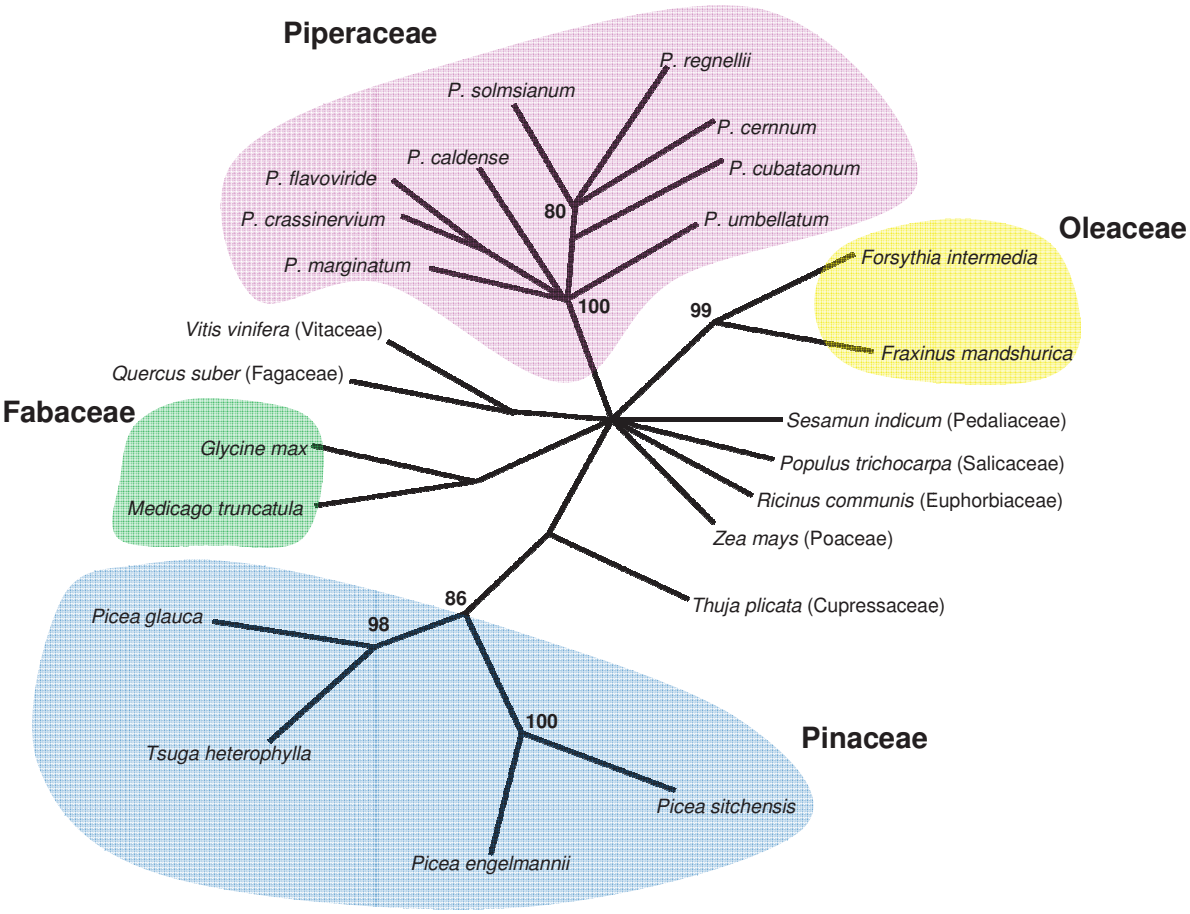


Figura 67. Árvore filogenética baseada em dados de seqüências de nucleotídeos do gene de proteína dirigente. Dígitos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*: 1000; comprimento da árvore = 574 passos; índice de consistência (CI) = 0,533; índice de homoplasia (HI) = 0,499; índice de retenção (RI) = 0,620 algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 135; 114 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas=603. Destacam-se em cores as famílias as quais pertencem os táxons analisados.

Na análise da relação evolutiva entre as plantas que apresentaram genes de proteínas dirigentes (Figura 67), observa-se um clado monofilético consistente e com altos valores de *bootstrap* (100%) para as espécies de *Piper*, resultado do alto grau de conservação da região que codifica tais proteínas. O clado das espécies da família Pinaceae constitui um grupo monofilético com as espécies de *Picea* e *Tsuga*. A observação de outros grupos monofiléticos cujos representantes pertencem à

mesma família é sugestivo de uma história evolutiva em que estas espécies compartilham um ancestral comum que pode ter fornecido uma proteína modelo a partir da qual se desenvolveram as proteínas dirigentes encontradas atualmente nestes indivíduos. Este modelo de evolução do metabolismo secundário concorda com o estudo realizado por Ralph e colaboradores (2007) (Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007), onde foram propostas grupos de proteínas dirigentes de acordo com as determinadas famílias de plantas.

Sob o aspecto evolutivo, vale ressaltar que a via fenilpropanoidica é amplamente expressa nas plantas, sendo que um dos produtos mais importantes é a lignina, responsável pela rigidez de plantas vasculares, um polímero resultante do acoplamento oxidativo de unidades C_6-C_3 com suposta participação direta das proteínas dirigentes (Burlat et al., 2001; Gang et al., 1999; Lewis, 1998), embora este ainda seja um tema em discussão. O desenvolvimento deste metabolismo constitui-se na base do processo de evolução de espécies arbóreas, sejam elas Gimnospermae ou Angiospermae (Gottlieb et al., 1995; Kenrick and Crane, 1997).

Os genes envolvidos na biossíntese são interessantes candidatos para o estudo da evolução, porque eles existem em grande diversidade, evoluem rapidamente através de rearranjos, duplicação, perdas, transferência horizontal e, comumente, têm fenótipos concretos e mensuráveis (*e.g.*, metabólitos secundários).

4.3.5. Análise comparativa entre o perfil metabólico e o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas *P. solmsianum*

De posse do conhecimento do perfil químico de *P. solmsianum*, somado às informações de genes relacionados ao metabolismo fenilpropanoídico, foi realizado o estudo comparativo entre o perfil metabólico e o perfil de expressão destes genes em *P. solmsianum*.

O perfil químico de *P. solmsianum* foi obtido por UPLC, comparando-se folhas em diferentes estágios de desenvolvimento (folhas jovens e maduras) e diferentes tecidos da planta (folhas, raízes e caules). Para a análise, foram selecionados dois espécimens (indivíduos 1 e 2) de *P. solmsianum* (K-1368). A lignana pinoresinol foi utilizada como padrão interno para quantificação relativa dos metabólitos. Os metabólitos majoritários em cada planta foram previamente isolados, identificados e analisados por UPLC (Figura 68). Cada valor demonstrado nos gráficos foi gerado por uma média das três replicatas coletadas de cada indivíduo e de três análises independentes.

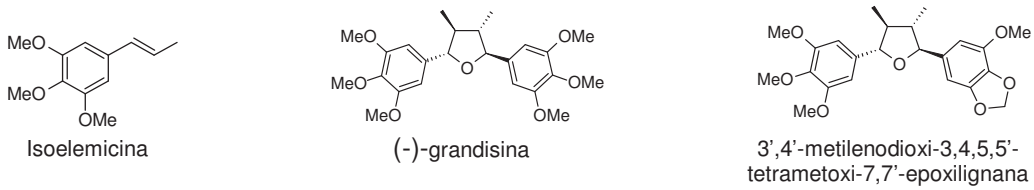


Figura 68. Metabólitos secundários acumulados por *P. solmsianum*.

A expressão dos genes PsPPS e PsPD envolvidos na biossíntese de lignanas foi analisada semi-quantitativamente por PCR (qPCR), nas folhas das plantas adultas de *P. solmsianum* em diferentes estágios de desenvolvimento (folhas jovens e maduras) e em diferentes tecidos (folhas, raízes e caules), que correspondende ao mesmo material utilizado da análise química. As análises foram realizadas em triplicatas para cada tecido coletado e em triplicatas para cada reação de PCR. O gene 18S foi utilizado como controle endógeno para a quantificação.

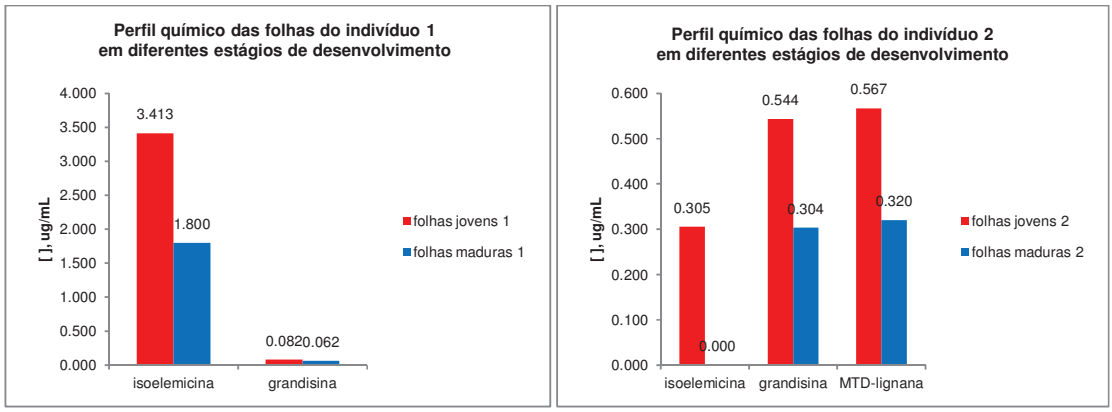


Figura 69. Comparação do perfil químico de folhas jovens e maduras dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum*.

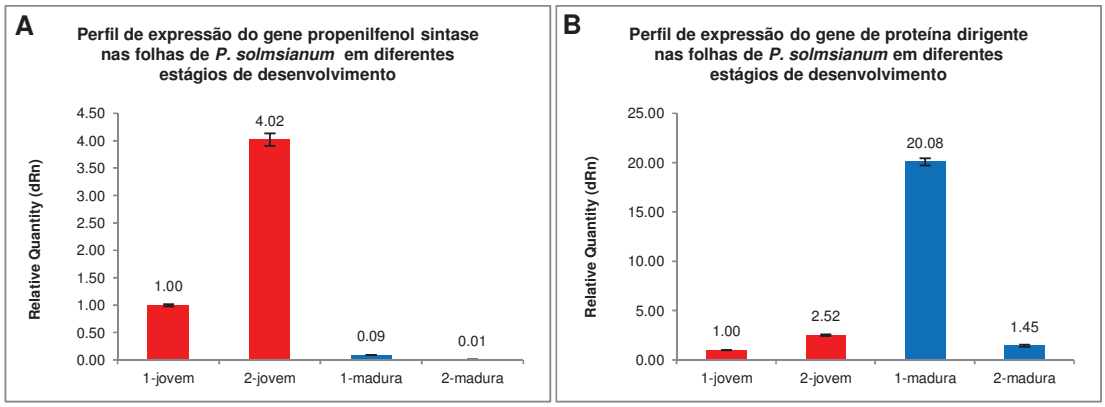


Figura 70. Comparação entre o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas em folhas com diferentes estágios de desenvolvimento dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum.* **A:** propenilfenol sintase. **B:** proteína dirigente.

Embora as plantas tenham sido coletadas, extraídas e tratadas da mesma maneira e ainda que estivessem sob as mesmas condições de cultivo, chamou a atenção a diferença entre os perfis químicos dos indivíduos. No entanto, esta variabilidade é esperada e se encaixa nos modelos de variabilidade intra-populacional previamente observada. O indivíduo 1 acumula a isoelemicina como produto majoritário, enquanto que o indivíduo 2 acumula preferencialmente lignanas, sendo que nas folhas maduras de 2 não foi detectada a presença da isoelemicina (Figura 69 e 70).

A diferença entre os perfis metabólicos de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento já havia sido observado de forma preliminar em espécies de *Piper*

(Yamaguchi et al., 2011). Em *P. solmsianum*, foi demonstrado que as plântulas de até nove meses de idade acumulam fenilpropanoides e, apenas a partir deste período, passam a acumular lignanas (Martins, 2002). Fato similar pode ser observado quando se compara o perfil químico folhas jovens e maduras nos indivíduos 1 e 2, pois o acúmulo de fenilpropanoides é muito maior nas folhas jovens do que nas maduras. O perfil de expressão do gene PPS também segue o mesmo padrão, sendo a maior expressão observada para as folhas jovens em ambos indivíduos.

No caso das PsPD, o maior valor de expressão foi encontrado paras as folhas maduras do indivíduo 1 e jovens do indivíduo 2. No entanto, a concentração relativa de lignanas no indivíduo 1 é muito reduzida, quando comparada com a observada para a isoelemicina em ambos os tecidos. No indivíduo 2 entretanto, a concentração de lignanas é consideravelmente maior, sobretudo nas folhas jovens, seguindo o mesmo padrão observado para a expressão do gene DP.

O perfil de expressão dos genes nas folhas em diferentes estágios de desenvolvimento varia entre os indivíduos 1 e 2. Observa-se uma expressão do gene de PD 8 vezes maior nas folhas maduras do individuo 1 quando comparado com os demais. Em relação ao gene PPS, foi observado elevados valores de expressão nas folhas jovens de ambos os indivíduos, sendo que a expressão do gene nas folhas jovens do indivíduo 2 foi de ate 4 vezes maior quando comparada com o mesmo estágio de desenvolvimento no indivíduo 1 (Figuras 69 e 70).

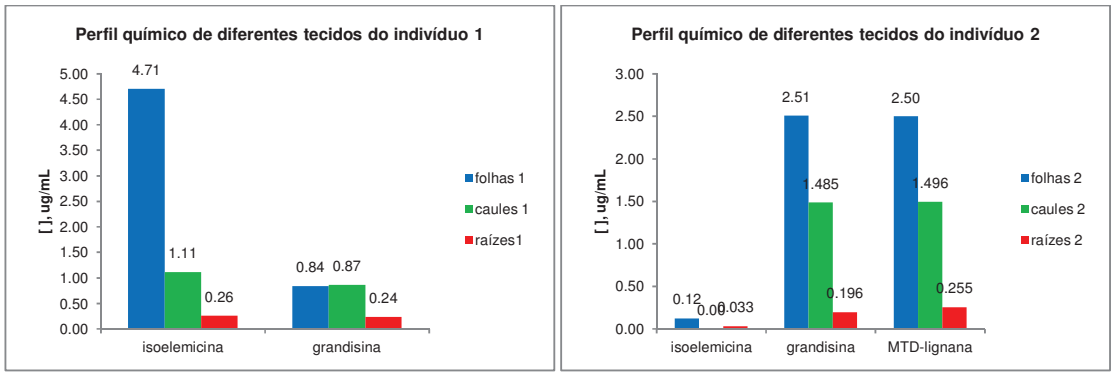


Figura 71. Comparação do perfil químico em diferentes tecidos dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum*.

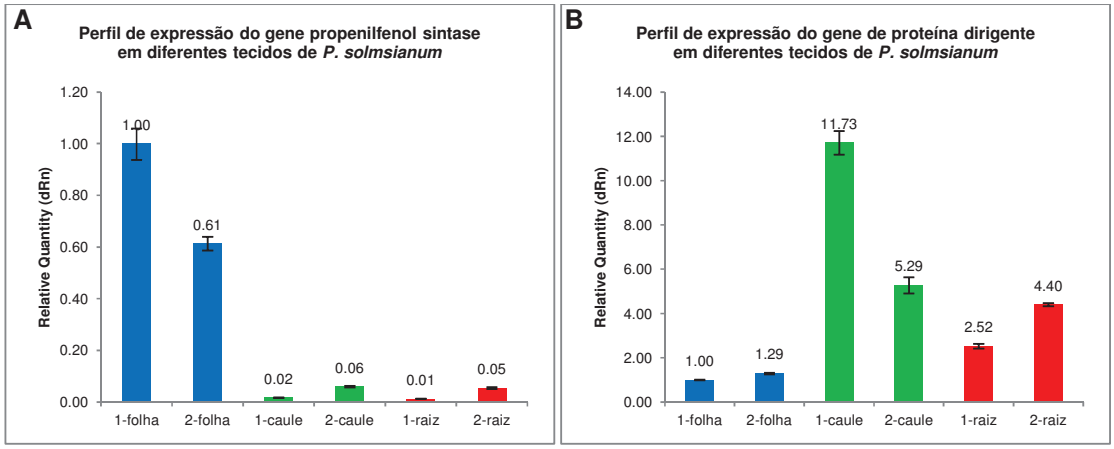


Figura 72. Comparação entre o perfil de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de lignanas em diferentes tecidos dos indivíduos 1 e 2 de *P. solmsianum*. **A:** propenilfenol sintase e **B:** proteína dirigente.

Em relação aos diferentes tecidos, as folhas aparecem como locais de maior acúmulo dos metabólitos analisados. Quanto ao individuo 1, novamente foi observado um acúmulo acentuado do fenilpropanoide nas folhas e caules. O individuo 2 acumula preferencialmente lignanas, sendo as folhas o tecido de maior quantidade deste metabólito (Figuras 71 e 72).

No perfil de expressão do gene de proteína dirigente em diferentes tecidos, nota-se que este foi mais expresso nos caules. Esta observação condiz com os resultados apresentados por Ralph e colaboradores no estudo de expressão de PD em espécies de *Picea* (Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007). Considerando que o

caule representa o local de maior atividade da via biossintética fenilpropanoidica, devido o recrutamento de monolignóis para a produção da lignina, é plausível que o recrutamento desta via também possa levar a formação das lignanas, o que explicaria a maior expressão do gene de PD neste tecido. Este resultado é congruente com o encontrado no perfil químico, em que um elevado acúmulo das lignanas ocorre nos caules em ambos indivíduos analisados. Em um estudo similar foi observado que para *F. intermedia* onde os níveis de expressão da PD que leva ao (+)-pinoresinol apresentou um intenso sinal de expressão nos caules quando comparado com folhas e raízes (Vassão et al., 2010). Na espécie *Thuja plicata*, o local de maior expressão de algumas isoformas de PD foram as raízes e, curiosamente, as flores (Kim et al., 2002). Em relação ao gene PPS, foi observada uma expressão muito mais acentuada nas folhas do que nos outros tecidos (Figura 72), o que está de acordo com o perfil químico das folhas do indivíduo 1, que acumula o fenilpropanoide como produto majoritário nas folhas. Para membros da mesma família de enzimas foram observados elevados níveis de expressão nas flores de *P. hybrida*. Uma vez que a estes órgãos emitem grandes quantidades de isoeugenol, a expressão do gene IGS, que está diretamente relacionado à síntese de compostos voláteis, também foi bastante expresso nestes tecidos (Dexter et al., 2007).

Os resultados desta análise comparativa apresentaram uma correlação entre os perfis químicos e de expressão dos genes relacionados à biossíntese de fenilpropanoides em *P. solmsianum*.

5. CONCLUSÕES

A análise filogenética baseada em sequências de ITS e reconstrução dos caracteres químicos indicaram a proximidade filogenética das espécies de *Piper* que produzem classes específicas de metabólitos secundários, demonstrando que são um caracter importante no estabelecimento da relação natural entre estas espécies. O resultado destas análises combinadas indicou que o gênero *Piper* pode ser utilizado como modelo para estudar a evolução de metabolismo secundário, uma vez que a distribuição dos metabólitos secundários é estruturada nos clados, como em Macrostachys e Schilleria, e pode servir para direcionar futuros estudos de bioprospecção.

A análise por PCA demonstrou a discriminação das espécies de *Piper* de acordo com os seus perfis químicos de RMN de ^{1}H. Entretanto, o uso do PCA mostrou-se mais adequado para a análise de grupos de espécies, como Macrostachys e Schilleria, ou de variação dentro de populações, como observado para os espécimens de *P. solmsianum*.

Foi evidenciado o potencial da análise do perfil químico em conjunto com a análise genética por microssatélites para distinguir as espécimens morfologicamente similares de *P. solmsianum*, uma vez que os dados foram congruentes em relação aos grupos formados de acordo com as populacões amostradas em diferentes locais de coleta.

A busca por genes do metabolismo fenilpropanoídico em *P. solmsianum* conduziu às primeiras informações sobre a presença e a transcrição de acetiltransferase, propenilfenol sintase e proteína dirigente em *P. solmsianum*, e a

análise do perfil químico e de expressão demonstrou correlação entre os metabólitos secundários acumulados e a expressão dos genes relacionados à sua biossíntese.

A análise filogenética juntamente com sequências similares obtidas nos bancos de dados permitiu inferir que as proteínas dirigentes que ocorrem em *Piper* são diferenciadas das descritas para outras famílias, indicando serem fruto de um processo evolutivo em que um ancestral comum às espécies de *Piper* forneceu uma proteína modelo a partir da qual as proteínas dirigentes atuais se desenvolveram e se diferenciaram das demais.

A análise conjunta dos dados químicos e moleculares das espécies de *Piper* forneceu um panorama geral da distribuição dos metabólitos secundários acumulados por estas espécies. Com base neste estudo foi possível a seleção de espécies que produzem e acumulam preferencialmente lignóides para o estudo de variabilidade química e genética e para a investigação de aspectos da biossíntese destes metabólitos, o que permitiu apontar alguns dos fatores que contribuem para a diversidade estrutural dos metabólitos em espécimens de *P. solmsianum*.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu A.M., Sevegnani L., Machicado A.R., Zimermann D., Rebelo R.A. (2002) *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil - a new source of safrole. Journal of Essential Oil Research 14(5):361-363.

Achenbach H., Fietz W., Worth J., Waibel R., Portecop J. (1986) Constituents of tropical medicinal plants, IXX1 GC/MS-Investigations of the constituents of *Piper amalago* - 30 New amides of the piperine-type. Planta Med 52:12-18.

Ahmad F., Poongavanam N., Arbain D., Taher M. (2000) A phenolic compound from the leaves of *Piper mollissimum*. ACGC Chemical Research Communications 12:21-24.

Alcântara G.B., Honda N.K., Ferreira A.G., Ferreira M.M.C. (2007) Chemometric analysis applied in ^{1}H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. Analytica Chimica Acta 595:3.

Alécio A.C., Bolzani V.d.S., Young M.C.M., Kato M.J., Furlan M. (1998) Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. Journal of Natural Products 61:637-639.

Amaral J.H.d. (2008) Variações circadianas, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum*, Instituto de Química - USP, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ampofo S.A., Roussis V., Wiemer D.F. (1987) New prenylated phenolics from *Piper auritum*. Phytochemistry 26:2367-2370.

Arif T., Bhosale J.D., Kumar N., Mandal T.K., Bendre R.S., Lavekar G.S., Dabur R. (2009) Natural products - antifungal agents derived from plants. Journal of Asian Natural Products Research 11:621-638.

Atal C.K., Girotra R.N., Dhar K.L. (1966) Occurrence of sesamin in *Piper longum* Linn. Indian Journal of Chemistry 4:252.

Avella E., Diaz P.P., Diaz A.M.P. (1994) Constituents from *Piper divaricatum*. *Planta Medica* 60:195.

Baldoqui D.C., Kato M.J., Cavalheiro A.J., Bolzani V.D., Young M.C.M., Furlan M. (1999) A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. Phytochemistry 51:899-902.

Banerji A., Sarkar M., Datta R., Sengupta P., Abraham K. (2002) Amides from *Piper brachystachyum* and *Piper retrofractum*. Phytochemistry 59:897-901.

Batista J.M., Lopes A.A., Ambrosio D.L., Regasini L.O., Kato M.J., Bolzani V.D., Cicarelli R.M.B., Furlan M. (2008) Natural chromens and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. Biological & Pharmaceutical Bulletin 31:538-540.

Benevides P.J.C., Sartorelli P., Kato M.J. (1999) Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. Phytochemistry 52:339-343.

Bennici A. (2008) Origin and early evolution of land plants. Communicative & Integrative Biology 1:212.

Bezerra D.P., Pessoa C., Moraes M.O.d., Alencar N.M.N.d., Mesquita R.O., Lima M.W., Alves A.P.N.N., Pessoa O.D.L., Chaves J.H., Silveira E.R., Costa-Lotufo L.V. (2008a) In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. Journal of Applied Toxicology 28:599-607.

Bezerra D.P., Moura D.J., Rosa R.M., de Vasconcellos M.C., Silva A., de Moraes M.O., Silveira E.R., Lima M.A.S., Henriques J.A.P., Costa-Lotufo L.V., Saffi J. (2008b) Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 652:164-174.

Bezerra D.P., de Castro F.O., Alves A., Pessoa C., de Moraes M.O., Silveira E.R., Lima M.A.S., Elmiro F.J.M., de Alencar N.M.N., Mesquita R.O., Lima M.W., Costa-Lotufo L.V. (2008c) In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. Journal of Applied Toxicology 28:156-163.

Bhatia A., Bharti S.K., Tewari S.K., Sidhu O.P., Roy R. (2013) Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits using GC–MS and NMR spectroscopy. Phytochemistry 93:105-115.

Boatright J., Negre F., Chen X., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D., Dudareva N. (2004) Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. Plant Physiology 135:1993-2011.

Bodiwala H., Singh G., Singh R., Dey C., Sharma S., Bhutani K., Singh I. (2007) Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. Journal of Natural Medicines 61:418-421.

Bottcher C., von Roepenack-Lahaye E., Schmidt J., Schmotz C., Neumann S., Scheel D., Clemens S. (2008) Metabolome analysis of Biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in arabidopsis. Plant Physiology 147:2107-2120.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161:839-851.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Briggs L.H., Cambie R.C., Couch R.A.F. (1968) Lirioresinol-C dimethyl ether, a diaxially substituted 3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octane lignan from *Macropiper excelsum* (Forst.f.) Miq. Journal of the Chemical Society 24:3042-3045.

Burlat V., Kwon M., Davin L.B., Lewis N.G. (2001) Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. Phytochemistry 57:883-897.

Cabral M.M.O., Alencar J.A., Guimaraes A.E., Kato M.J. (2009) Larvicidal activity of Grandisin against *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association 25:103-105.

Cardozo J., E. L., Oliveira Chaves M.C. (2003) Caldensin, a new natural N-methylaristolactam from *Piper caldense*. Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy) 41:216-218.

Carvalho A.A.V., Galdino P.M., Nascimento M.V.M., Kato M.J., Valadares M.C., Cunha L.C., Costa E.A. (2010) Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. Phytotherapy Research 24:113-118.

Chatterjee S., Niaz Z., Gautam S., Adhikari S., Variyar P.S., Sharma A. (2007) Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica ftagrans*). Food Chemistry 101:515-523.

Chaves M.C.O., Santos B.V.O. (2002) Constituents from *Piper marginatum* fruits. Fitoterapia 73:547-549.

Chaves M.C.O., Oliveira A.H., Santos B.V.O. (2006) Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae). Biochemical Systematics and Ecology 34:75-77.

Choi Y.H., Kim H.K., Hazekamp A., Erkelens C., Lefeber A.W.M., Verpoorte R. (2004) Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ^{1}H NMR spectroscopy and Principal Component Analysis. Journal of Natural Products 67:953-957.

Choi Y.H., Sertic S., Kim H.K., Wilson E.G., Michopoulos F., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Prat Kricun S.D., Verpoorte R. (2005) Classification of *Ilex* species based on

metabolomic fingerprinting using Nuclear Magnetic Resonance and Multivariate Data Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1237-1245.

Cordell G.A., Lemos T.L.G., Monte F.J.Q., de Mattos M.C. (2007) Vegetables as chemical reagents. Journal of Natural Products 70:478-492.

Costa S.S., Mors W.B. (1981) Amides of *Ottonia corcovadensis*. Phytochemistry 20.

Crane P.R., Friis E.M., Pedersen K.R. (1995) The origin and early diversification of angiosperms. Nature 374:27-33.

Crane P.R., Herendeen P., Friis E.M. (2004) Fossils and plant phylogeny. American Journal of Botany 91:1683-1699..

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites) in: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants Wiley, Rockville, MD pp 2150.

Cunningham C.W. (1999) Some limitations of ancestral character-state reconstruction when testing evolutionary hypotheses. Systematic Biology 48(3):665-674.

D'Auria J.C. (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Current Opinion in Plant Biology 9:331-340.

da Silva R.V., Navickiene H.M.D., Kato M.J., Bolzani V.D.S., Meda C.I., Young M.C.M., Furlan M. (2002) Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry 59:521-527.

da Silva R.Z., Yunes R.A., de Souza M.M., Delle Monache F., Cechinel V. (2010) Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). Journal of Natural Medicines 64:402-408.

Dahlgren G. (1989) An updated angiosperm classification. Botanical Journal of the Linnean Society 100:197-203.

Dahlgren R.M.T. (1980) A revised system of classification of the angiosperms. Botanical Journal of the Linnean Society 80(3):91-124.

Danelutte A.P., Costantin M.B., Delgado G.E., Braz R., Kato M.J. (2005) Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. Journal of the Brazilian Chemical Society 16:1425-1430.

Darwin C.R. (1859) On the origin of species by means of natural selection. J. Murray, London.

Davies T.J., Barraclough T.G., Chase M.W., Soltis P.S., Soltis D.E., Savolainen V. (2004) Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:1904-1909.

Davin L.B., Lewis N.G. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiology 123:453-461.

Davin L.B., Bedgar D.L., Katayama T., Lewis N.G. (1992) On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. Phytochemistry 31:3869-3874.

Davin L.B., Wang H.-B., Crowell A.L., Bedgar D.L., Martin D.M., Sarkanen S., Lewis N.G. (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (Dirigent) Protein without an active center. Science 275:362-367.

de Campos M.P., Filho V.C., Silva R.Z., Yunes R.A., Monache F.D., Cruz A.B. (2007) Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper*

solmsianum C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 62:173-178.

de Campos M.P., Cechinel V., da Silva R.Z., Yunes R.A., Zacchino S., Juarez S., Cruz R.C., Cruz A.B. (2005) Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). Biological & Pharmaceutical Bulletin 28:1527-1530.

de Candolle C. (1869) Piperaceae Pp. in: A. P. de Candolle (Ed.), Prodomus systematis naturalis regni vegetabilis, Masson, Paris.

Delgado A., W., Auvella M. E., Diaz A.M.P. (1998) Benzylisoquinoline alkaloids from the stem of *Piper augustum* Rudge. Revista Colombiana de Quimica 27:13-21

Desai S.J., Prabhu B.R., Mulchandani N.B. (1988) Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. Phytochemistry 27:1511-1515.

Desai S.J., Chaturvedi R., Mulchandani N.B. (1990) Piperolactam D, a new aristolactam from Indian *Piper* species. Journal of Natural Products 53:496-497.

Desai S.J.C., R. N.; Badheka, L. P.; Mulchandani, N. B. (1989) Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from Indian *Piper* species. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry 28B:775-777.

Deutscher M.P. (1990) Guide to protein purification, in: J. N. Abelson and M. I. Simon (Eds.), Methods in enzymology, Academic Press, California, USA.

Dexter R., Qualley A., Kish C.M., Ma C.J., Koeduka T., Nagegowda D.A., Dudareva N., Pichersky E., Clark D. (2007) Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. The Plant Journal 49:265-275.

Ding G., Yu Z., Zhao J., Wang Z., Li Y., Xing X., Wang C., Liu L., Li Y. (2008) Tree of Life based on genome context networks. PLoS ONE 3:e3357(1-7).

Do D.R.D., Thanh T.; Vu, T. L.. (2001) Constituents of the leaf oil and leaf extract of *Piper lolot.* Hoa Học Và Công Nghiệp Hoa Chất 5:25-29.

Dodds P.N. (2010) Genome evolution in plant pathogens. Science 330:1486-1487.

Dodson C.D., Dyer L.A., Searcy J., Wright Z., Letourneau D.K. (2000) Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. Phytochemistry 53:51-54.

Dognini J., Meneghetti E.K., Teske M.N., Begnini I.M., Rebelo R.A., Dalmarco E.M., Verdi M., Gasper A.L.d. (2012) Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. Journal of Essential Oil Research 24:241.

Doolittle W.F., Bapteste E. (2007) Pattern pluralism and the Tree of Life hypothesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:2043-2049.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.

Dragull K., Yoshida W.Y., Tang C.-S. (2003) Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. Phytochemistry 63:193-198.

Dyer L.A., Palmer A.D.N. (2004) *Piper:* A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Eisenreich W., Bacher A. (2007) Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. Phytochemistry 68:2799-2815.

Engene N., Choi H., Esquenazi E., Byrum T., Villa F.A., Cao Z., Murray T.F., Dorrestein P.C., Gerwick L., Gerwick W.H. (2011) Phylogeny-guided isolation of ethyl tumonoate A from the marine cyanobacterium cf. *Oscillatoria margaritifera*. Journal of Natural Products 74:1737-1743.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.

Facundo V.A., Morais S.M., Braz F.R. (2000) Flavonoides de *Piper callosum* da Amazônia, 23ª Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, RASBQ, Pocos de Caldas, MG.

Farrell R.E.J. (2010) RNA methodologies - A laboratory guide for isolation and characterization. 4th Edition ed. Elsevier, San Diego, USA.

Felipe F.C.B., Sousa Filho J.T., Souza L.E.O., Silveira J.A., Uchoa D.E.A., Silveira E.R., Pessoa O.D.L., Viana G.S.B. (2007) Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. Phytomedicine 14:605-612.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Ferraz A.B.F., Balbino J.M., Zini C.A., Ribeiro V.L.S., Bordignon S.A.L., Poser G.V. (2010) Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. Parasitology Research 107:243.

Ferreira M.G., Grattapaglia D. (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, Brasília.

Fiehn O. (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comparative and Functional Genomics 2:155-168.

Firn R.D., Jones C.G. (2003) Natural products - a simple model to explain chemical diversity. Natural Product Reports 20:382-391.

Flores N., Jiménez I.A., Giménez A., Ruiz G., Gutiérrez D., Bourdy G., Bazzocchi I.L. (2008) Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. Journal of Natural Products 71:1538-1543.

Fraser C.M., Chapple C. (2011) The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book 9:e0152.

Freitas G.C., Kitamura R.O.S., Lago J.H.G., Young M.C.M., Guimarães E.F., J. K.M. (2009) Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. Phytochemistry Letters 2:119-122.

Fridman E., Pichersky E. (2005) Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. Current Opinion in Plant Biology 8:242-248.

Friedrich U., Siems K., Solis P.N., Gupta M.P., Jenett-Siems K. (2005) New prenylated benzoic acid derivatives of *Piper hispidum*. Pharmazie 60:455-457.

Friis E.M., Pedersen K.R., Crane P.R. (2010) Diversity in obscurity: fossil flowers and the early history of angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 365:369-382.

Frodin D.G. (2004) History and concepts of big plant genera. Taxon 53:753.

Fujita M., Gang D.R., Davin L.B., Lewis N.G. (1999) Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (Thuja plicata) catalyze opposite enantiospecific conversions. Journal of Biological Chemistry 247:618-627.

Galinis D.L., Wiemer D.F. (1993) Villiramulins A and B: new phenol derivatives from *Piper villiramulum*. The Journal of Organic Chemistry 58:7804-7807.

Gang D.R., Costa M.A., Fujita M., Dinkova-Kostova A.T., Wang H.B., Burlat V., Martin W., Sarkanen S., Davin L.B., Lewis N.G. (1999) Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. Chemistry & Biology 6:143-151.

Gavrilets S., Hai L., Vose M.D. (1998) Rapid parapatric speciation on holey adaptive landscapes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 265:1483-1489.

Genderen M.H.P.v., Leclercq P.A., Delgado H.S., Kanjilal P.B., Singh R.S. (1999) Compositional analysis of the leaf oils of *Piper callosum* Ruiz & Pav. from Peru and *Michelia montana* Blume from India. Spectroscopy 14(2):51-59.

Gleave B. (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conductive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology 20:1203-1207.

Gottlieb O.R. (1984) Micromolecular evolution, systematics and ecology - An essay into a novel botanical discipline, in: J. Toman (Ed.), Folia Geobotanica, Springer Netherlands, Berlim. pp. 94.

Gottlieb O.R. (1991) The rational search for natural neolignans. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz 86:25.

Gottlieb O.R. (1992) Plant phenolics as expressions of biological diversity, in: R. Hemingway and P. Laks (Eds.), Plant Polyphenols, Springer US. pp. 523-538.

Gottlieb O.R., De M. B. Borin M.R., Kaplan M.A.C. (1995) Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in angiosperms. Phytochemistry 40:99-113.

Gragasin M.C.B., Wy A.M., Roderos B.P., Acda M.A., Solsoloy A.D. (2006) Insecticidal activities of essential oil from *Piper betle* Linn. against storage insect pests. Philippine Agricultural Scientist 89:212-216.

Grayer R.J., Chase M.W., Simmonds M.S.J. (1999) A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". Biochemical Systematics and Ecology 27:369-393.

Green T.P., Wiemer D.F. (1991) Four neolignan ketones from *Piper capense*. Phytochemistry 30:3759-3762.

Green T.P., Galinis D.L., Wiemer D.F. (1991) Three neolignans from the roots of *Piper capense*. Phytochemistry 30:1649-1652.

Green T.P., Treadwell E.M., Wiemer D.F. (1999) Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. Journal of Natural Products 62:367-368.

Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, et al. (2009) Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology 27: 39-48

Gupta M.P., Arias T.D., Williams N.H., Bos R., Tattje D.H.E. (1985) Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. Journal of Natural Products 48:330-330.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT Nucleic Acids Symposium Series 41:95.

Halls S.C., Lewis N.G. (2002) Secondary and quaternary structures of the (+)-pinoresinol-forming dirigent protein. Biochemistry 41:9455-9461.

Halls S.C., Davin L.B., Kramer D.M., Lewis N.G. (2004) Kinetic study of coniferyl alcohol radical binding to the (+)-pinoresinol forming dirigent protein. Biochemistry 43:2587-2595.

Han G., Ma Y., Li C. (1992) The studies of natural PAF antagonistic neolignans from *Piper* genus and their structure-activity relationships. Beijing Yike Daxue Xuebao 24:347-350.

Hänsel R., Leuschke A. (1976) Ein aporphinalkaloid aus *Piper sanctum*. Phytochemistry 15:1323-1323.

Harmatha J., Nawrot J. (2002) Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. Entomologia Experimentalis Et Applicata 104:51-60.

He Q.L., Yongquan; Cai, Dingquo; Cui, Yingjuan; Lai, Jing; Wang, Housheng. (1981) Analgesic principles from Maoju (*Piper arboricola*). Zhongcaoyao 12:433-435.

Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., Fischer R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nat Biotech 22:1415-1422.

Hemmati S. (2007) Biosynthesis of lignans in plant species of the section *Linum*: pinoresinol-lariciresinol reductase and justicidin B 7-hydroxylase, Faculty of Mathematics and Natural Sciences Heinrich-Heine Universit, Düsseldorf.

Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K. (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:10205-10210.

Ho C.-F.L., Y-C., Tsai T-K.; Chiu Y-C., Lai C.; Wang H-S. (1981) Study on the analgesic principles of *Piper arboricola*. Yaoxue Tongbao 16:63.

Hoffmann L., Maury S., Martz F., Geoffroy P., Legrand M. (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. Journal of Biological Chemistry 278:95-103.

Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell Online 16:1446-1465.

Hossain C.F., Kim Y.-P., Baerson S.R., Zhang L., Bruick R.K., Mohammed K.A., Agarwal A.K., Nagle D.G., Zhou Y.-D. (2005) *Saururus cernuus* lignans--Potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. Biochemical and Biophysical Research Communications 333:1026-1033.

Jaggy H., Achenbach H. (1992) Cepharadione A from *Piper methysticum*. Planta Medica 58:111-111.

Jaramillo M.A., Manos P.S. (2001) Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). American Journal of Botany 88:706-716.

Jaramillo M.A., Callejas R., Davidson C., Smith J.F., Stevens A.C., Tepe E.J. (2008) A Phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ–petA*. Systematic Botany 33:647-660.

Jiang H., Xie Z., Koo H.J., McLaughlin S.P., Timmermann B.N., Gang D.R. (2006) Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Phytochemistry 67:1673-1685.

Jiang R.-W., Mak T.C.W., Fung K.-P. (2003) Molecular structures of two bicyclo-(3.2.1)-octanoid neolignans from *Piper kadsura*. Journal of Molecular Structure 654:177-182.

Jones C.G., Firn R.D., Malcolm S.B. (1991) On the evolution of plant secondary chemical diversity. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 333:273-280.

Kato M.J., Furlan M. (2007) Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure and Applied Chemistry 79:529-538.

Kenrick P., Crane P.R. (1997) The origin and early evolution of plants on land. Nature 389:33-39.

Kijjoa A., Giesebrecht A.M., Gottlieb O.R. (1982) Dihydropiplartine from *Piper bartlingianum*. Planta Medica 44:188-188.

Kikkert J.R., Vidal J.R., Reisch B.I. (2004) Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. pp. 61-78.

Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010a) NMR-based metabolomic analysis of plants. Nat. Protocols 5:536-549.

Kim H.K., Saifullah, Khan S., Wilson E.G., Kricun S.D.P., Meissner A., Goraler S., Deelder A.M., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010b) Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. Phytochemistry 71:773-784.

Kim K.-W., Moinuddin S.G.A., Atwell K.M., Costa M.A., Davin L.B., Lewis N.G. (2012) Opposite stereoselectivities of dirigent proteins in *Arabidopsis* and *Schizandra* species. Journal of Biological Chemistry 287:33957-33972.

Kim M.K., Jeon J.H., Fujita M., Davin L.B., Lewis N.G. (2002) The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. Plant Molecular Biology 49:199-214.

Klink V.P., Overall C.C., Alkharouf N.W., MacDonald M.H., Matthews B.F. (2007) A time-course comparative microarray analysis of an incompatible and compatible response by Glycine max (soybean) to Heterodera glycines (soybean cyst nematode) infection. Planta 226:1423-1447.

Koeduka T., Baiga T.J., Noel J.P., Pichersky E. (2009a) Biosynthesis of t-anethole in *Anise*: Characterization of t-anol/isoeugenol synthase and an *O*-methyltransferase specific for a C7-C8 propenyl side chain. Plant Physiology 149:384-394.

Koeduka T., Orlova I., Baiga T.J., Noel J.P., Dudareva N., Pichersky E. (2009b) The lack of floral synthesis and emission of isoeugenol in Petunia axillaris subsp. parodii is due to a mutation in the isoeugenol synthase gene. The Plant Journal 58:961-969.

Koeduka T., Louie G.V., Orlova I., Kish C.M., Ibdah M., Wilkerson C.G., Bowman M.E., Baiga T.J., Noel J.P., Dudareva N., Pichersky E. (2008) The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages. The Plant Journal 54:362-374.

Koeduka T., Fridman E., Gang D.R., Vassão D.G., Jackson B.L., Kish C.M., Orlova I., Spassova S.M., Lewis N.G., Noel J.P., Baiga T.J., Dudareva N., Pichersky E. (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:10128-10133.

Koonin E.V., Wolfm Y.I. (2012) Constraints and plasticity in genome and molecular-phenome evolution. Nature Reviews Genetics 11:487.

Kranz H.D., Miks D., Siegler M.-L., Capesius I., Sensen C.W., Huss V.A.R. (1995) The origin of land plants: Phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Journal of Molecular Evolution 41:74-84.

Kubanek J., Fenical W., Hay M.E., Brown P.J., Lindquist N. (2000) Two antifeedant lignans from the freshwater macrophyte *Saururus cernuus*. Phytochemistry 54:281-287.

Kunth K. (1839) Bermekungen die Familie der Piperaceen. Linnaea 13:562.

Kuo Y.-C., Yang N.-S., Chou C.-J., Lin L.-C., Tsai W.-J. (2000) Regulation of cell proliferation, gene expression, production of cytokines, and cell cycle progression in primary human T Lymphocytes by piperlactam S isolated from *Piper kadsura*. Molecular Pharmacology 58:1057-1066.

Labandeira C.C., Dilcher D.L., Davis D.R., Wagner D.L. (1994) Ninety-seven million years of angiosperm-insect association: paleobiological insights into the meaning of coevolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:12278-12282.

Lago J.H.G., Young M.C.M., Reigadal J.B., Soares M.G., Roesler B.P., Kato M.J. (2007) Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). Química Nova 30:1222-1224.

Lago J.H.G., Chen A., Young M.C.M., Guimarães E.F., de Oliveira A., Kato M.J. (2009) Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). Phytochemistry Letters 2:96-98.

Lago J.H.G., Ramos C.S., Casanova D.C.C., Morandim A.D., Bergamo D.C.B., Cavalheiro A.J., Bolzani V.D., Furlan M., Guimaraes E.F., Young M.C.M., Kato M.J. (2004) Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. Journal of Natural Products 67:1783-1788.

Lange B.M. (2006) Integrative analysis of metabolic networks: from peaks to flux models? Current Opinion in Plant Biology 9:220-226.

Le Gall G., Colquhoun I.J., Defernez M. (2004) Metabolite profiling using ^{1}H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:692-700.

Leal L.F., Miguel O.G., Silva R.Z., Yunes R.A., Santos A.S., Cechinel-Filho V. (2005) Chemical composition of *Piper mikanianum* essential oil. Journal of Essential Oil Research 17:316-317.

Lee E.-J., Shaykhutdinov R., Weljie A.M., Vogel H.J., Facchini P.J., Park S.-U., Kim Y.-K., Yang T.-J. (2009) Quality assessment of ginseng by ^{1}H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:7513-7522.

Lee F.P., Chen Y.C., Chen J.J., Tsai I.L., Chen I.S. (2004) Cyclobutanoid amides from *Piper arborescens*. Helvetica Chimica Acta 87:463-468.

Lee S.W., Kim Y.K., Kim K., Lee H.S., Choi J.H., Lee W.S., Jun C.-D., Park J.H., Lee J.M., Rho M.-C. (2008) Alkamides from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum* displaying potent cell adhesion inhibition. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18:4544-4546.

Leitch I.J., Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D. (2005) Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). Annals of Botany 95:207-217.

Leite A.C., Lopes A.A., Kato M.J., Bolzani V.D., Furlan M. (2007) Biosynthetic origin of the isoprene units in chromenes of *Piper aduncum* (piperaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society 18:1500-1503.

Lewis N.G. (1998) Biochemical precision in monolignol coupling and associated metabolism: The lignin/lignan question. 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Vol A:A43-A48.

Lewis N.G., Kato M.J., Lopes N.P., Davin L.B. (1995) Lignans: diversity, biosynthesis, and function, Chemistry of the Amazon, American Chemical Society. pp. 135-167.

Li C.-Y., Tsai W.-J., Damu A.G., Lee E.J., Wu T.-S., Dung N.X., Thang T.D., Thanh L. (2007) Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the leaves of *Piper lolot*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:9436-9442.

Liao P.-C., Gong X., Shih H.-C., Chiang Y.-C. (2009) Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci from an endemic species, *Piper polysyphonum* (Piperaceae). Conservation Genetics 10:1911-1914.

Likhitwitayawuid K., Ruangrungsi N., Lange G.L., Decicco C.P. (1987) Structural elucidation and synthesis of new components isolated from Piper sarmentosum (Piperaceae). Tetrahedron 43:3689-3694.

Lin L.-C., Shen C.-C., Shen Y.-C., Tsai T.-H. (2006) Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*. Journal of Natural Products 69:842-844.

Liu J.G., Stipanovic R.D., Bell A.A., Puckhaber L.S., Magill C.W. (2008) Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. Phytochemistry 69:3038-3042.

Lopes A.A., Baldoqui D.C., Lopez S.N., Kato M.J., Bolzani V.d.S., Furlan M. (2007) Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). Phytochemistry 68:2053-2058.

Lopes A.A., Lopez S.N., Regasini L.O., Batista J.M., Ambrosio D.L., Kato M.J., Bolzani V.D., Cicarelli R.M.B., Furlan M. (2008) In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. Natural Product Research 22:1040-1046.

Lopes N.P., Chicaro P., Kato M.J., Albuquerque S., Yoshida M. (1998) Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. Planta Med 64:667-669.

Louie G.V., Baiga T.J., Bowman M.E., Koeduka T., Taylor J.H., Spassova S.M., Pichersky E., Noel J.P. (2007) Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase. PLoS ONE 2:e993.

Luger P.W., M.; Dung, N. X.; Luu, V. T.; Rang, D. D.; Tuong, D. T.; Ngoc, P. H. (2002) The crystal structure of 3-(4'-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole of *Piper lolot* C.DC from Vietnam. Crystal Research and Technology 37:627-633.

Luize P.S., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., Cortez D.A., Garcia, Nakamura C.V. (2006) Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 29:2126-2130.

Ma J., Jones S.H., Hecht S.M. (2004a) Phenolic acid amides: a new type of DNA strand scission agent from *Piper caninum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12:3885-3889.

Ma J., Jones S.H., Marshall R., Johnson R.K., Hecht S.M. (2004b) A DNA-damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*. Journal of Natural Products 67:1162-1164.

Ma Y., Han G., Jiang T., Yang X. (1992) Neolignans from *Piper kadsura*. Chinese Chemical Letters 3:635-636.

Macías F., Oliveros-Bastidas A., Marín D., Carrera C., Chinchilla N., Molinillo J. (2008) Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. Phytochemistry Reviews 7:179-194.

Maia J.G., Goeldi E., Green C.L., Milchard M.J. (1993) New sources of natural safrole. Perfumer & Flavorist 18:19-22.

Maia J.G.S., Andrade E.H.A. (2007) Leaf essential oil composition of Zanthoxylum monogynum St.-Hil. Journal of Essential Oil Bearing Plants 10:282-286.

Marques A., Velozo L.S.M., Guimarães E.F., Kaplan M.A.C. (2008a) Caracterização de derivado arilbutanoídico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. Revista Brasileira de Farmacognosia 18:709-712.

Marques J.V., de Oliveira A., Young M.C.M., Kato M.J. (2008b) Antifungal piperolides, coumarins, pyrones and amides from *Piper* species and synthetic analogs. Planta Medica 74:1169-1169.

Marques J.V., Kitamura R.O.S., Lago J.H.G., Young M.C.M., Guimarães E.F., Kato M.J. (2007) Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. Journal of Natural Products 70:2036-2039.

Martins R.C.C. (2002) Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae), Instituto de Química, USP., Universidade de São Paulo, São Paulo.

Martins R.C.C., Latorre L.R., Sartorelli P., Kato M.J. (2000) Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. Phytochemistry 55:843-846.

Martins R.C.C., Lago J.H.G., Albuquerque S., Kato M.J. (2003) Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. Phytochemistry 64:667-670.

Mata R., Morales I., Pérez O., Rivero-Cruz I., Acevedo L., Enriquez-Mendoza I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B. (2004) Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. Journal of Natural Products 67:1961-1968.

Matioli S.R. (2001) Biologia molecular e evolução Editora Holos, Ribeirão Preto.

Matioli S.R., Passos-Bueno M.R.S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos, in: S. R. Matioli (Ed.), Biologia molecular e evolução, Editora Holos, Ribeirão Preto.

Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yasuda D., Yamaguchi I., Yoshikawa M. (2008) Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on d-galactosamine/TNF-α-induced cell death in mouse hepatocytes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18:2038-2042.

Maxwell A., Ramprasad D. (1989) β-Phenylethylamine-derived amides from *Piper guayranum*. Journal of Natural Products 52:411-414.

Maxwell A., Rampersad D. (1991) A new dihydropiplartine and piplartine dimer from *Piper rugosum*. Journal of Natural Products 54:1150-1152.

Maxwell A., Dabideen D., Reynolds W.F., McLean S. (1999) Neolignans from *Piper aequale*. Phytochemistry 50:499-504.

McBurnett B.G., Chavira A.A., Lopez A.C., Mosso J., Collins S.M. (2007) Analysis of *Piper auritum*: a traditional Hispanic herb, ACS Symposium Series American Chemical Society. pp. 67-76.

McFerren M.A., Cordova D., Rodriguez E., Rauh J.J. (2002) *In vitro* neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology 83:201-207.

Medeiros E.S.S. (2006) Flora do parque estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil - Família Piperaceae, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro.

Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. Science 282:662-682.

Meléndez-Rodríguez M., Rendón W., Chávez G., Martínez-Guajardo G., Joseph-Nathan P. (2000) ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of dihydropipataline, the main of four long-chain 1-(3,4- ethylenedioxyphenyl)-alkanes from *Piper darienence* D.C. Spectroscopy 14:195-201.

Menezes I., Cidade F., Souza A., Sampaio I. (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). Conservation Genetics Resources 1:209-212.

Miquel F.A.G. (1845) Animadversiones in *Piperaceas* Herbarii Hookeriani. The London Journal of Botany 4:410-470.

Moco S., Bino R.J., Vorst O., Verhoeven H.A., de Groot J., van Beek T.A., Vervoort J., de Vos C.H.R. (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. Plant Physiology 141:1205-1218.

Monteiro D., Guimarães E.F. (2009) Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: Manekia e Piper (Piperacea). Rodriguésia 60:999-1024.

Morandim A.A., Cavalheiro A.J., Kato M.J., Bolzani V.S., Furlan M. (2009) Intrapopulacional variability of dihydrochalcone, chromenes and benzoic acid derivatives from leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). African Journal of Biotechnology 8:2157-2162.

Morandim A.D., Bergamo D.C.B., Kato M.J., Cavalheiro A.J., Bolzani V.D., Furlan M. (2005) Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. Phytochemical Analysis 16:282-286.

Moreira D.D., Guimaraes E.F., Kaplan M.A.C. (1998) A chromene from *Piper aduncum*. Phytochemistry 48:1075-1077.

Moreira D.L., Souza P.O., Kaplan M.A.C., Pereira N.A., Cardoso G.L., Guimaraes E.F. (2001) Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. Anais da Academia Brasileira de Ciências 73:33-37.

Morikawa T., Yamaguchi I., Matsuda H., Yoshikawa M. (2009) A new amide, Piperchabamide F, and two new phenylpropanoid glycosides, Piperchabaosides A and B, from the fruit of *Piper chaba*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 57:1292-1295.

Morrissey J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analytical Biochemistry 117:307-310.

Murata K., Nakao K., Hirata N., Namba K., Nomi T., Kitamura Y., Moriyama K., Shintani T., Iinuma M., Matsuda H. (2009) Hydroxychavicol: a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*. Journal of Natural Medicines 63:355-359.

Nair M.G., Sommerville J., Burke B.A. (1989) Phenyl propenoids from roots of *Piper auritum*. Phytochemistry 28:654-655.

Nakatsubo T., Mizutani M., Suzuki S., Hattori T., Umezawa T. (2008) Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 283:15550-15557.

Navickiene H.M.D., Alecio A.C., Kato M.J., Bolzani V.D., Young M.C.M., Cavalheiro A.J., Furlan M. (2000) Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry 55:621-626.

Navickiene H.M.D., Bolzani V.d.S., Kato M.J., Pereira A.M.S., Bertoni B.W., França S.C., Furlan M. (2003) Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Phytochemical Analysis 14:281-284.

Navickiene H.M.D., Morandim A.D.A., Alecio A.C., Regasini L.O., Bergamo D.C.B., Telascrea M., Cavalheiro A.J., Lopes M.N., Bolzani V.D., Furlan M., Marques M.O.M., Young M.C.M., Kato M.J. (2006) Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum, Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Química Nova 29:467-470.

Nawrot J., Harmatha J. (2012) Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pests. Phytochemistry Reviews 11:543-566.

Nei M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University, New York.

Newman D.J., Cragg G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products 70:461-477.

Newman D.J., Cragg G.M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products 75:311-335.

Nobuji N., Reiko I., Haruko O., Atsuko N. (1986) Chemical constituents of Peppers (*Piper* spp.) and application to food preservation: naturally occurring antioxidative compounds. . Environmental Health Perspectives 67:165-142.

Nunez V., Castro V., Murillo R., Ponce-Soto L.A., Merfort I., Lomonte B. (2005) Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. Phytochemistry 66:1017-1025.

Orjala J., Mian P., Rali T., Sticher O. (1998) Gibbilimbols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper gibbilimbum*. Journal of Natural Products61:939-941.

Orjala J., Erdelmeier C.A.J., Wright A.D., Rali T., Sticher O. (1993a) Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. Phytochemistry 34:813-818.

Orjala J., Erdelmeier C.A.J., Wright A.D., Rali T., Sticher O. (1993b) Five new prenylated *p*-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. Planta Med 59:546-551.

Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry 46:597-673.

Parmar V.S., Jain S.C., Gupta S., Talwar S., Rajwanshi V.K., Kumar R., Azim A., Malhotra S., Kumar N., Jain R., Sharma N.K., Tyagi O.D., Lawrie S.J., Errington W., Howarth O.W., Olsen C.E., Singh S.K., Wengel J. (1998) Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. Phytochemistry 49:1069-1078.

Pedersen M.E., Metzler B., Stafford G.I., van Staden J., Jager A., Rasmussen H. (2009) Amides from *Piper capense* with CNS activity - A preliminary SAR analysis. Molecules 14:3833-3843.

Petersen M. (2007) Current status of metabolic phytochemistry. Phytochemistry 68:2847-2860.

Potzernheim M., Costa A.F., Bizzo H.R., Carvalho-Silva M., Vieira R.F. (2006) Essential oil of *Piper xylosteoide*s (Kunth) Steud. from Federal District, Brazil. Journal of Essential Oil Research 18:523-524.

Pradhan P., Desai S.J., Badheka L.P., Banerji A. (1994) Neolignans from Indian *Piper* species: structure of Hookerinone A, a novel neolignan. Natural Product Letters 4:35 - 42.

Pring B.G. (1982) Isolation and identification of amides from *Piper callosum*. Synthesis of pipercallosine and pipercallosidine. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1:1493-1498.

Pritchard J., K. , Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945.

Probstle A., Bauer R. (1992) Aristolactams and a 4,5-dioxoaporphine derivative from *Houttuynia cordata*. Planta Medica 58:568-569.

Raimundo J.M., Trindade A.P.F., Velozo L.S.M., Kaplan M.A.C., Sudo R.T., Zapata-Sudo G. (2009) The lignan eudesmin extracted from *Piper truncatum* induced vascular relaxation via activation of endothelial histamine H1 receptors. European Journal of Pharmacology 606:150-154.

Ralph S., Park J.Y., Bohlmann J., Mansfield S.D. (2006) Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (Picea spp.). Plant Molecular Biology 60:21-40.

Ralph S.G., Jancsik S., Bohlmann J. (2007) Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (Picea spp.). Phytochemistry 68:1975-1991.

Ramos C.S., Vanin S.A., Kato M.J. (2009) Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). Chemoecology 19:73-80.

Rao K.V., Reddy G.C.S. (1990) Chemistry of *Saururus cernuus*, V. Sauristolactam and other nitrogenous constituents. Journal of Natural Products 53:309-312.

Rapado L.N., Pinheiro A.d.S., Lopes P.O.d.M.V., Fokoue H.H., Scotti M.T., Marques J.V., Ohlweiler F.P., Borrely S.I., Pereira C.A.d.B., Kato M.J., Nakano E., Yamaguchi L.F. (2013) Schistosomiasis control using piplartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. PLoS Neglected Tropical Diseases 7:e2251.

Reigada J.B., Tcacenco C.M., Andrade L.H., Kato M.J., Porto A.L.M., Lago J.H.G. (2007) Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)-antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). Tetrahedron: Asymmetry 18:1054-1058.

Richards J.L., Myhre S.M., Jay J.I. (2001) Total synthesis of piplartine, 13-desmethylpiplartine, and cenocladamide: Three compounds isolated from *Piper cenocladum*, 221st American Chemical Society Meeting, ACS, San Diego, CA.

Richards J.L., Rolig J.S.M., S.; B., Reid A.J., Mather J.E. (2005) Total synthesis of demethoxypiplartine, piplaroxide, and desmethylpiplaroxide: three compounds isolated from *Piper imperiale*. 60th Northwest Regional Meeting of the American Chemical Society, Fairbanks, United States.

Rochfort S. (2005) Metabolomics reviewed: A new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. Journal of Natural Products 68:1813-1820.

Rodrigues D. S, Baroni S., Svidzinski A.E., Bersani-Amado C.A., Cortez D.A.G. (2008) Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology 116:569-573.

Rohlf F.J. (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1., New York.

Rowe H.C., Hansen B.G., Halkier B.A., Kliebenstein D.J. (2008) Biochemical networks and epistasis shape the *Arabidopsis thaliana* metabolome. Plant Cell 20:1199-1216.

Royer-Carenzi M., Pontarotti P., Didier G. (2013) Choosing the best ancestral character state reconstruction method. Mathematical Biosciences 242:95-109.

Rüegg T., Calderón A.I., Queiroz E.F., Solís P.N., Marston A., Rivas F., Ortega-Barría E., Hostettmann K., Gupta M.P. (2006) 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. Journal of Ethnopharmacology 103:461-467.

Russell G.B., Fenemore P.G. (1973) New lignans from leaves of *Macropiper excelsum*. Phytochemistry 12:1799-1803.

Samain M.-S., Vanderschaeve L., Chaerle P., Goetghebeur P., Neinhuis C., Wanke S. (2009) Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)? Plant Systematics and Evolution 278:1-21.

Santos B.V.d.O., Chaves E.V.L.d.-C.M.C.d.O., Gray A.I. (1998) Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. Phytochemistry 49:1381-1384.

Sartorelli P., Benevides P.J.C., Ellensohn R.M., Rocha M.V.A.F., Moreno P.R.H., Kato M.J. (2001) Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. Plant Science 161:1083-1088.

Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences 97:11655-11660.

Schlag E.M., McIntosh M.S. (2013) The relationship between genetic and chemotypic diversity in American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). Phytochemistry.

Schmidt T.J., Hemmati S., Klaes M., Konuklugil B., Mohagheghzadeh A., Ionkova I., Fuss E., Wilhelm Alfermann A. (2010) Lignans in flowering aerial parts of *Linum* species –

Chemodiversity in the light of systematics and phylogeny. Phytochemistry 71:1714-1728.

Schmitt I., Lumbsch H.T. (2004) Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. Molecular Phylogenetics and Evolution 33:43-55.

Schmitt I., Barker F.K. (2009) Phylogenetic methods in natural product research. Natural Product Reports 26:1585-1602.

Schwab W. (2003) Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? Phytochemistry 62:837-849.

Scott I., Jensen H., Philogène B., Arnason J. (2008) A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochemistry. Reviews. 7:65-75.

Scott I.M., Puniani E., Jensen H., Livesey J.F., Poveda L., Sanchez-Vindas P., Durst T., Arnason J.T. (2005) Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1907-1913.

Silva A.M. (2008) Metabolismo secundário e ligninas em espécies de *Piper*, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. pp. 150.

Silva D.R., Endo E.H., Filho B.P.D., Nakamura C.V., Svidzinski T.I.E., de Souza A., Young M.C.M., Ueda-Nakamura T., Cortez D.A.G. (2009a) Chemical composition and antimicrobial properties of *Piper ovatum* Vahl. Molecules 14:1171-1182.

Silva M.d.G., Maruyama C.K., Yamaguchi L.F., Kato M.J. (2009b) Identificação e caracterização de fenilpropanoides em *Piper cubataonum*, in: U. d. S. Paulo (Ed.), 17º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP), USP, São Paulo.

Singh S.K., Ashok P.K., Olsen C.E., Jha A., Jain S.C., Parmar V.S., Wenge J. (1996) Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophylum*. Phytochemistry 43:1355-1360.

Smith J., Stevens A., Tepe E., Davidson C. (2008) Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). Plant Systematics and Evolution 275:9-30.

Sokal R.R., Michener C.D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin 38.

Solis P.N., Olmedo D., Nakamura N., Calderón A.I., Hattori M., Gupta M.P. (2005) A new larvicidal lignan from *Piper fimbriulatum*. Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy) 43:378-381.

Srinivasan K. (2007) Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 47:735-748.

Srivastava S., Verma R.K., Gupta M.M., Kumar S. (2000a) Chemical constituents of *Piper mullesua*. Journal of the India Chemical Society 77:305-306.

Srivastava S., Gupta M.M., Tripathi A.K., Kumar S. (2000b) 1,3-Benzodioxole-5-(2,4,8-triene-methyl nonaoate) and 1,3-benzodioxole -5-(2,4,8-triene-isobutyl nonaoate) from *Piper mullesua*. Indian Journal of Chemistry 39B:946-949.

Srivastava S., Gupta M.M., Prajapati V., Tripathi A.K., Kumar S. (2001a) Sesamin a potent antifeedant principle from *Piper mullesua*. Phytotherapy Research 15:70-72.

Srivastava S., Gupta M.M., Prajapati V., A.K. T., Kumar S. (2001b) Insecticidal activity of myristicin from *Piper mullesua*. Pharmaceutical Biology 39:226-229.

St Pierre B., de Luca V. (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and classification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism, in: J. T.

Romeo, et al. (Eds.), Evolution of metabolic pathways, Elsevier Science Ltd, Oxford. pp. 285-315.

Stahl E. (1990) Thin-layer chromatography - A laboratory handbook. 2º edição ed. Spring-Verlag, New York.

Stöhr J.R., Xiao P.-G., Bauer R. (2001) Constituents of chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in vitro*. Journal of Ethnopharmacology 75:133-139.

Storchová H., Olson M.S. (2007) The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. Plant Systematics and Evolution 268:235-256.

Su H.C.F., Sondengam B.L. (1980) Laboratory evaluation of toxicity of 2 alkaloidal amides of *Piper guineense* to 4 species of stored-product insects. Journal of the Georgia Entomological Society 15:47-52.

Sumathykutty M.A., Madhusudana R.J. (1988) Lignans from leaves of *Piper nigrum* Linn. Indian Journal of Chemistry 27:388-389.

Tabopda T.K., Ngoupayo J., Liu J., Mitaine-Offer A.-C., Tanoli S.A.K., Khan S.N., Ali M.S., Ngadjui B.T., Tsamo E., Lacaille-Dubois M.-A., Luu B. (2008) Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. Phytochemistry 69:1726-1731.

Taguchi G., Shitchi Y., Shirasawa S., Yamamoto H., Hayashida N. (2005) Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. The Plant Journal 42:481-491.

Terreaux C., Gupta M.P., Hostettmann K. (1998) Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. Phytochemistry 49:461-464.

The Angiosperm Phylogeny G. (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161:105-121.

Thum K., Shin M., Gutierrez R., Mukherjee I., Katari M., Nero D., Shasha D., Coruzzi G. (2008) An integrated genetic, genomic and systems approach defines gene networks regulated by the interaction of light and carbon signaling pathways in *Arabidopsis*. BMC Systems Biology 2:31.

Tohge T., Nishiyama Y., Hirai M.Y., Yano M., Nakajima J., Awazuhara M., Inoue E., Takahashi H., Goodenowe D.B., Kitayama M., Noji M., Yamazaki M., Saito K. (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. Plant Journal 42:218-235.

Tsesmetzis N., Couchman M., Higgins J., Smith A., Doonan J.H., Seifert G.J., Schmidt E.E., Vastrik I., Birney E., Wu G.M., D'Eustachio P., Stein L.D., Morris R.J., Bevan M.W., Walsh S.V. (2008) *Arabidopsis* reactome: A foundation knowledgebase for plant systems biology. Plant Cell 20:1426-1436.

Tsui W.Y., Brown G.D. (1996) Chemical study of the aerial parts of *Houttuynia cordata.* Fitoterapia 67(5):479.

Tuntiwachwuttkul P., Phansa P., Pootaeng-On Y., Taylor W.C. (2006) Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 54:149-151.

Umezawa T. (2003a) Diversity in lignan biosynthesis. Phytochemistry Reviews 2:371-390.

Umezawa T. (2003b) Phylogenetic distribution of lignan producing plants. Wood Research 90:27.

Valadares M.C., de Carvalho I.C.T., de Oliveira Jr. L., Vieira M.S., Benfica P.L., de Carvalho F.S., Andrade L.V.S., Lima E.M., Kato M.J. (2009) Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin. Journal of Pharmacy and Pharmacology 61:1709-1714.

Valdivia C., Marquez N., Eriksson J., Vilaseca A., Muñoz E., Sterner O. (2008) Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16:4120-4126.

Vassão D.G., Kim K.-W., Davin L.B., Lewis N.G. (2010) Lignans (neolignans) and allyl/propenyl phenols: biogenesis, structural biology, and biological/human health considerations, in: M. Lew and L. Hung-Wen (Eds.), Comprehensive Natural Products II, Elsevier, Oxford. pp. 815-928.

Vassão D.G., Kim S.-J., Milhollan J.K., Eichinger D., Davin L.B., Lewis N.G. (2007) A pinoresinol-lariciresinol reductase homologue from the creosote bush *(Larrea tridentata)* catalyzes the efficient *in vitro* conversion of p-coumaryl/coniferyl alcohol esters into the allylphenols chavicol/eugenol, but not the propenylphenols p-anol/isoeugenol. Archives of Biochemistry and Biophysics 465:209-218.

Vassão D.G., Gang D.R., Koeduka T., Jackson B., Pichersky E., Davin L.B., Lewis N.G. (2006) Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction. Organic & Biomolecular Chemistry 4:2733-2744.

Vega A.S., Rojano B., Blair S., Segura C., Figadere B., Seon B., Grellier P., Sáez J. (2008) Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (Piperaceae). Pharmacologyonline 1:1-8.

Verpoorte R., Choi Y.H., Kim H.K. (2005) Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. Journal of Ethnopharmacology 100:53-56.

Verpoorte R., Choi Y.H., Kim H.K. (2007) NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. Phytochemistry Reviews 6:3-14.

Vieira P., De Alvarenga M., Gottlieb O., Gottlieb H. (1980) 4-Hexadecenylphenol and flavonoids from *Piper hispidum*. Planta Medica 39:153-156.

Vu V.D., Dao T.V., Huynh T. (2004) Study on chemical components and biological properties of the herbal medicine Herba *Piper lolot*. Tập chỉ Được học 44:8-10.

Walker K., Long R., Croteau R. (2002) The final acylation step in Taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:9166-9171.

Walker K., Ketchum R.E.B., Hezari M., Gatfield D., Goleniowski M., Barthol A., Croteau R. (1999) Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20),11(12)-dien-5α-ol-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics 364:273-279.

Wanke S., Jaramillo M.A., Borsch T., Samain M.S., Quandt D., Neinhuis C. (2007) Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. Molecular Phylogenetics and Evolution 42:477-497.

Waterman P.G. (2007) The current status of chemical systematics. Phytochemistry 68:2896-2903.

Wink M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64:3-19.

Wink M., Waterman P.G. (1999) Chemotaxonomy in relation to molecular phylogeny of plants. Annual Plant Review 2:300-341.

Wink M., Mohamed G.I.A. (2003) Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny

inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. Biochemical Systematics and Ecology 31:897-917.

Woese C.R. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. Proceedings of the National Academy of Sciences 97:8392-8396.

Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences 87:4576-4579.

Wu Q., Feng Y., Yang J. (1994) Two new alkaloids from *Piper puberulum*. Chinese Chemical Letters 5:203-206.

Xia Z.Q., Costa M.A., Proctor J., Davin L.B., Lewis N.G. (2000) Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. Phytochemistry 55:537-549.

Xinxia X., Fugang Q., Jing X., Shengli P. (2005) Amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. Zhongcaoyao 36:508.

Yamaguchi L.F., Freitas G.C., Yoshida N.C., Silva R.A., Gaia A.M., Silva A.M., Scotti M.T., Emerenciano V.d.P., Guimarães E.F., Floh E.I.S., Colombo C.A., Siqueira W.J., Kato M.J. (2011) Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. Journal of the Brazilian Chemical Society 22:2371.

Yoshida N.C., Yamaguchi L.F., Salatino A., Rojas J.D.R., Padilha G., Kato M.J. (2012) Occurrence of lignoids in Schilleria and Macrostachys clades of *Piper*. Pharmaceutical Biology 50:537-610.

Yun Z., Jinlan R., Yaling C. (2005) Study on three aristololatams from *Piper wallichii*. Journal of Chinese Medicinal Materials 28:191-193.

Zhang S.-X., Chen K., Liu X.-J., Zhang D.-C., Tao-Wiedmann T.-W., Leu S.-l., McPhail A.T., Lee K.-H. (1995) The isolation and structural elucidation of three new neolignans, Puberulins A, B, and C, as platelet activating factor receptor antagonists for *Piper puberulum*. Journal of Natural Products 58:540-547.

Zhao Y., Ruan J.-l. (2006) Chemical constituents from *Piper wallichii*. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences 15:21-32.

Zimmer C. (2009) On the Origin of Eukaryotes. Science 325:666-668.

Apêndice 1

Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos extratos brutos (fração $CHCl_3$) dos espécimens de *P. solmsianum* utilizados no estudo da variabilidade química e genética.

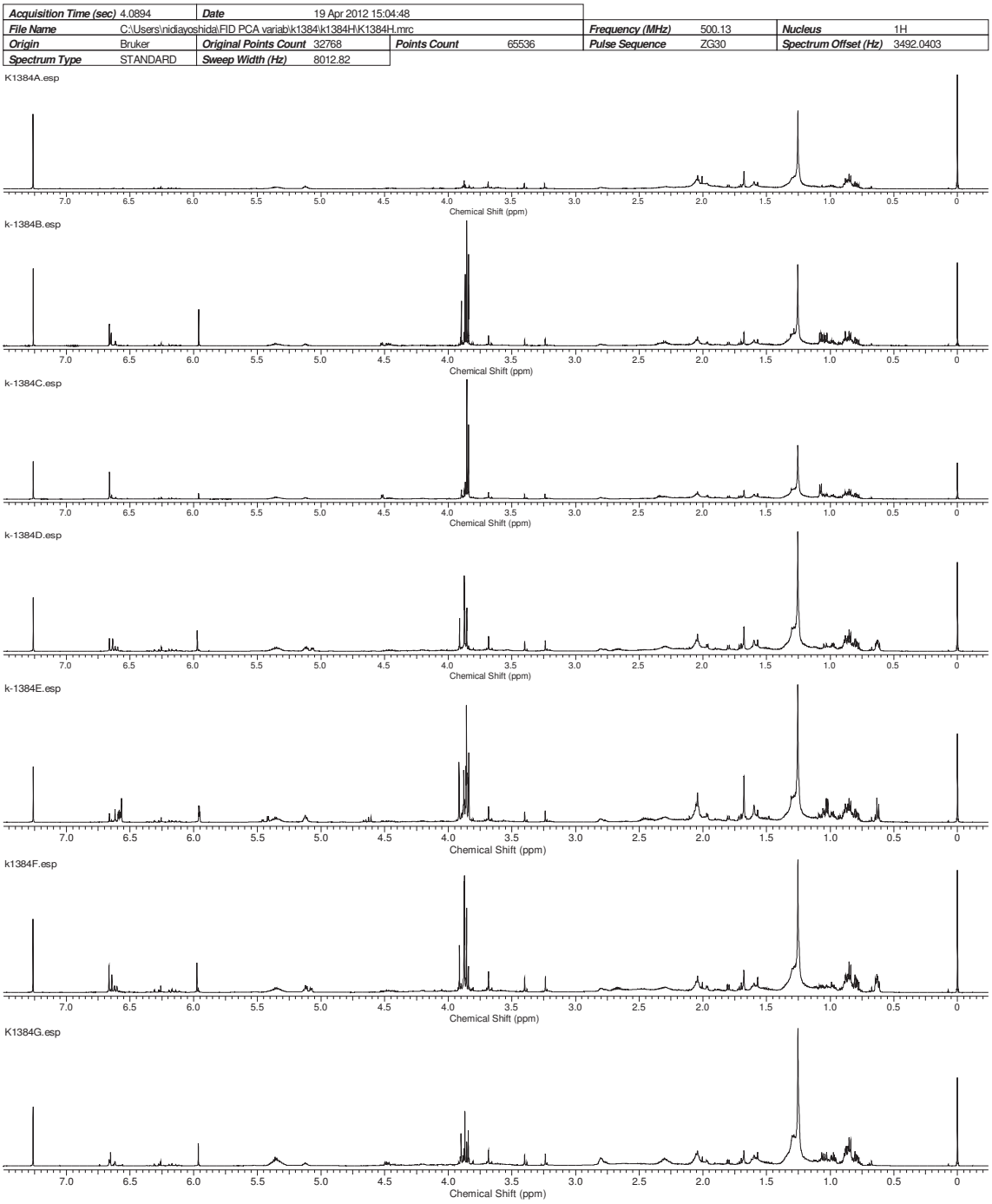


Figura 73. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens A1-A7 (K-1384).

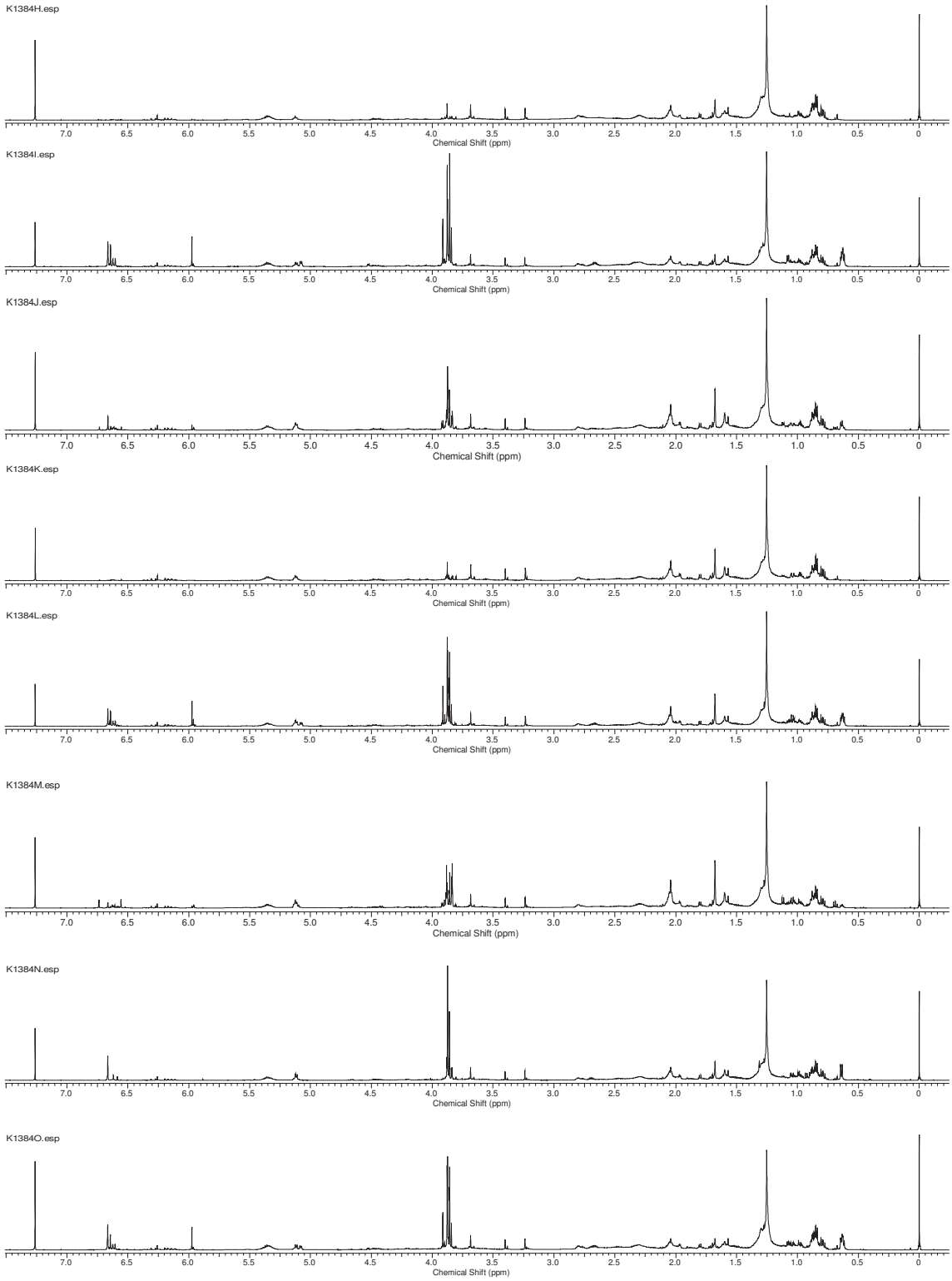


Figura 74. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens A8-A15 (K-1384).

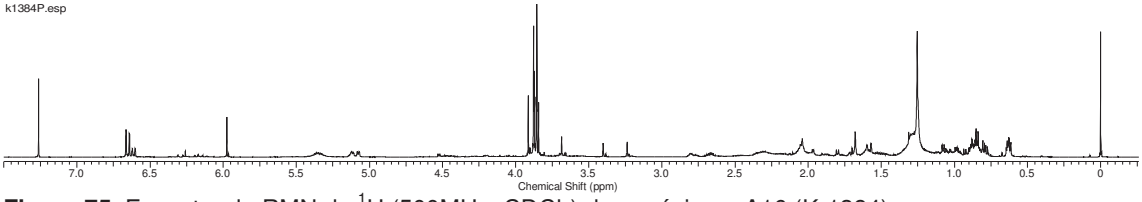


Figura 75. Espectro de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A16 (K-1384).

Acquisition Time (sec) 4.0894		***Date*** 30 Mar 2011 13:10:34					
File Name C:\Users\nidiayoshida\FID PCA variab\k1368\k-1368A\k-1368A.mrc				***Frequency (MHz)*** 500.13		***Nucleus*** 1H	
Origin Bruker	***Original Points Count*** 32768		***Points Count*** 65536	***Pulse Sequence*** ZG		***Spectrum Offset (Hz)*** 3493.1440	
Spectrum Type STANDARD	***Sweep Width (Hz)*** 8012.82						

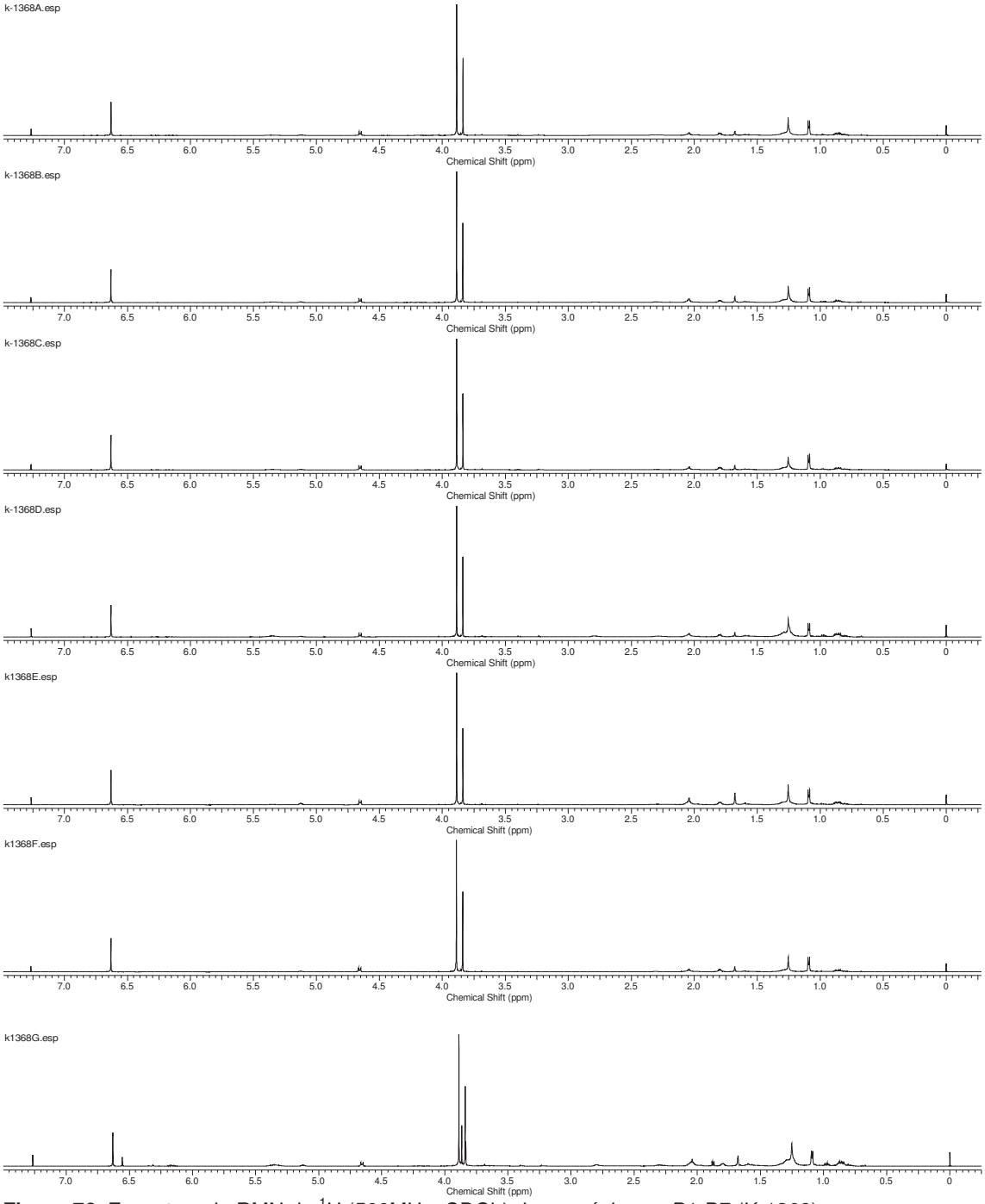


Figura 76. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens B1-B7 (K-1368).

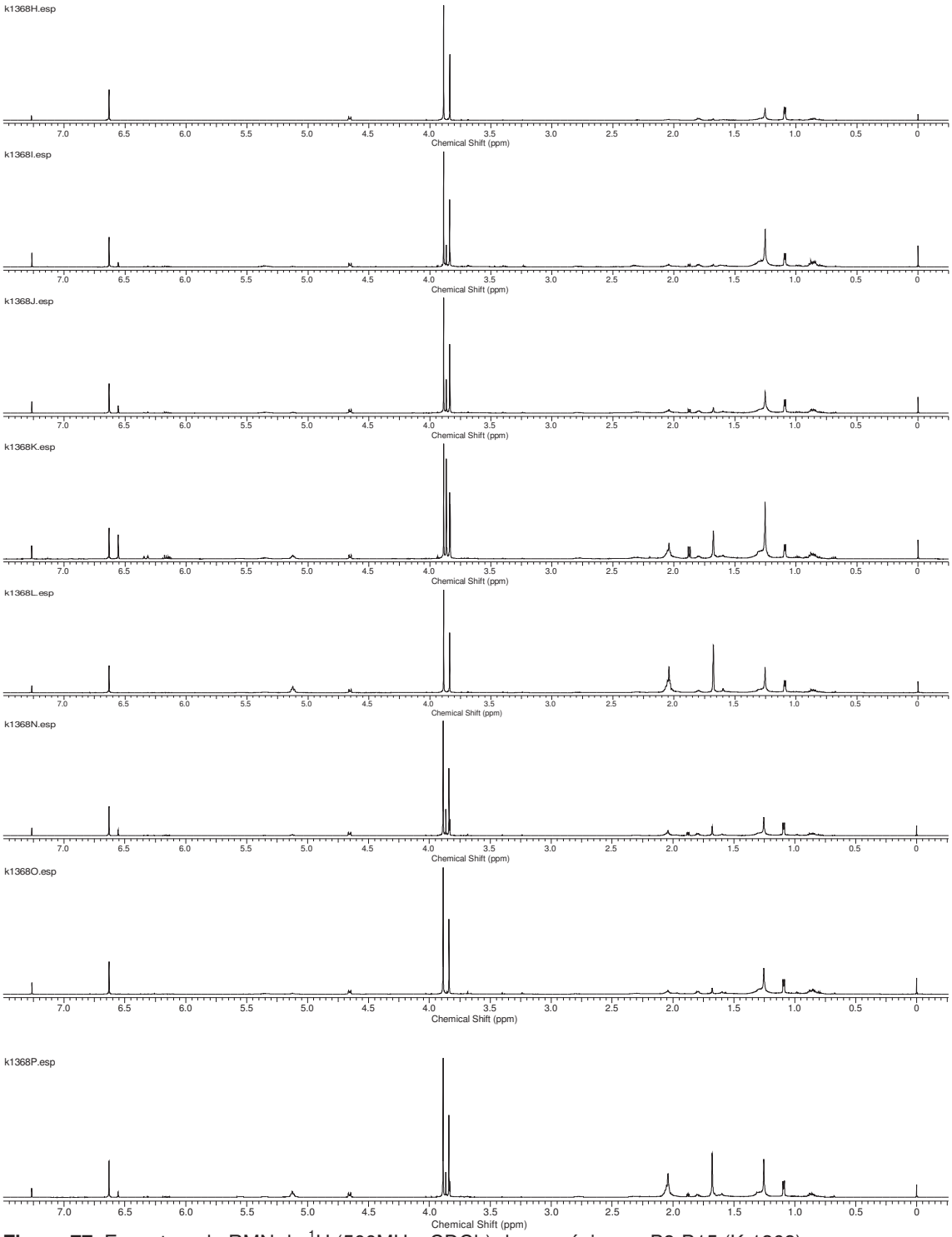


Figura 77. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens B8-B15 (K-1368).

Acquisition Time (sec)	4.0894	***Comment***	Nidia K-1329A T=300K DRX500 30/Mar/2011 53920	***Date***	30 Mar 2011 17:50:56
File Name	C:\Documents and Settings\Nidia\Desktop\PCA P solm2\k-1329\k-1329A\k-1329A_001000fid			***Frequency (MHz)***	500.13
Nucleus	1H	***Number of Transients***	128	***Original Points Count*** 32768	***Points Count*** 32768
Pulse Sequence	zg	***Solvent***	CHLOROFORM-d	***Spectrum Offset (Hz)*** 3491.8994	***Sweep Width (Hz)*** 8012.82
Temperature (degree C)	27.100				

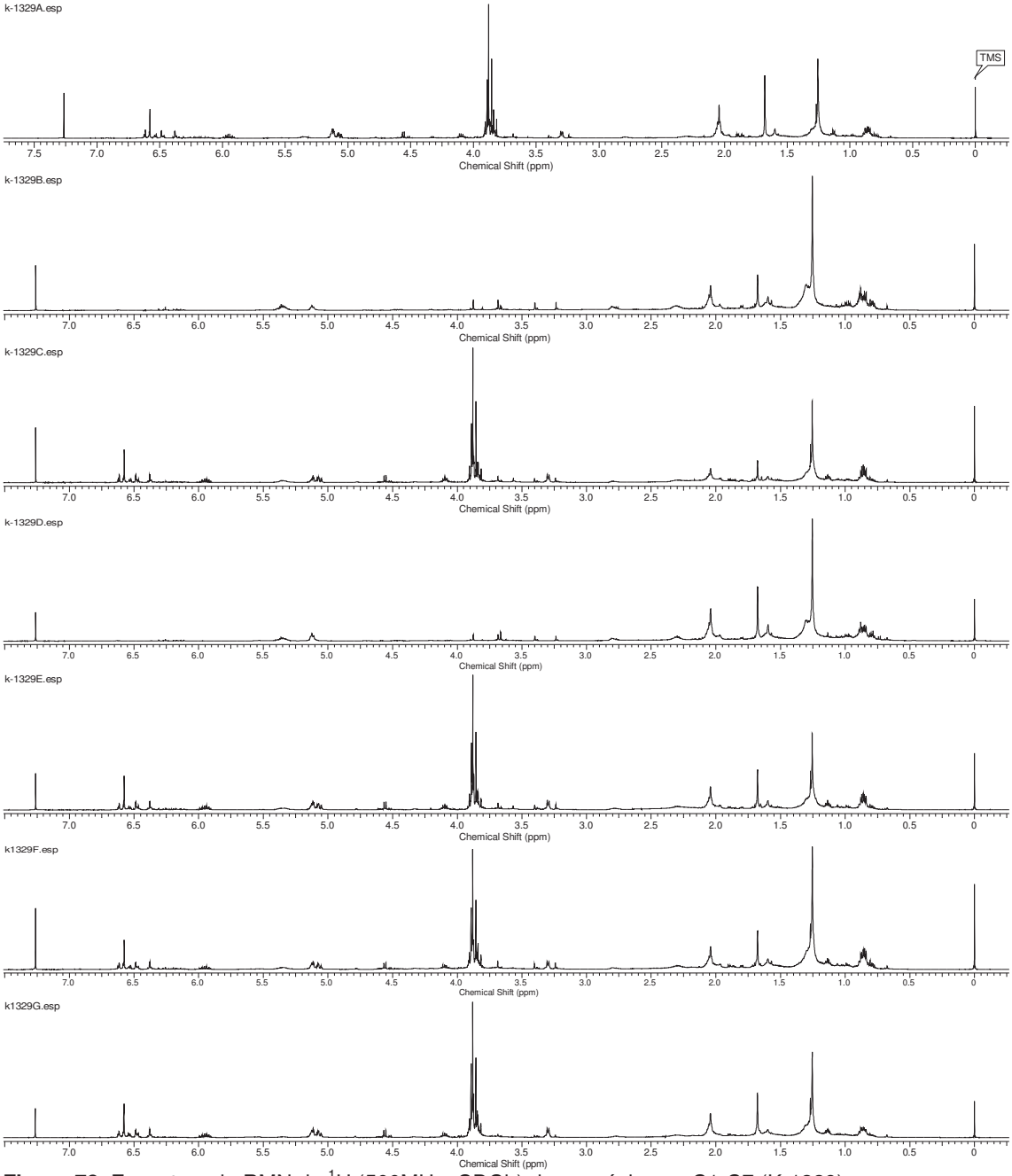


Figura 78. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens C1-C7 (K-1329).

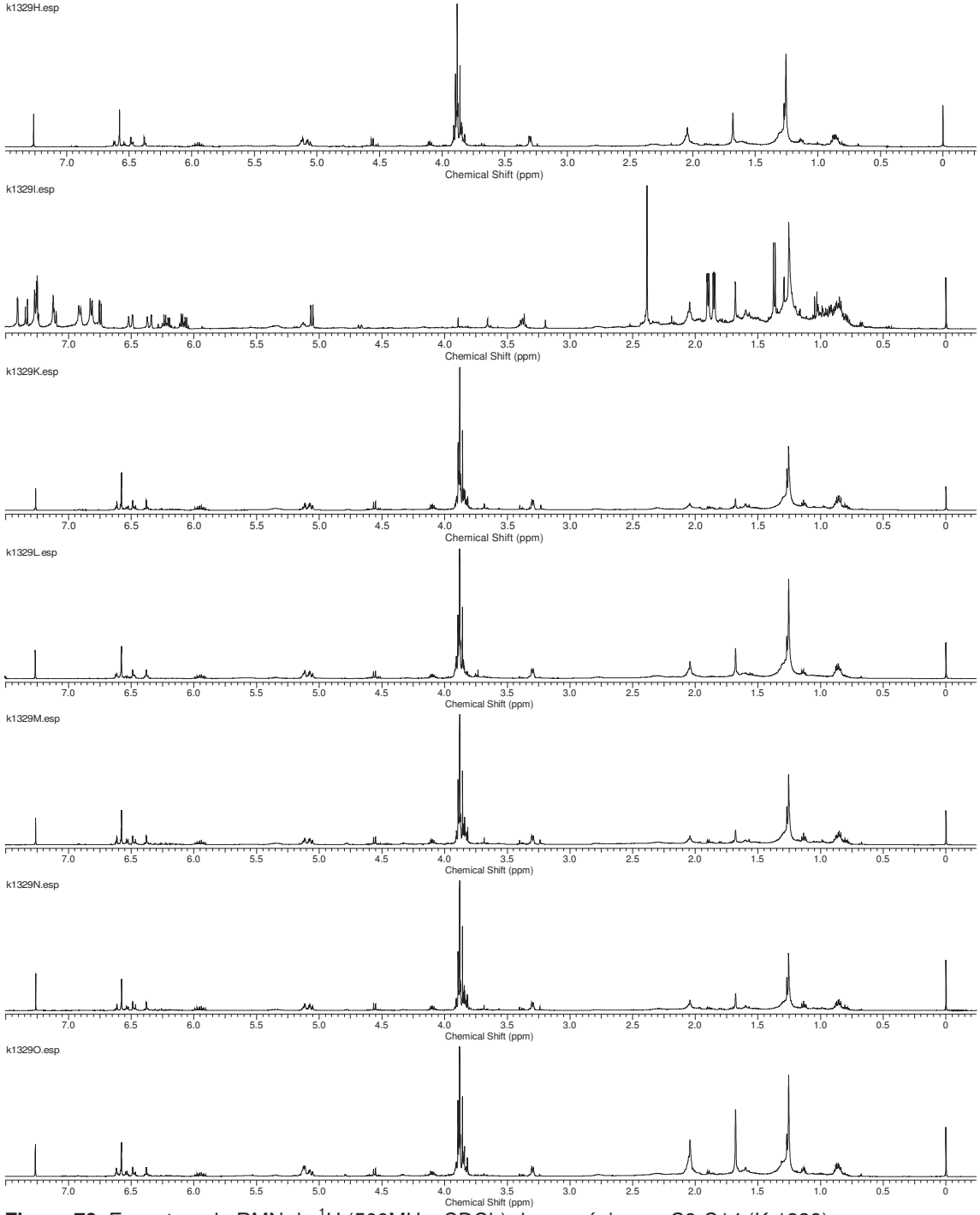


Figura 79. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens C8-C14 (K-1329).

Acquisition Time (sec)	4.0894	***Comment***	Nidia K-1316A FO T=300K DRX500 03/Mar/2011 (53345)	***Date***	18 Mar 2011 13:17:52
File Name	C:\Documents and Settings\Nidia\Desktop\PCA P solm2\k-1316\k-1316A\k-1316A_001000fid			***Frequency (MHz)***	500.13
Nucleus	1H	***Number of Transients***	128	***Original Points Count*** 32768	***Points Count*** 32768
Pulse Sequence	zg	***Solvent***	CHLOROFORM-d	***Spectrum Offset (Hz)*** 3486.7642	***Sweep Width (Hz)*** 8012.82
Temperature (degree C)	26.600				

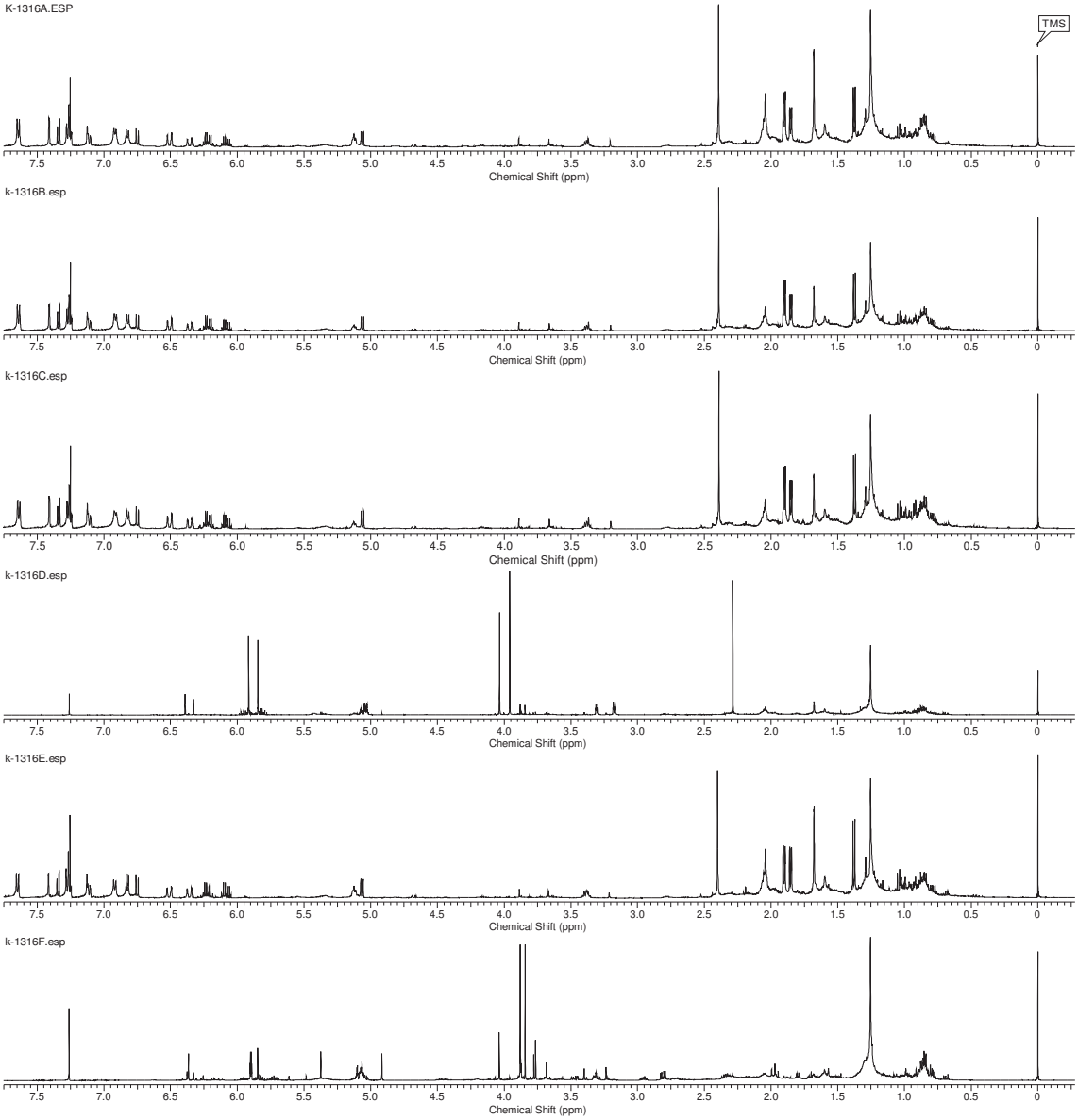
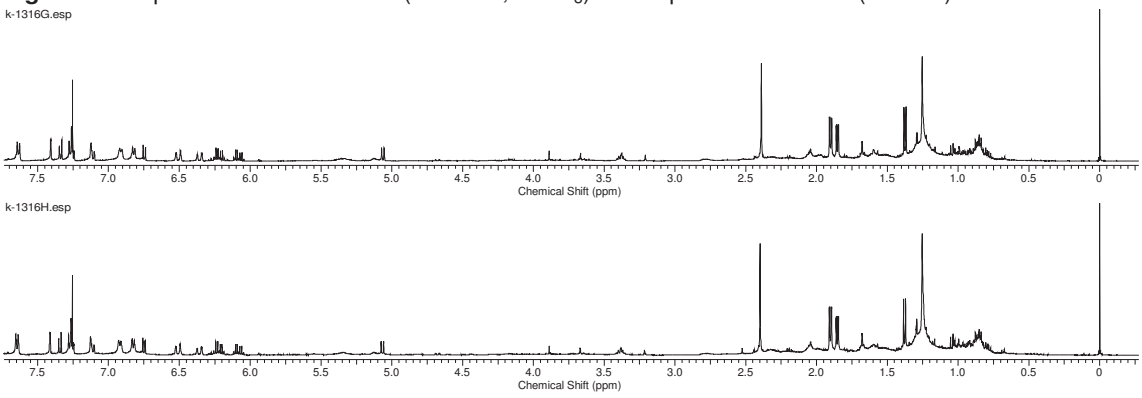


Figura 80. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens D1-D6 (K-1316).



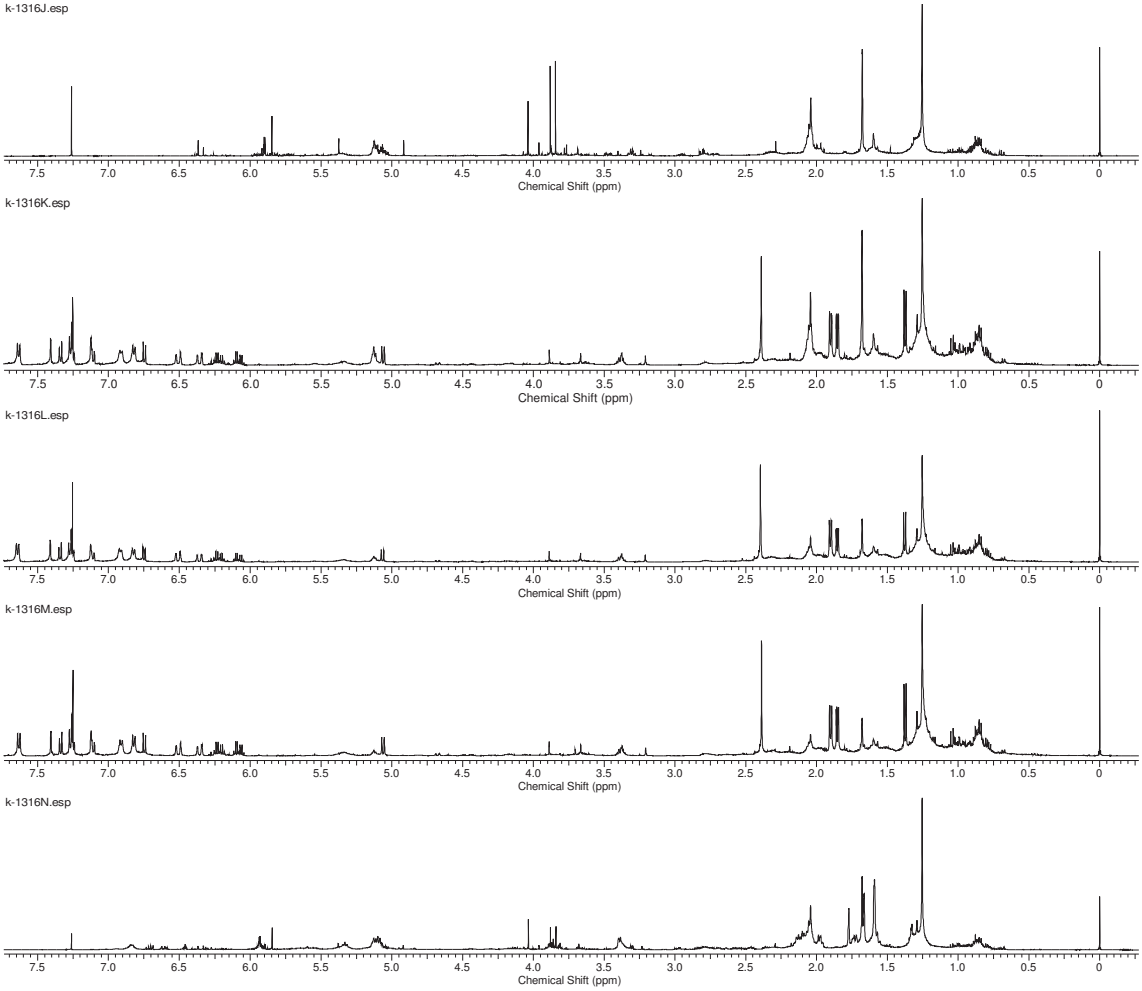


Figura 81. Espectros de RMN de ^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) dos espécimens D7-D13 (K-1316).

Apêndice 2

Espectros bidimensionais dos extratos brutos (fração $CHCl_3$) de espécimens de *P. solmsianum* empregados no estudo de variabilidade química.

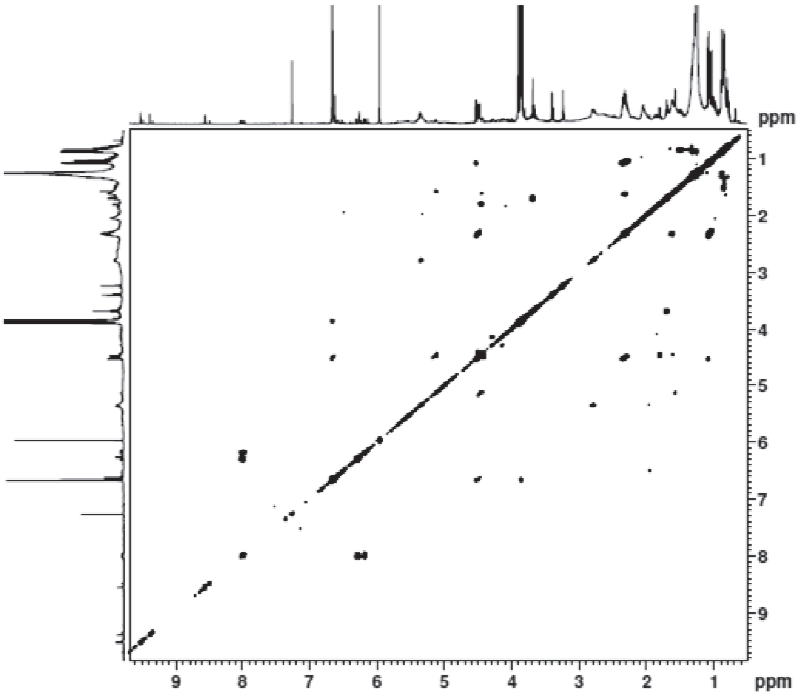


Figura 82. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384).

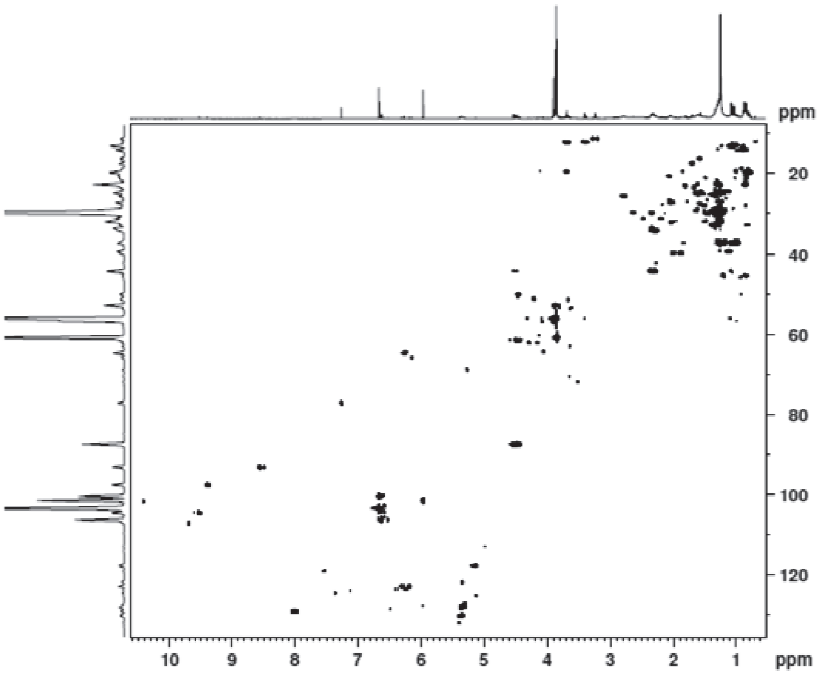


Figura 83. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384).

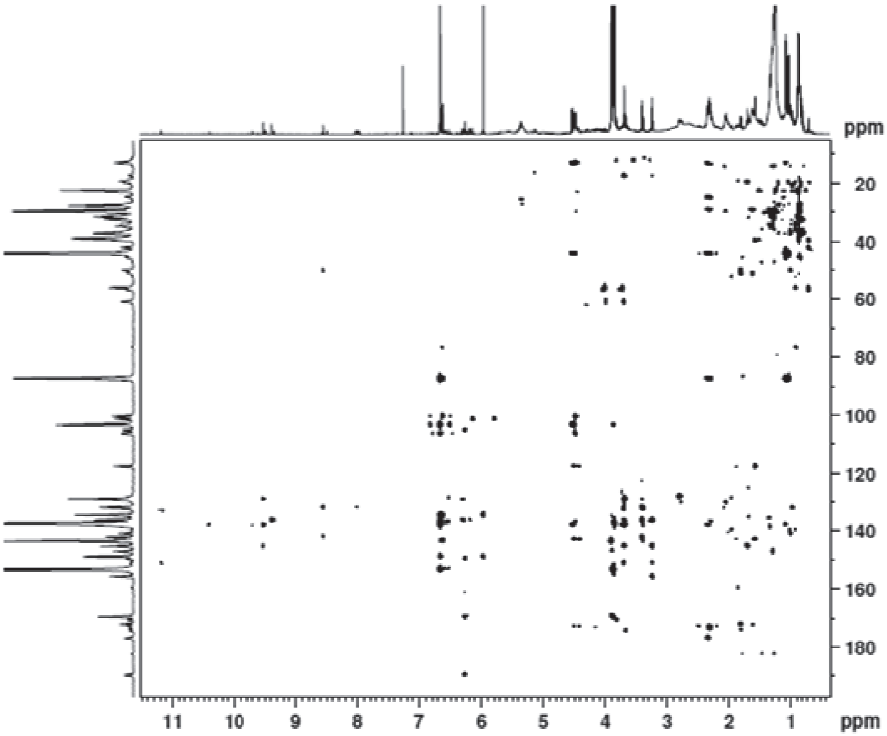


Figura 84. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen A2 (K1384).

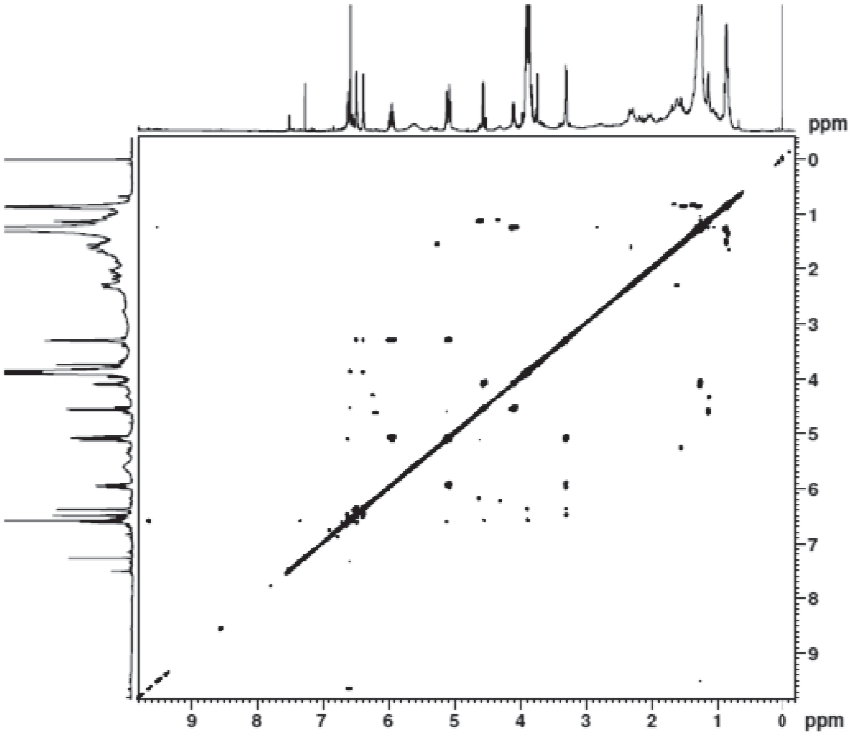


Figura 85. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen C1 (K1329).

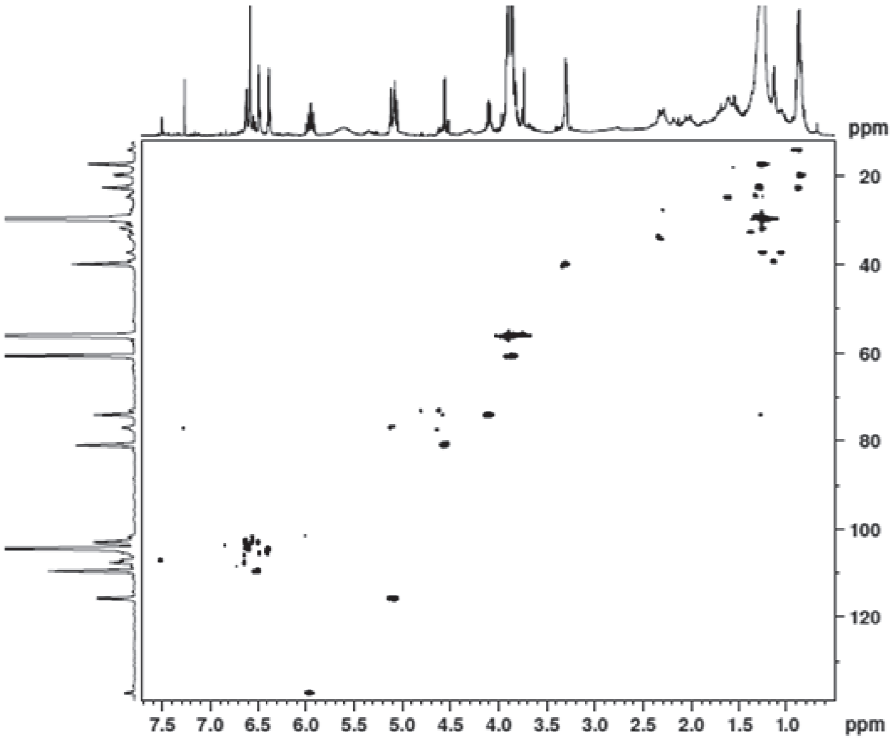


Figura 86. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen C1 (K1329).

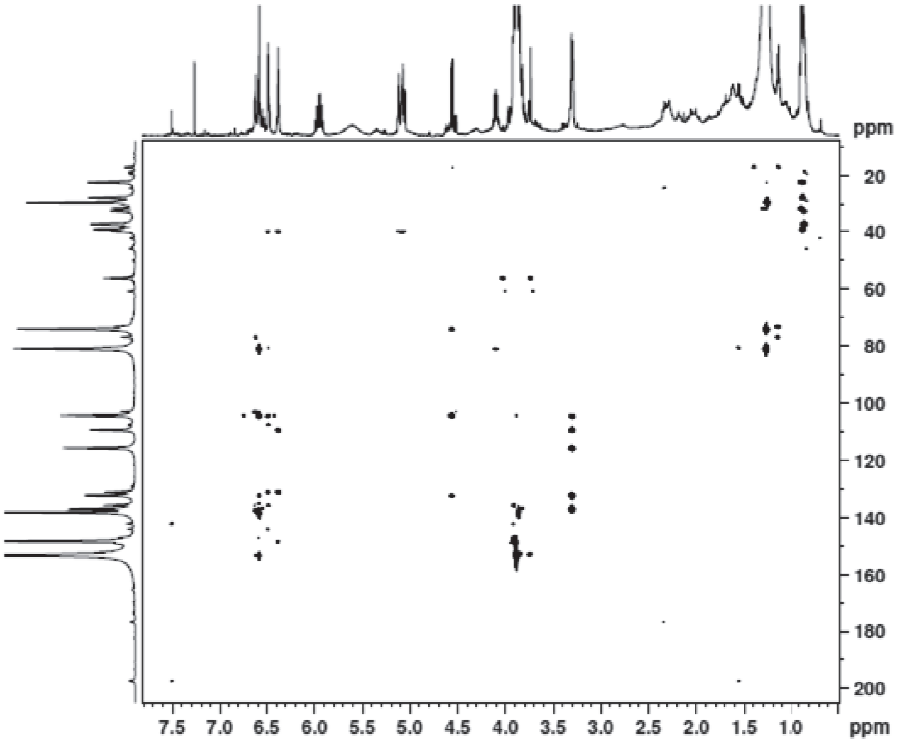


Figura 87. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen C1 (K1329).

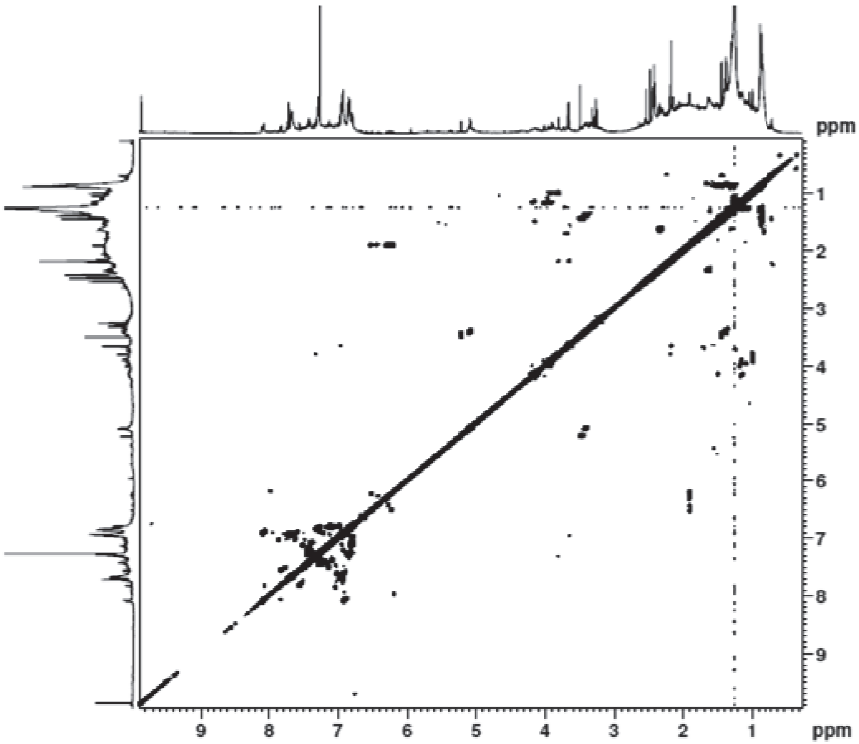


Figura 88. Espectro COSY (500MHz, $CDCl_3$) do espécimen D1 (K1316).

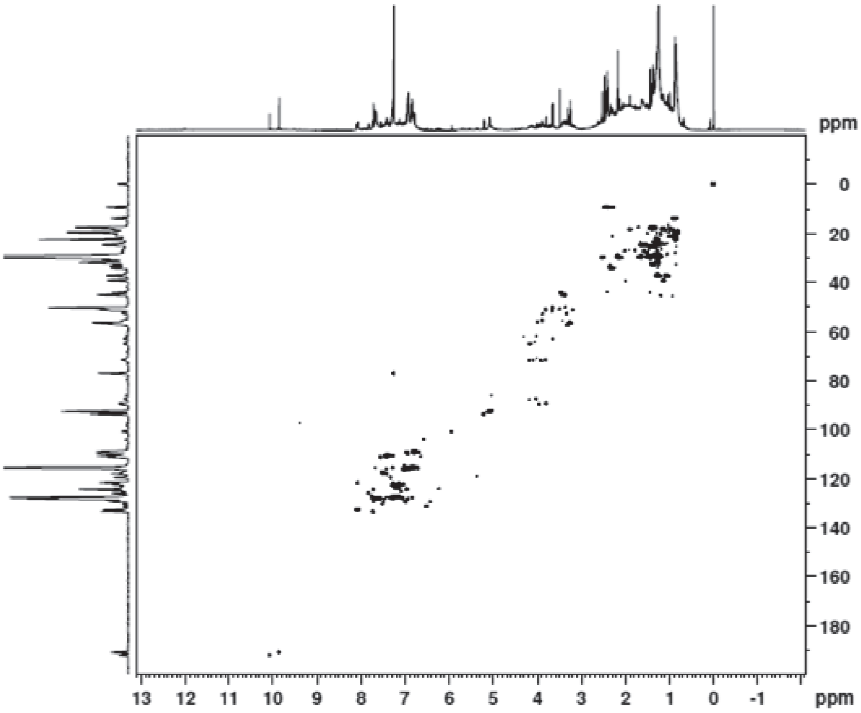


Figura 89. Espectro HSQC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen D1 (K1316).

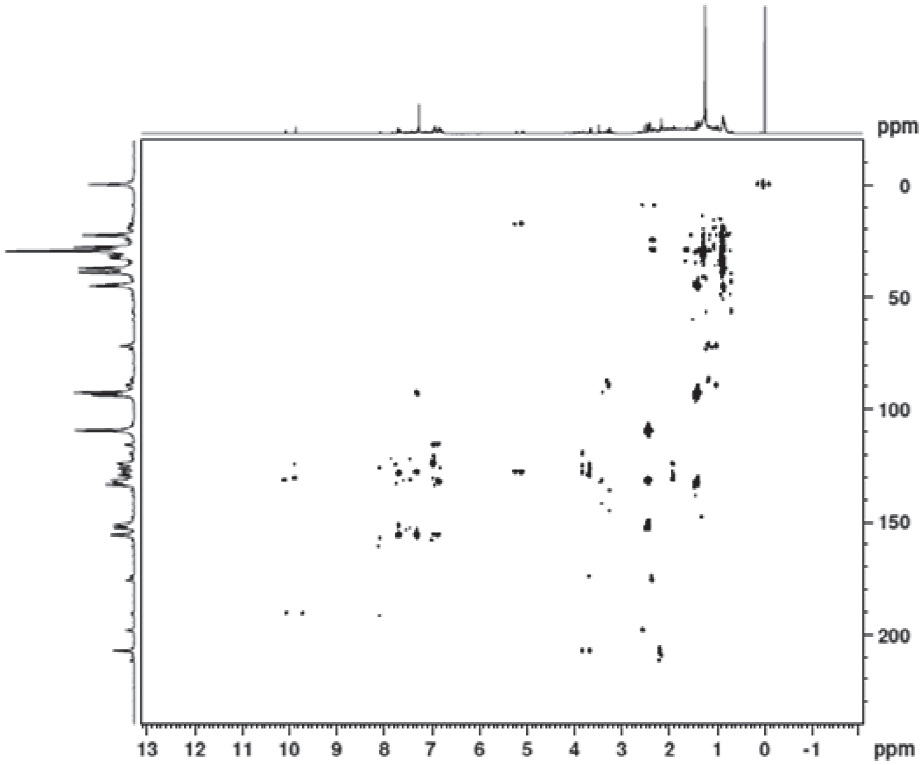


Figura 90. Espectro HMBC (500MHz, $CDCl_3$) do spécimen D1 (K1316).

Apêndice 3

Análise por PCA dos extratos brutos (fração hidroalcoólica) dos espécimens de *P. solmsianum* utilizados no estudo das espécies de *Piper* com ITS analisado Espectros.de RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O) dos extratos brutos (fração hidroalcoólica) das folhas de espécimens de *P. solmsianum* e análise de PCA das espécimens utilizados no estudo de variabilidade química e genética.

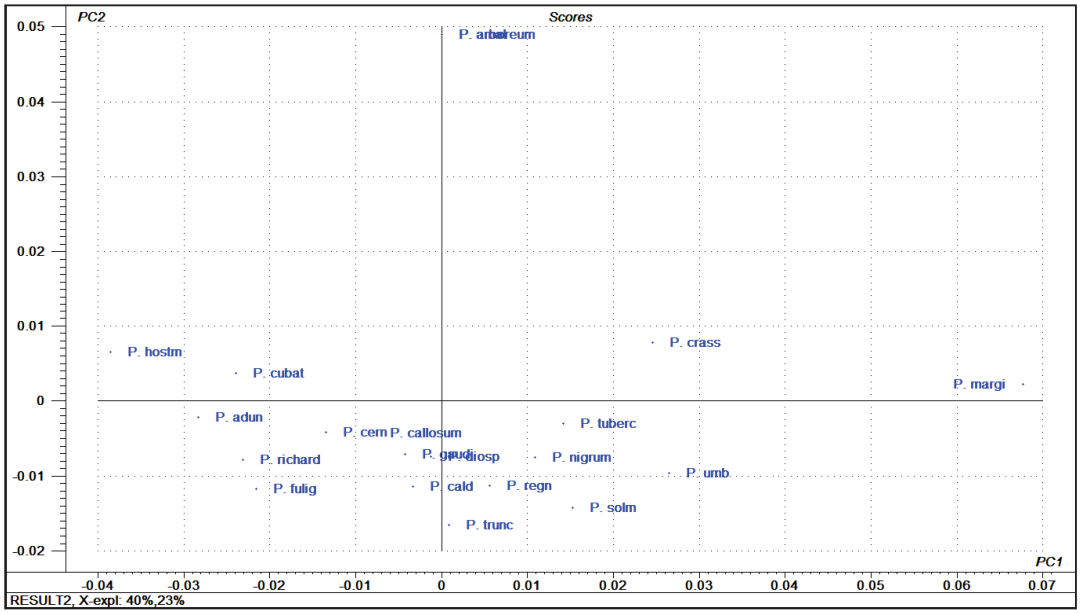


Figura 91. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração hidroalcoólica) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética.

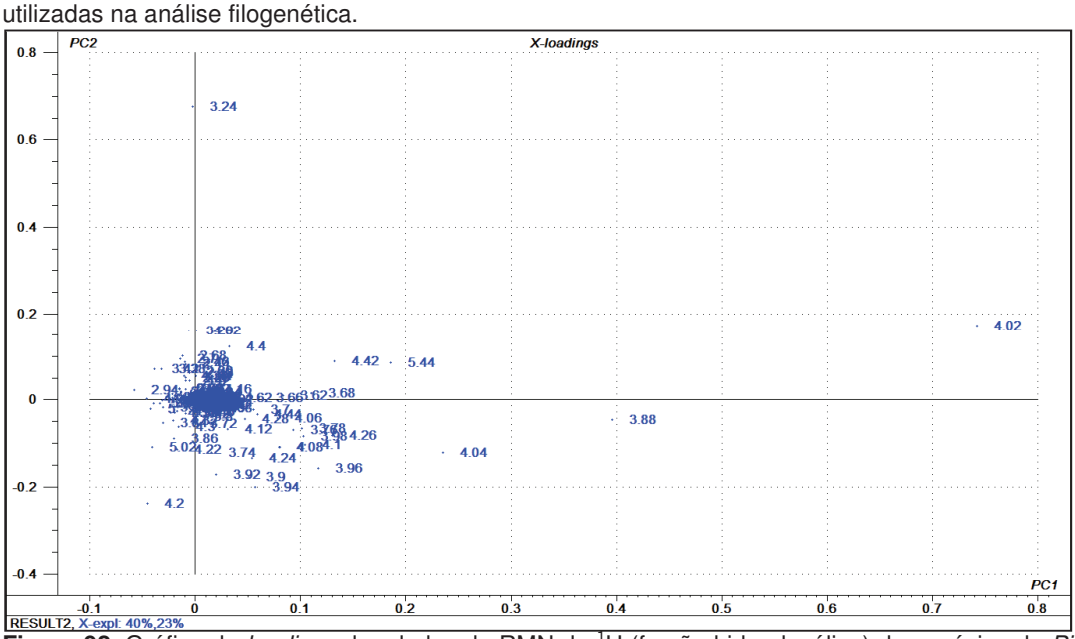


Figura 92. Gráfico de *loadings* dos dados de RMN de ^{1}H (fração hidroalcoólica) de espécies de *Piper* utilizadas na análise filogenética.

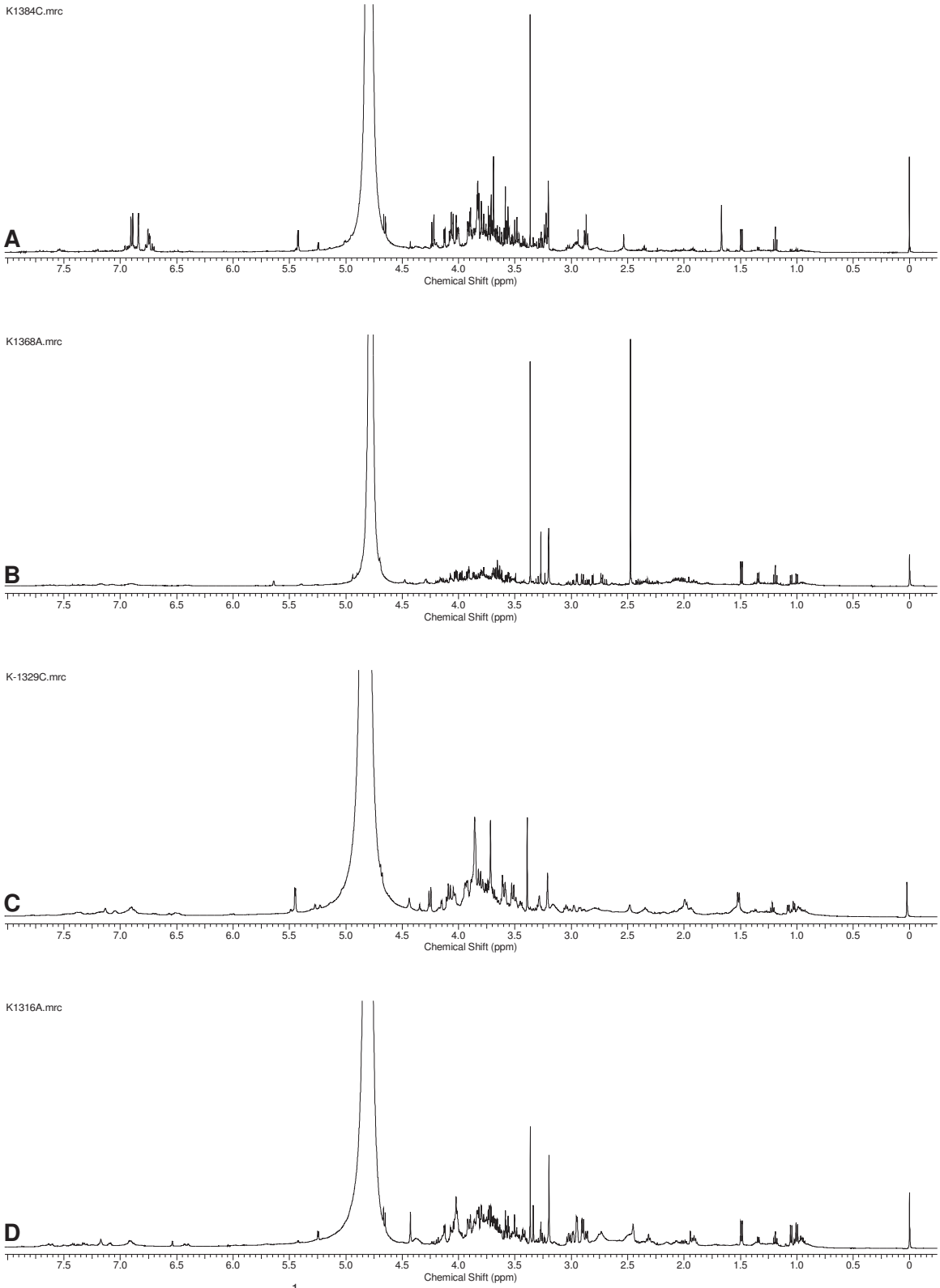


Figura 93. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O) dos extratos brutos (fração aquosa) das folhas de espécimens de *P. solmsianum* coletadas em diferentes localidades. **A**: K-1384 (CUASO, SP); **B**: K-1368 (Ubatuba, SP); **C**: K-1329 (Teresópolis, RJ); **D**: K-1316 (Itatiaia, RJ).

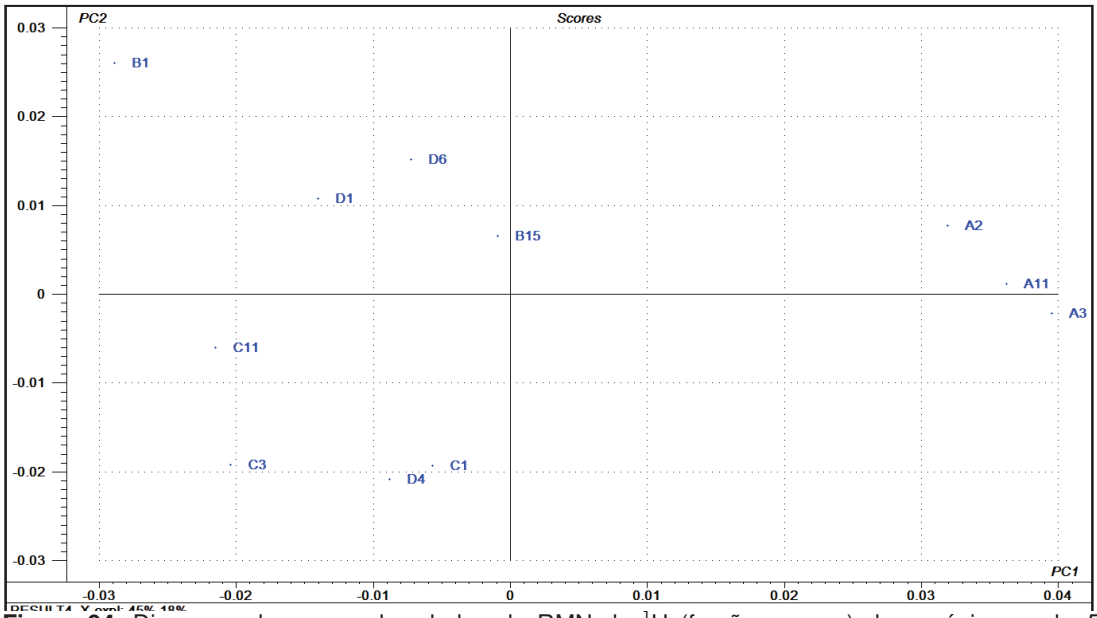


Figura 94. Diagrama de *scores* dos dados de RMN de ^{1}H (fração aquosa) de espécimens de *P. solmsianum*. Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ).

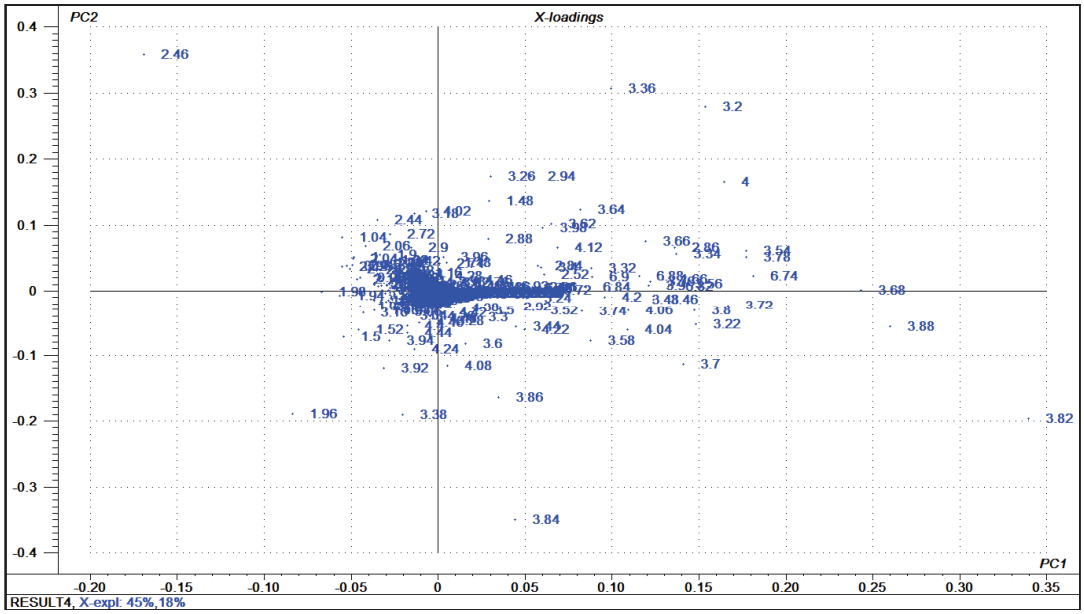


Figura 95. Gráfico de *loadings* (II) dos dados de RMN de ^{1}H (fração aquosa) de espécimens de *P. solmsianum*. Sigla e local de procedência: **A:** K-1384 (São Paulo, CUASO-SP). **B:** K-1368 (Ubatuba, SP). **C:** K-1329 (Teresópolis-RJ). **D:** K-1316 (Itatiaia-RJ).

Apêndice 4

Análises filogenéticas baseadas nas sequências de *psbA-trnH* e de ITS com espécies novas de *Piper* adicionadas à análise.

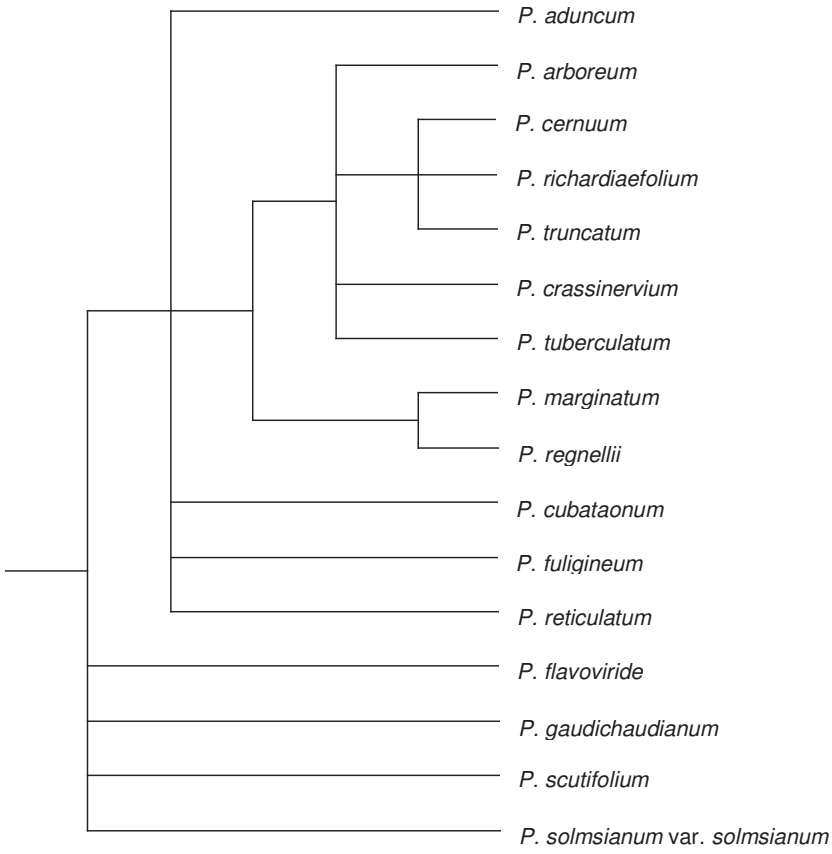


Figura 96. Árvore mais parcimoniosa baseada em *psbA-trnH* de 16 sequências de *Piper*. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Matriz com 314 caracteres. Comprimento da árvore = 62; *Bootstrap* replication = 1000; Busca: heuristica; Número de caracteres informativos: 42; Caracteres constantes: 263; Índice de consistência (CI) = 0,9032; Índice de homoplasia (HI) = 0,0968, Índice de retenção (RI) = 0,6667; Algoritmo Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR). Score das melhores árvores encontradas: 62.

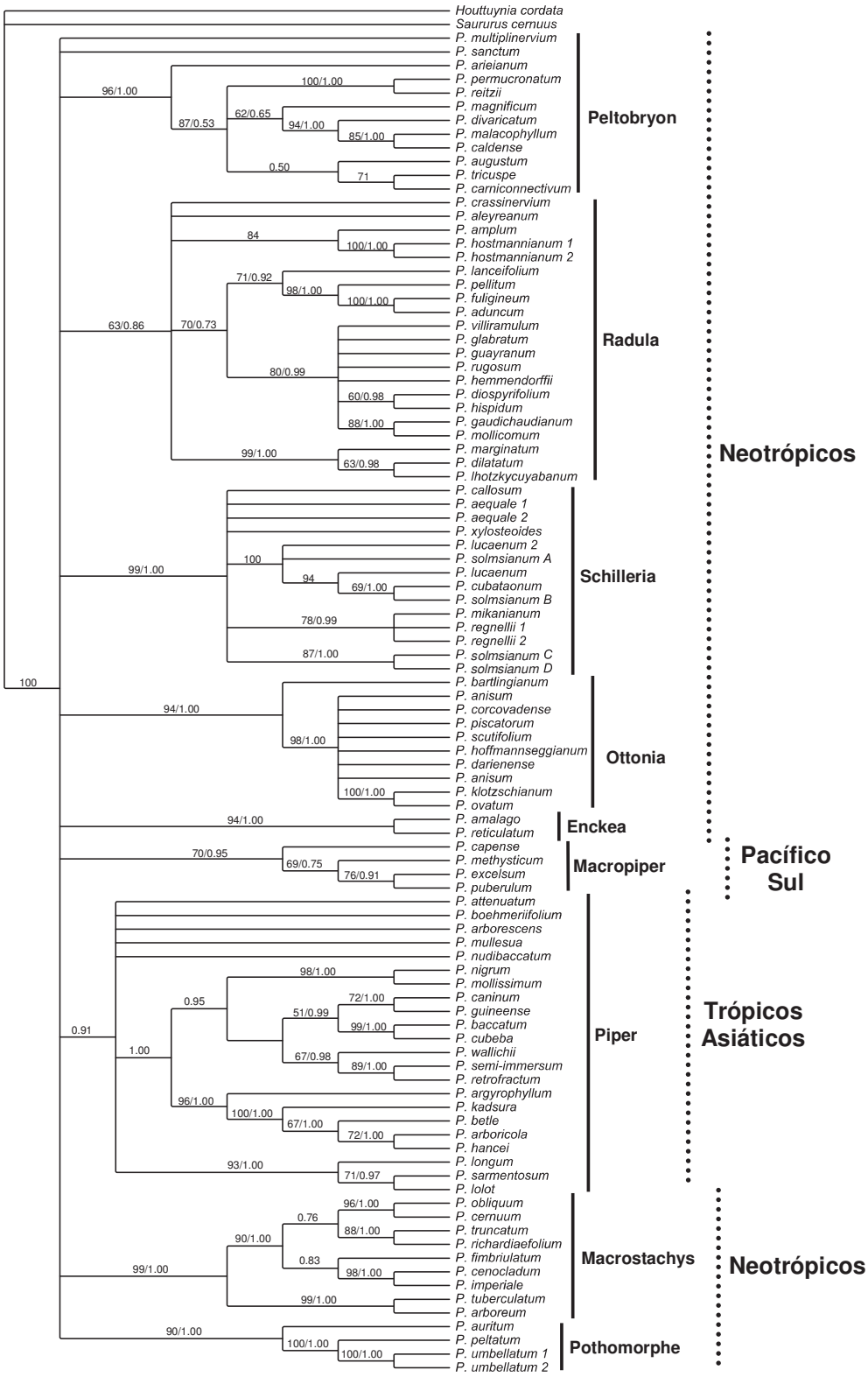


Figura 97. Árvore mais parcimoniosa baseada em ITS de sequências de *Piper*. *Saururus* e *Houttuynia* foram usadas como grupos externos. Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Dígitos abaixo dos ramos: valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número de caracteres totais da matriz: 716, dos quais 116 foram eliminados.

Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*: 1000; comprimento da árvore = 1603 passos; índice de consistência (CI) = 0,4716; índice de homoplasia (HI) = 0,528; índice de retenção (RI) = 0,746; algorítimo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 297; 185 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1603. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportion invariant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 133000. Barras verticais indicam seções do gênero *Piper* (Jaramillo and Manos, 2001).

ANEXO 1

Desenvolvimento e a caracterização de marcadores moleculares microssatélites (SSR) em Genética de Populações de *Piper solmsianum.* Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto Agronômico de Campinas, em colaboração com a doutoranda Paula F. Lima sob orientação do Dr. Carlos Colombo.

1. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES DE MICROSSATÉLITES (SSR)

1.1. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites

1.1.1. Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites

Para construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites foi utilizado o protocolo descrito por Billotte e colaboradores (BILLOTTE et al., 1999), com modificações (Figura 1).

Aproximadamente 6 ug de DNA total de um único genótipo de *P. solmsianum* foram digeridos com 50 U da enzima *Rsa*I (10 U/uL) e incubados a 37°C durante 18 horas. Após digestão, adaptadores *Rsa*21 (5' - CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA - 3') e *Rsa*25 (5' - TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A – 3') foram ligados aos fragmentos digeridos utilizando 4U da enzima T4 ligase. A reação de ligação foi realizada em volume final de 50 µL contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,8, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 4 µM de *Rsa*21 e 6 µL de DNA digerido seguida de incubação a 20°C durante 2 horas.

A fim de se obter maior quantidade do DNA para posterior seleção, os fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores foram amplificados utilizando um *primer* complementar ao adaptador *Rsa*21. A purificação do produto de amplificação foi realizada utilizando-se *Quiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

1.1.2. Seleção dos fragmentos contendo microssatélites

O processo de enriquecimento e seleção dos fragmentos contendo sequências microssatélites (SSR) foi realizado por meio da hibridização de oligonucleotídeos conjugados a biotinas biotIIIIII(CT)8 e biotIIIIII(GT)8, complementares a seqüências repetitivas GA e CA.

Os fragmentos contendo tais repetições foram recuperados por estreptavidina ligada a microesferas magnéticas utilizando o kit *Streptavidine-Magnesphere Paramagnetic Particles* (Promega) de acordo com instruções do fabricante. A fração enriquecida contendo

os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foi incubada a 95°C por 15 min para desnaturação da dupla fita. O DNA desnaturado foi hibridizado com os oligonucleotídeos marcados com as biotinas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 min à temperatura ambiente sob suave agitação. Após a incubação, foram realizadas lavagens e os fragmentos selecionados foram recuperados através de lavagem com 250 µL de água ultra pura e armazenados a - 20°C (BILLOTTE et al., 1999).

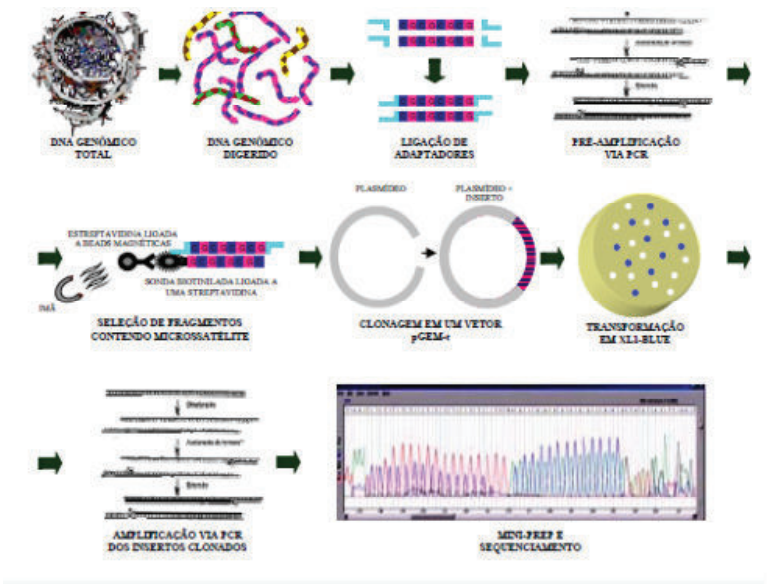


Figura 1. Esquema representativo das etapas de construção da biblioteca enriquecida com microssatélites (BILLOTTE et al., 1999; NUCCI et al., 2007).

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos à amplificação via reação de PCR utilizando um primer complementar ao adaptador *Rsa*21 em volume reacional final de 100 µL contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de *Rsa*21, 3 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Science) e 20 µL da suspensão de fragmentos selecionados com desnaturação inicial de 95°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, seguido de extensão final a 72°C por 8 min.

O produto final foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X corado com *SYBR Safe* (Invitrogen). Após a amplificação, o produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM-T *Easy Vector System* (Promega) e transformado em célula competente *E. coli* linhagem TOP 10. As colônias contendo os insertos (colônias brancas) foram transferidas para meio líquido 2YT-HMFM (1,6% triptona, 1% extrato e levedura, 0,5% NaCl, 0,0076% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,045% citrato de sódio, 0,09% $(NH_4)SO_4$, 4,4% glicerol, 0,18% KH_2PO_4 e

0,7% K_2HPO_4) contendo 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de ampicilina em placas tipo Elisa. Os clones foram incubados a 37°C por 18 h e acondicionadas em - 80°C.

A reação de transformação foi realizada com 100 µL de célula competente, 8 µL de vetor e 32 µL de tampão de transformação, contendo 100 mM de KCl, 30 mM $CaCl_2$ e 50 mM $MgCl_2$, seguido de incubação em gelo por 5 min e choque térmico a 37°C por 10 min. Em seguida, 1 mL de meio líquido LB (0,1% triptona, 0,05% extrato de levedura e 0,1% de NaCl) foi adicionado a mistura, que permaneceu a 37°C por 1 h. A suspensão foi plaqueada em meio de cultura sólido LB contendo 10$mg \cdot mL^{-1}$ de ampicilina, 60 µL de IPTG 20% e 90 µL de X-Gal 2% e incubada a 37°C durante 18 horas para o crescimento de colônias. Para manutenção, clones positivos (colônias brancas) foram repicados para meio de cultura líquido LB com a ajuda de palitos estéreis e incubados a 37°C *overnight* em estufa para o crescimento de colônias. Após esse período as placas permaneceram a - 20°C por 30 min sendo posteriormente acondicionadas a - 80°C em glicerol 50% (p/v).

1.1.3. Seleção e Sequenciamento dos clones positivos

Com o objetivo de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, colônias individuais foram checadas através de amplificação com o *primer Rsa*21. Para extração do DNA plasmidial, 192 colônias recombinantes foram repicadas para meio líquido LB contendo ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação de 300 rpm durante 22 horas. O procedimento de extração empregado foi o de lise alcalina, que consiste na adição de detergente SDS em meio fortemente alcalino. O DNA plasmidial extraído (Figura 2) foi precipitado com KOAc e etanol, seguido de lavagens com etanol 70% e ressuspenso em água ultra pura. A seguir, o perfil do DNA plasmidial foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo corante *SYBR Safe* (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 2).

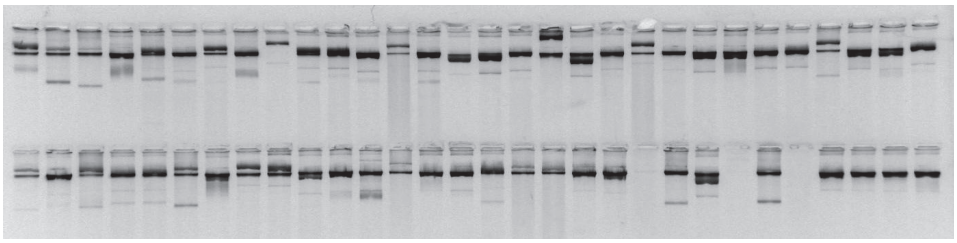


Figura 2. Gel de agarose 1% ilustrando o perfil do DNA plasmidial contendo insertos enriquecidos de microssatélites de *P. solmsianum*. Os diferentes tamanhos das bandas correspondem às diferentes conformações que o DNA plasmidial pode assumir.

As 192 reações de seqüenciamento foram realizadas em placa em volume final de 10 µL contendo 2 µl de tampão *Save Money* (5 mM $MgCl_2$, 200 mM Tris-HCl pH 9), 5 µM de *primer* universal SP6, 150 ng de DNA plamidial e 0,4 µL de *BigDye Terminator v.3.1* (Applied Biosystems), com desnaturação inicial a 96°C por 2 min, 26 ciclos a 96°C por 45 s, 50°C por 30 s, 60°C por 4 min. A seguir, os ddNTPs não incorporados foram eliminados através de precipitação com 200 µL de Etanol 80% por 20 min seguido de centrifugação a 4000 rpm por 45 min. Esse procedimento elimina possíveis interferentes ou excessos de reagentes que não foram incorporados durante a reação de seqüenciamento. Após seco ao abrigo da luz, o DNA de todos os clones foi ressuspenso em 4 µL de Formamida deionizada e desnaturado a 95°C por 5 min. A seguir foram submetidos a eletroforese capilar em sequenciador automático *3100 DNA Analyser* (Applied Biosystems) (Figura 3) no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG-Unicamp).

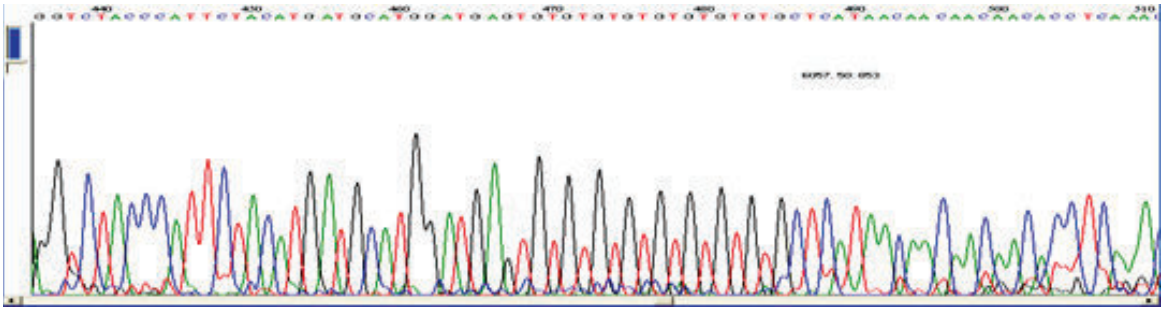


Figura 3: Eletroferograma representativo do clone B04 contendo microssatélite de repetição $(GT)_8$.

1.1.4. Análises das seqüências e desenho dos *primers* microssatélites

Cada sequência obtida é chamada de *read.* Inicialmente, 192 *reads* foram analisados quanto ao tamanho da sequência. O resultado foi bastante satisfatório, uma vez que o seqüenciamento exibiu sequências longas, com até 600 pb íntegros. A seguir, de cada *read* foram removidas as sequências relativas ao adaptador e ao vetor, restando apenas a região do inserto. Esse procedimento é chamado de *trimmer* e foi executado por meio do programa *VecScreen* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html).

Em seguida, cada sequência teve sua região microssatélite identificada no programa *Gramene* (http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool). Nesta etapa, foi realizada a busca de regiões microssatélites com no mínimo cinco repetições. Das 192 sequências analisadas, 53 (28%) continham ao menos uma região microssatélite.

A classe majoritária de SSR encontrados foram os perfeitos (84,2), seguido de compostos (10,5%) e interrompidos (5,3%) (Tabela 1). Os motivos dinucleotídeos (95%)

representados principalmente pelos motivos CA (31%) e GT (30%) sobressaiu em relação aos demais tri e tetranucleotídeos (Figura 4).

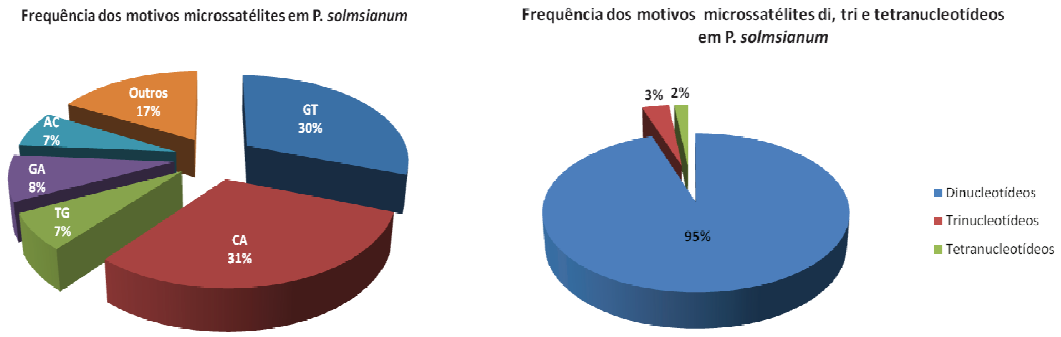


Figura 4: Frequência dos motivos di, tri e tetranucleotídeos em *P. solmsianum.*

Com isso, apenas arquivos do tipo "FASTA" contendo seqüências de interesse e com boa qualidade foram obtidos. Estas seqüências foram então alinhadas pelo software *CodonCode* para identificação de *contigs* e *singlets*, evitando-se desta forma o desenho de pares de *primers* redundantes. Isso permitiu identificar que dentre as 53 sequências originais, sete possuíam 100% de identidade, ou seja, eram as mesmas sequências. Com a exclusão das sequências redundantes foram obtidas 41 sequências de boa qualidade e com alvo microssatélites para desenho de *primers* e posterior amplificação via PCR.

Utilizando o programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) (ROZEN, et al., 2000) foram desenhados 19 pares de *primers* SSR das 41 sequências obtidas na espécie *P. solmsianum* (Tabela 1).

Para a obtenção dos locos SSR foram levados em consideração alguns parâmetros, como: (*i*) tamanho dos *primers* variando de 18 < 20 < 22 pb, (*ii*) temperatura de anelamento entre 56 < 58 < 60°C, com diferença máxima de 3°C, (*iii*) conteúdo CG entre 40 < 50 < 60%, (*iv*) concentração de cátions monovalentes de 50 nM. Já a probabilidade de formação de estruturas secundárias como *hairpins* e *loops* foi verificada através do programa *GeneRunner* versão 3.05 (Hastings Software Inc.).

As sequências de todos os locos SSR foram submetidas ao GenBank para aquisição de um localizador de sequência (código GenBank, Tabela 1) de nucleotídeos no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta BankIt.

Tabela 1. Características dos 19 *primers* microssatélites gerados a partir da biblioteca enriquecida para *P. solmsianum*. À extremidade 5' *forward* de cada *primer* foi adicionada a sequência do *primer* M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') para utilização do sistema de amplificação com fluorescência em *4300 DNA Analyzer* (LI-COR).

Primer	Repeti-ção	Código *Genbank*	Classificação	Sequência 5'—3'	Alelos (pb)
Psol1	$(GT)_7$	JQ924476	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACAGTCCTAACGGACCTGTGAA R GAGGTGTTGTTGATGTGAGC	167
Psol2	$(GT)_8$	JQ924477	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACCCTAACGGACCTGTGAGGTA R'TCGATTTACGTGCCGAGT	230
Psol3	$(TG)_{12}$	JQ924478	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACGCGGATCTTACCAGAATCAG R GAGTAGCCTTTGGTTGTTGC	256-272 (8)
Psol4	$(GT)_9(GA)_{12}$	JQ924479	Composto	F CACGACGTTGTAAAACGACGCTTGTTCTTGTGGGAAACC R CAGGAAAACATACCGTCGTC	*na*
Psol5	$(CA)_{13}/(AC)_8$	JQ924480	Composto/Interrompido	F CACGACGTTGTAAAACGACACCTCTGTCATTTCACCTTG R GGGTGTGTTTTTAGAATGGA	130
Psol6	$(CT)_9(CA)_8$	JQ924481	Composto	F CACGACGTTGTAAAACGACCTCTTGGCAAAAGTCACCTG R ATCCCATACCGATCTCCTTC	254-266 (6)
Psol7	$(TG)_{10}$	JQ924482	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACTTGCTTACGCCTGGACTAAC R CAAGATCTGAGTCCCCAGTG	260
Psol8	$(GT)_7$	JQ924483	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACGGCAGATCAAGCTGAGAGAA R GGATTTGGTGGTGGAGTGT	228
Psol9	$(AC)_8$	JQ924484	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACGGAACCCACGAGTTTCTTG R GGGGTCCTTTTTACGTTGAG	180-202 (6)
Psol10	$(TG)_9$	JQ924485	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACCAGACGGATTCCCACTGAT R GGACTTGTAACCCATCGAGA	228-238 (5)
Psol11	$(TG)_{10}$	JQ924486	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACTTATTTGGTTGGAGCTGTGTG R CCACGGTGGGTTATCACAC	106-118 (6)
Psol12	$(GA)_{10}$	JQ924487	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACCCCTCGAACGAGAGAGAAG R ATGGCCAGGGGAGTAAGATA	190
Psol13	$(TC)_7$	JQ924488	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACACGCAAAGTATTGCCTTAGC R TTTAACCATCTTTCGGTCCA	240
Psol14	$(GT)_7$	JQ924489	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACGCTCAACTCCGGAATCTACA R GTATGCGTGCCGAGTGTTTA	190
Psol15	$(GT)_9$	JQ924490	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACCGCGGACTAACCAGAGTTAC R GCCACAAAAACCCACTCA	145-151 (2)
Psol16	$(GT)_7$	JQ924491	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACGAAGTCCTAACGGACCTGTG R GAGGTGTTGTTGATGTGAGC	166-214 (3)
Psol17	$(CA)_7$	JQ924492	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACTATTCCCATGCGAGATGC R CGGCATAACCACTAAACCAC	392-430 (7)
Psol18	$(GT)_7$	JQ924493	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACACTGTTGTGGACCTTGTTGC R TGTATTAGGCCCCATCGAC	152-166 (2)
Psol19	$(CA)_7$	JQ924494	Perfeito	F CACGACGTTGTAAAACGACCGCGTGATGCATGCTTAT R GCTCAACTCCGGAATCTACA	305

( ) Amplitude dos alelos.

1.2. Caracterização de Marcadores Microssatélites

Para a caracterização dos marcadores de microssatélites foram amostrados 72 indivíduos de *P.solmsianum* pertencentes a populações coletadas em quatro diferentes localidades: população **A** (K-1384 - Bosque da CUASO, São Paulo, SP), população **B** (K-1368 - Ubatuba, SP), população **C** (K-1329 - Teresópolis, RJ) e população **D** (K-1316 - Itatiaia, SP). O DNA dos indivíduos foi isolado pelo método do CTAB, como descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996). Após extraído, o DNA foi quantificado, em gel de agarose 1%, e submetido à eletroforese horizontal sob tensão de 3,5 $V \cdot cm^{-1}$ por 2 h em tampão TBE 0,5X. Em seguida, o gel contendo os indivíduos foi corado em solução *SYBR Safe* (Invitrogen) e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta (Figura 5).

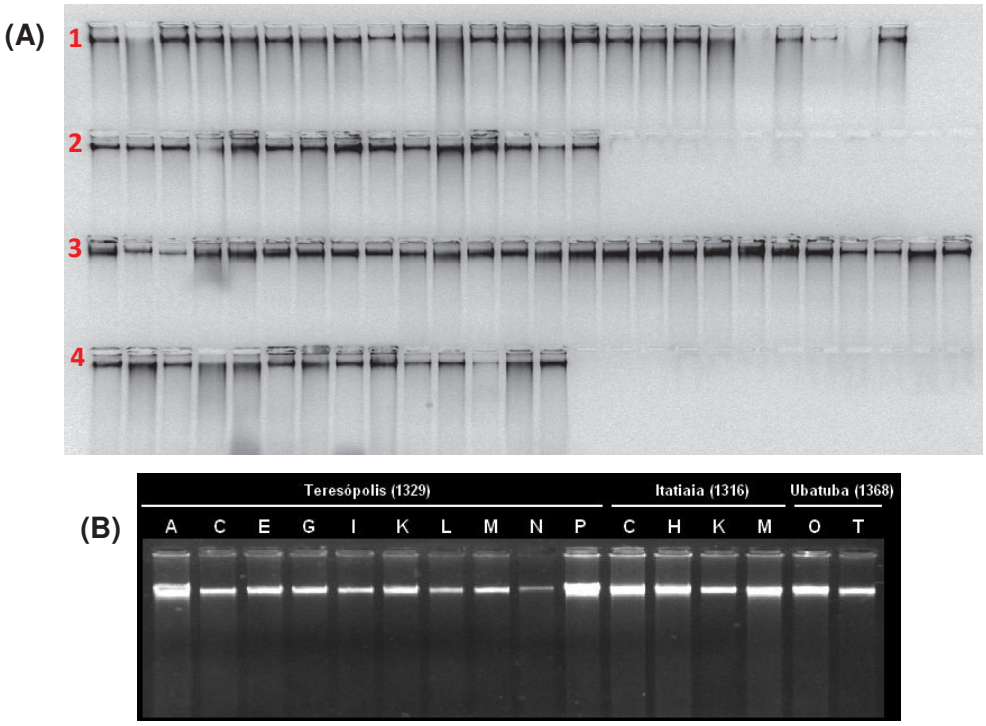


Figura 5. (A) Perfil qualitativo do DNA genômico dos 78 indivíduos de *P. solmsianum* distribuídos em quatro coletas. Linha 1 – Coleta Bosque Cidade Universitária USP (SP); Linha 2 – Coleta Itatiaia (RJ); Linha 3 – Coleta Ubatuba (SP) e Linha 4 – Coleta Teresópolis (RJ). **(B)** Perfil qualitativo do DNA genômico dos 16 indivíduos de *P. solmsianum* reextraídos.

Na região 5' dos 19 primers *forward* (F) dos locos SSR adotados para o estudo foi adicionada uma seqüência de nucleotídeos do plamideo pUC/M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC -3'), segundo David e colaboradores (1993). As seqüências

foram marcas com inflorecência *infrared dye* (IRDye), com comprimentos de onda de 700nm e 800 nm, para utilização em equipamento da Li-cor Biosciences - Corporate.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 20 µL contendo 30 ng de DNA total, tampão de reação com 10 mM de Tris-HCl e 50 mM de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 0,25 µM de cada dNTP, BSA 0,5 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$, 0,16 µM de *primer forward* (F) e 0,2 µM de *primer reverse* (R), 0,3 µM de *primer* M13 IR700 ou IR800 (Tabela 2) e 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase. O ciclo total de amplificação foi realizado em termociclador programado para iniciar a 94°C por 5 min, 10 repetições a 94°C por 1 min, 58°C por 1 min (com decréscimo de 1°C por ciclo), 72°C por 1 min acrescido de 30 repetições a 94°C por 40 s, 48°C por 40 s, 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 10 min.

O perfil de amplificação qualitativo dos 19 locos SSR foi conduzido em gel de poliacrilamida 10% desnaturante (Sanguinetti et al., 1994), submetido à eletroforese vertical sob corrente de 18 $mA \cdot cm^{-1}$ durante 4 horas em tampão TBE 1X. Em seguida, o gel contendo os indivíduos foi corado com *SYBR Safe* (Invitrogen) e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta (Figura 6).

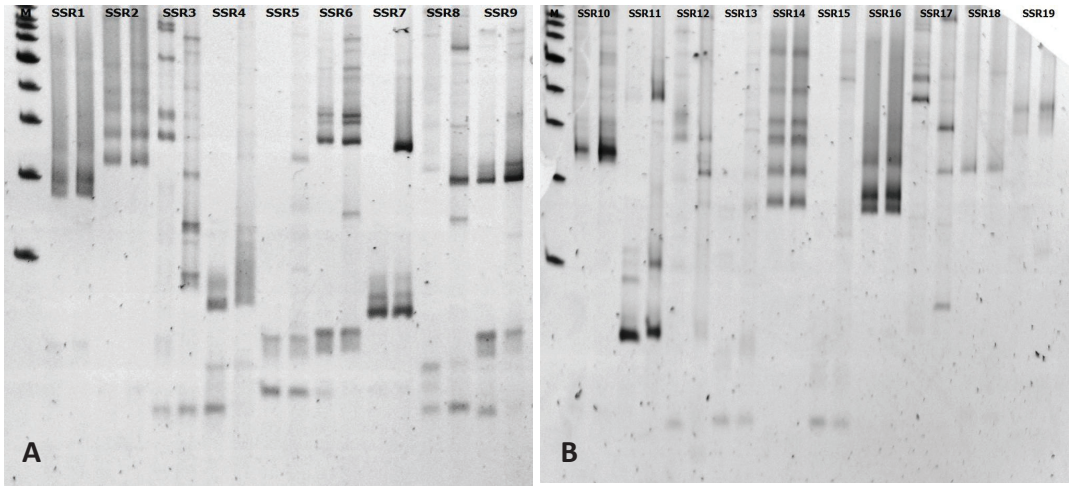


Figura 6. *Screening* dos 19 locos microssatélites (SSR) oriundos da biblioteca enriquecida para a espécie *P. solmsianum*. Marcador de peso molecular de 50 pb.

O *screening* dos locos SSR evidenciou perfil de amplificação para 14 deles sendo que mais quatro locos apresentam possibilidade de amplificação futura (Tabela 2) (TEMNYKH, et al., 2001).

Após serem checados qualitativamente foram selecionados 18 locos SSR (exclusão do loco *Psol4*) para separação em gel de poliacrilamida 7% desnaturante em sistema multiplex em sequenciador automático *4300 DNA Analyzer* (Li-Cor Biosciences - Corporate).

Tabela 2: Identificação dos locos SSR desenvolvidos para *P. solmsianum*, fluorescência utilizada, tamanho esperado dos alelos (em pares de base, pb) e resultado do *screening* (**+** : *primer* amplificado, **—** : *primer* não amplificado, **+/—**: possibilidade de amplificação do *primer*).

Loco SSR	Fluorescência M13	Tamanho (pb)	Amplificação
Psol1	IR700	167	+
Psol2	IR700	209	+
Psol3	IR700	242	+
Psol4	IR700	232	-
Psol5	IR700	226	+/-
Psol6	IR700	247	+
Psol7	IR700	194	+/-
Psol8	IR700	228	+
Psol9	IR700	164	+
Psol10	IR800	209	+
Psol11	IR800	106	+/-
Psol12	IR800	247	+
Psol13	IR800	240	+/-
Psol14	IR800	158	+
Psol15	IR800	242	+
Psol16	IR800	155	+
Psol17	IR800	374	+
Psol18	IR800	224	+
Psol19	IR800	268	+

1.3. Parâmetros Genéticos

A diversidade genética e as estatísticas F foram estimadas sob modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum. As freqüências alélicas, o número de alelos por loco (N_a), a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimadas utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2006). As análises de estatísticas F de Wright (F_{IS}, F_{ST} e F_{IT}) foram realizadas de forma não viesada utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 1995) de acordo com Cockerham e Weir (1993), onde F = F_{IT}, $\theta_P = F_{ST}$ e $f = F_{IS}$. As freqüências gênicas ou alélicas e genotípicas em cada loco foram submetidas a um teste de aderência (teste exato de Fisher) às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme definido por Weir (1996), utilizando o programa TFPGA (MILLER, 1997).

A estruturação genética foi verificada através das estatísticas G de Nei (1973, 1987) e calculadas pelo programa FSTAT versão 1.2 (GOUDET, 1995) estimando a heterozigosidade observada (H_O), diversidade gênica média (H_S), diversidade gênica total (H_T), diversidade gênica média (D_{ST}) e diferenciação genética entre as populações (G_{ST}). Os resultados foram interpretados como descrito pela estatística F de Wright por serem análogas as estatísticas G.

O programa *Structure* (PRITCHARD et al. 2000) foi utilizado para a obtenção da estrutura genética dos indivíduos de acordo com parâmetros como (*i*) 500.000 simulações de cadeia de Markov Monte Carlo, (*ii*) burn in (descarte inicial) de 500.000, (*iii*) modelo de ancestralidade se miscigenação e (*iv*) modelo de frequências alélicas correlacionadas. A simulações de agrupamento (K) variaram de 1 a 10 sendo o K mais provável estimado de acordo com o método de Evanno e colaboradores (2005). A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrograma gerado pela de matriz de distâncias genéticas de Nei (1973) e pelo critério de agrupamento UPGMA (SOKAL e MICHENER, 1958) através do programa NTSYS (ROHLF, 1989).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 19 locos SSR derivados da biblioteca genômica enriquecida, 14 foram otimizados dos quais nove (65%) revelaram polimorfismo (Tabela 3).

O polimorfismo gerado pelos locos foi avaliado através do número médio de alelos por loco polimórfico (N_a) e pelo *Polymorphism Information Content* (PIC) (Tabela 3). A média observada de número de alelos por loco foi de cinco, com máximo de oito (*Psol3*) e mínimo de dois (*Psol15 e Psol18*). O valor médio de PIC foi de 0,693 variando de 0,375 (para os locos *Psol15* e *Psol18*) a 0,861 (*Psol3*) sendo os mais polimórficos os locos *Psol3* e *Psol17.* De maneira geral, os valores de PIC foram de moderado a alto, o que confere aos locos desenvolvidos no presente trabalho um elevado nível de informação para estudos genéticos.

A variação da heterozigosidade observada foi de 0,030 para o loco *Psol17* a 0,609 para o loco *Psol10*. Já a variação da heterozigosidade esperada foi de 0,096 para o loco *Psol11* a 0,799 para o loco *Psol10* (Tabela 3). Já a variação dos parâmetros de diversidade genética obtidos para as quatro populações apresentaram heterozigosidade observada variando de 0,000 (Psol3) a 1,000 (Psol16) para a população **C** (Teresópolis, RJ), de 0,000 (Psol15) a 0,727 (Psol10) para a população **D** (Itatiaia, RJ), de 0,000 (Psol17) a 0,800 (Psol10) para a população **B** (Ubatuba, SP) e de 0,000 (Psol17) a 0,875 (Psol9) para a população **A** (Bosque da CUASO-USP, SP). Já a variação da heterozigosidade esperada

variou de 0,000 (Psol11) a 0,700 (Psol10) para a população **C** (Teresópolis, RJ), 0,212 (Psol11) a 0,749 (Psol18) para a população **D** (Itatiaia, RJ), 0,040 (Psol15) a 0,683 (Psol18) para a população **B** (Ubatuba, SP) e 0,000 (Psol17) a 0,716 (Psol3) para a população **A** (Bosque da CUASO-USP, SP) (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade e polimorfismo para caracterização dos oito locos microssatélites nos 72 genótipos de *P. solmsianum.*

Loco	N_a	H_O	H_E	*PIC*	*f*
*Psol*3	8	0,211	0,751	0,861	0,564
Psol6	6	0,353	0,726	0,810	0,120
*Psol*9	6	0,543	0,734	0,809	0,093
*Psol*10	5	0,609	0,799	0,768	- 0,021
*Psol*11	6	0,100	0,096	0,809	- 0,063
*Psol*15	2	0,144	0,343	0,375	0,236
*Psol*16	3	0,558	0,773	0,588	0,015
*Psol*17	7	0,030	0,501	0,839	0,876
*Psol*18	2	0,290	0,677	0,375	0,561
Média	*5*	*0,315*	*0,600*	*0,693*	*0,264*

O índice de fixação intrapopulacional ($f \approx F_{IS}$) foi estimado para cada população através dos valores de H_O e H_E. O valor médio de endogamia (f = 0,264) pode ser considerado baixo, o que sinaliza para a possibilidade de predomínio de fecundação cruzada entre indivíduos (alogamia).

Tabela 4. Parâmetros de diversidade obtidos para as quatro populações de *P. solmsianum.*

População	N	A	H_E	H_O
A – Bosque da USP (SP)	24	3,3	0,468	0,437
B – Ubatuba (SP)	25	3,3	0,346	0,246
C – Teresópolis (RJ)	10	2,4	0,454	0,223
D – Itatiaia (RJ)	13	3,3	0,537	0,303

A medida da diversidade genética evidenciou que a maioria da variação genética encontra-se entre os indivíduos, dentro das populações (locais de coleta) com H_S = 0,456, do que entre as populações (D_{ST} = 0,152), o que é esperado se considerarmos a espécie como alógama. No entanto, da diversidade genética total obtida, maior proporção foi observada dentro das populações (H_S = 0,456) do que entre as populações (D_{ST} = 0,203).

Além disso, 30,8% da diversidade alélica (G_{ST}') ficou alocada entre as quatro populações e os 69,2% restantes na forma de variação intrapopulacional (Tabela 5). Este padrão de distribuição é observado para espécies arbóreas e alógamas ou de sistema misto de reprodução (KAGEYAMA et al. 2003). Em geral, espécies autógamas ou predominantemente autógamas apresentam valores de G_{ST} mais elevados do que espécies alógamas (HAMRICK e GODT, 1996).

Da diversidade genética encontrada no conjunto dos genótipos analisados, 45,6% está dentro das populações, ou seja, entre os indivíduos de *P. Solmsianum,* e 20,3% da diversidade encontra-se entre as populações das quatro regiões de coleta. Esses resultados corroboram o agrupamento das quatro coletas em populações evidenciado pelos dendrogramas das distâncias de Nei (NEI, 1973; 1987) (Figuras 7 e 8).

Tabela 5. Diversidade genética dos 72 indivíduos de *P. solmsianum* pertencentes aos quatro locais de coleta. H_S, diversidade genética intrapopulacional; H_T, diversidade genética total (H_S', padronizada); D_{ST}, diversidade genética entre as populações (D_{ST}', padronizada); G_{ST}, diversidade genética nas populações em relação ao total, análoga ao F_{ST} de Wright 1931 (G_{ST}', padronizada).

Loco SSR	H_S	H_T	H_T'	D_{ST}	D_{ST}'	G_{ST}	G_{ST}'
*Psol*3	0.558	0.766	0.836	0.208	0.278	0.272	0.332
Psol6	0.694	0.690	0.689	-0.004	-0.006	-0.006	-0.008
*Psol*9	0.498	0.770	0.861	0.272	0.363	0.354	0.422
*Psol*10	0.621	0.740	0.780	0.119	0.159	0.161	0.204
*Psol*11	0.630	0.795	0.850	0.165	0.220	0.208	0.259
*Psol*15	0.095	0.096	0.097	0.002	0.002	0.018	0.024
*Psol*16	0.204	0.368	0.423	0.164	0.219	0.446	0.518
*Psol*17	0.572	0.766	0.831	0.194	0.259	0.254	0.312
*Psol*18	0.230	0.477	0.559	0.247	0.329	0.518	0.589
Média	*0.456*	*0.608*	*0.658*	*0.152*	*0.203*	*0.250*	*0.308*

Quanto a medida da diversidade entre as populações verificou-se que as estimativas de diferenciação genética entre as quatro populações foram altas, R_{ST} e F_{ST} (0,347 e 0,339, respectivamente) e semelhantes (Tabela 6). Esses parâmetros de diversidade são importantes do ponto de vista de conservação, direcionando futuras coletas. Resultados semelhantes foram descritos por Mariot (2000) estudando quatro populações de *P. cernnum*, e por Wadt e Kageyams (2004) que verificaram a estruturação genética de 13 populações naturais de *P. hispidinervum* com F_{ST} de 0,290 e 0,349.

Tabela 6. Estimativa das estatísticas F de Wright, do R_{ST} e do número de migrantes por geração (*Nm*) em quatro populações naturais de *P. solmsianum*. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.

	$F_{IS} \approx f$	$F_{IT} \approx F$	$F_{ST} \approx \theta_P$	R_{ST}	N_m^*
Estimativa	0,296	0,534	0,339	0,347	0,3
Limite Superior (IC 95%)	0,511	0,691	0,453		
Limite Inferior (IC 95%)	0,094	0,395	0,220		

* Calculado com base no R_{ST}

Ainda em relação à estruturação genética da espécie, foi realizado o Teste Exato de aderência dos nove locos SSR ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (*P* HWE) com 10.000 permutações e correção de Bonferroni ao nível de 5% de probabilidade. Do total de locos utilizados na genotipagem, sete deles (*Psol3*, *Psol6*, *Psol9*, *Psol10, Psol11*, *Psol17* e *Psol18*) desviaram significativamente das proporções esperadas de HWE ($P > 0,0055$) (Tabela 6). O desequilíbrio de ligação foi testado para todos os locos e foi verificado que três locos, *Psol3*, *Psol10* e *Psol18* estão ligados.

Tabela 6. Teste exato para verificação da aderência das populações de *P. solmsianum* ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*P* HWE). **A**: população do Bosque da CUASO-USP, SP; **B**: população de Ubatuba, SP; **C**: população de Teresópolis, RJ; **D**: população de Itatiaia, RJ.

Loco SSR	*P* HWE			
	A	B	C	D
***Psol*3**	0,2415	0,0000*	0,0014*	0,0005*
Psol6	0,0927	1,0000	0,0490	0,0007*
***Psol*9**	0,0027*	0,0008*	0,1994	0,5776
***Psol*10**	1,0000	0,0021*	0,0217	0,2570
***Psol*11**	1,0000	1,0000	-	1,0000
***Psol*15**	0,5509	1,0000	-	0,0005*
***Psol*16**	1,0000	1,0000	1,0000	0,5427
***Psol*17**	-	0,0000*	0,0588	0,0899
***Psol*18**	0,0000*	0,0165	0,1189	0,0093

Nota: (-), Equilíbrio de Hardy-Weinberg não pode ser calculado devido a população apresentar apenas um alelo por loco; valor nominal a 5% de probabilidade = 0,0055.

As quatro coletas iniciais que compunham os 72 genótipos foram submetidas à análise de grupos genéticos independentes através do programa *Structure* (Pritchard et al., 2000), que indica o número mais provável de populações através da determinação do valor de K. Essa análise identifica *clusters* com base no ajuste de proporções de Hardy-Weinberg e seus equilíbrios de ligação. O número mais provável de grupos distintos (K), de acordo com o procedimento de Evanno e colaboradores (2005), foi de três *clusters*, ou seja, K = 3 (Figura 7). Esse resultado revela que os indivíduos coletados em duas regiões distintas, Teresópolis e Itatiaia, ambas no Estado do Rio de Janeiro (RJ) formam uma única população (em azul, Figura 8). Já as duas outras coletas nas regiões de Ubatuba e Bosque da Universidade de São Paulo, ambas no Estado de São Paulo, apresentaram-se como populações distintas, mantendo a separação inicial na ordem de coleta (Figura 8, em verde e vermelho, respectivamente).

Os mesmos genótipos foram classificados pelo método UPGMA a partir das relações de distâncias genéticas calculadas entre eles. O dendrograma (Figura 8) revela grande semelhança com os grupos formados pela análise bayesiana do programa *Structure*, muito

embora a estruturação revelada pelo método UPGMA tenha sido mais bem sucedida para agregar indivíduos de mesmas localidades de coleta.

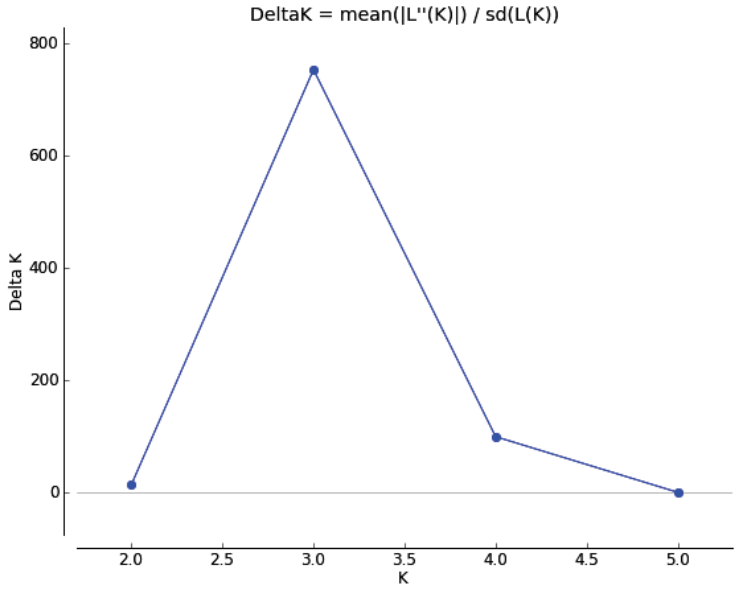


Figura 7. Gráfico com a indicação mais provável do valor de K pelo método do ΔK (Evanno et al. 2005) para a estruturação genética dos 72 genótipos de *P. solmsianum* pelo *Strucuture*.

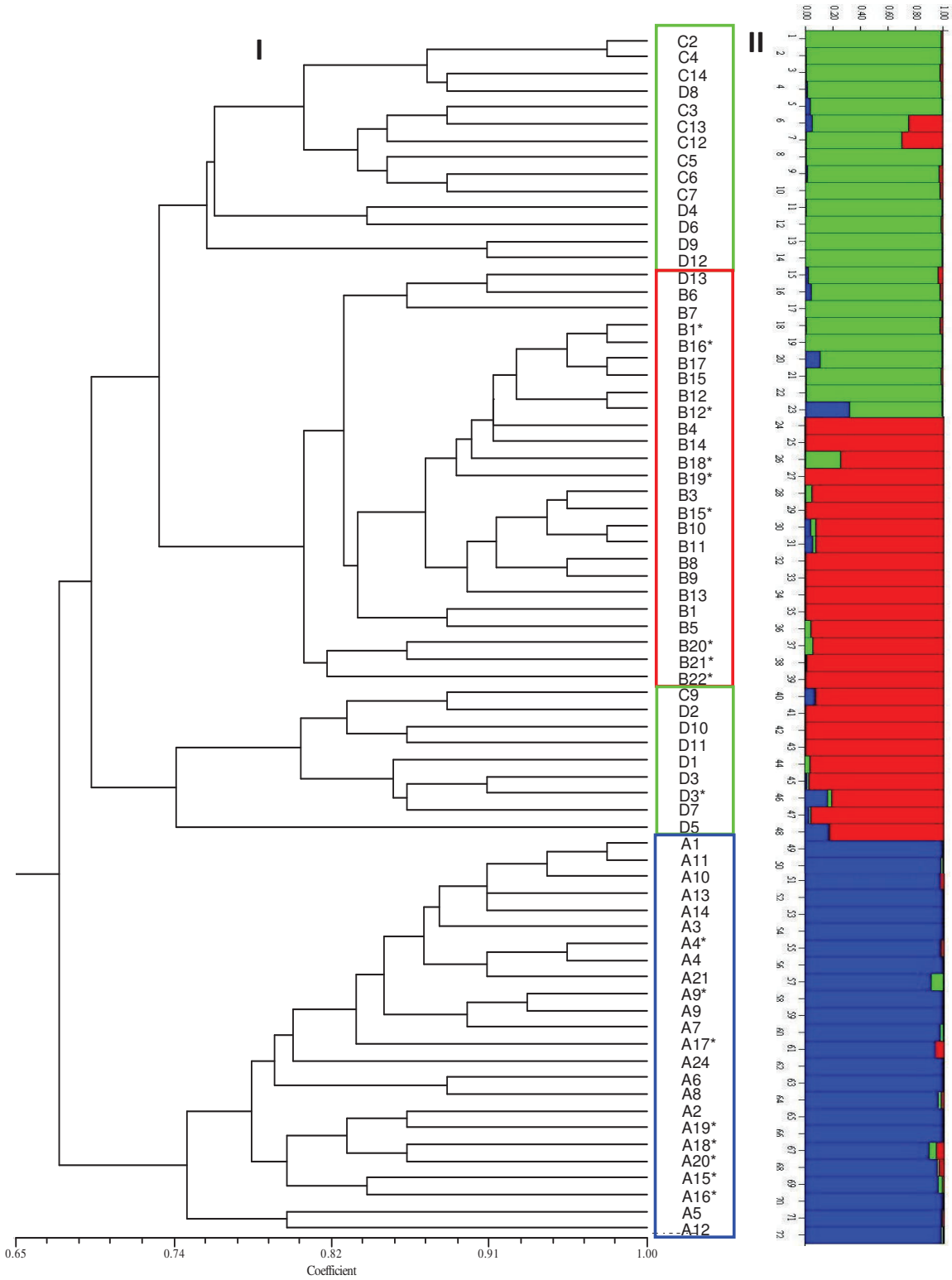


Figura 8. (I) Dendrograma da distância genética entre os 72 indivíduos de *P.solmsianum* definido pelo critério de agrupamento UPGMA, baseado no índice de Jaccard, gerado pelo software NTSYS. **(II)** Gráfico de barras indicando o número de *clusters* obtido pelo software *Structure*. Indivíduos são

representados pelas barras verticais. Indivíduos com as mesmas cores indicam que pertencem ao mesmo *cluster*. Gráfico em verde: população formada pelos indivíduos das coletas das regiões de Teresópolis e Itatiaia, RJ (grupos **C** [K1329] e **D** [K1316]); Gráfico em vermelho: população formada pelos indivíduos da coleta da região de Ubatuba, SP (grupo **B** [k1368]); Gráfico em azul: população formada pelos indivíduos da coleta da região da CUASO, SP (grupo **A** [k1384]).(*): Indica indivíduos coletados como replitcatas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Billotte, N., Lagoda, P. J. L., Risterucci, A. M., Baurens, F. C. (1999) Microssatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277-288.

Cockerham, C. C., Weir, B. S. (1993) Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution* 47:855-863.

David, L.S., Scott, S. C. R. (1993) An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *BioTechniques* 15:580-582.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software *STRUCTURE*: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.

Ferreira, M. G., Grattapaglia, D. (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.

Goudet, J. (1995) FSTAT, version 1.2: a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* 86 (6):485-486.

Hamrick, J., Godt, M. (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Series B 351:1291-1298.

Kageyama, P. Y., Sobbenn, A. M., Ribas, L. A., Gandara, F. B., Castellen, M., Perecim, M. B., Vencovsky, R. (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93-107.

Lewis, P., Zaykin, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data; version 1.1 (d16.c). Disponível em: http://lewis.ebb.uconn.edu/lewishome/software.html. Acesso em 18 abril 2012.

Mariot, A., Stasi, L. C., Reis, M. S. (2002) Genetic diversity in natural populations of *Piper cernuum*. *The Journal of Heredity* 5:365-369.

Miller, M. P. (1997) Tools for Populations Genetic Analysis. Version 1.3. Flagstaff: Northern Arizona University.

Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* 70 (12):3321-3323.

Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University, 512p.

Nucci, S.M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. (2007) Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC, 84p.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population *Structure* using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Rohlf, F. J. (1989) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York, 98p.

Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. p.365-386

Sanguinetti, C. J., Dias Nero, E., Simpson, A. J. G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-919.

Sokal, R. R., Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38:1409-1438.

Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., McCouch, S. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11: 1441-1452.

Wadt, L. H. O., Kageyama, P. Y. (2004) Estrutura genética e acasalamento de *Piper hispidinervum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 (2):151-157.

Weir, B.S. Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data. Suderland, MA: Sinauer Associates, 1996. 455p.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Nídia Cristiane Yoshida
Local de nascimento: Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul
Data de nascimento: 01 de setembro de 1982

EDUCAÇÃO

1989-1992	**Ensino Fundamental:** Escola Estadual Vicente Pallotti, Fátima do Sul, MS
1993-1996	**Ensino Fundamental:** Escola Reino do Saber, Fátima do Sul, MS
1997-1999	**Ensino Médio:** Escola Franciscana Imaculada Conceição, Dourados, MS
2000-2004	**Graduação em Farmácia:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS
2005-2007	**Mestrado em Química:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS
2008-2013	**Doutorado em Química:** Universidade de São Paulo, São Paulo, SP
2011-2013	**Doutorado Sanduíche:** Washington State University, Pullman, WA, EUA.

OCUPAÇÃO

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Bolsista de Doutorado, Agência FAPESP, vigência da bolsa: 2009-2013

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2001-2004	**Iniciação científica:** Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS
2005-2007	**Aluno de Mestrado:** Química Orgânica, Bolsista do CNPq, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS
2007-2008	**Professor Substituto:** Disciplinas ministradas nas áreas de Química Geral, Laboratório de Química e Farmacognosia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS
2008-presente	**Aluno de Doutorado:** Química, Bolsista da FAPESP, Universidade de São Paulo

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Yoshida, N. C. ; Siqueira, J. M.; Rodrigues, R. P.; Correia, R. P.; Garcez, W. S. (2013) An azafluorenone alkaloid and a megastigmane from *Unonopsis lindmanii* (Annonaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society 24:529-533.

2. Yamaguchi, L. F.; Freitas, G. C.; Yoshida, N. C.; Silva, R. A.; Gaia, A. M.; Silva, A. M.; Scotti, M. T.; Emerenciano, V. P.; Guimarães, E. F.; Floh, E. I. S.; Colombo, C. A.; Siqueira, W. J.; Kato, M. J. (2011) Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. Journal of the Brazilian Chemical Society 22:2371-2382.

3. Lopes, T. I. B.; Coelho, R. G.; Yoshida, N. C.; Honda, N. K. (2008) Radical-scavenging activity of orsellinates. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 56:1551-1554.

4. Valter, J. L.; Alencar, K. M. C.; Sartori, A. L. B.; Nascimento, E. A.; Chang, R.; Morais, S. A. L.; Yoshida, N. C.; Carollo, C. A.; da Silva, D. B.; Grassi, R. F.; Fabri, J. R.; de Siqueira, J. M. (2008) Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 18:373-378.

5. da Silva, D. B.; de Siqueira, J. M.; Yoshida, N. C.; Matos, M. F. C.; Nakashita, S. T.; Misu, C. K.; Carollo, C. A.; Miglio, H. S.; Fabri, J. R. (2007) Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. Química Nova 30:1809-1812.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. Almenara, D. P.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J.; Winter, C. E. Purification and analysis of secondary metabolites from *Photorhabdus* sp. (strain MN7). In: XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu/PR. XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society - Abstracts and Resumes, 2011.

2. Yoshida, N. C.; Yamaguchi, L. F.; Rojas, J. D.; Maldonado, G. P.; Salatino, A.; Kato, M. J. Occurrence of lignoids in Schilleria and Macrostachys clades of *Piper*. In: 50th Anniversary Meeting Phytochemical Society of North America, 2011, Hilo/HW. Pharmaceutical Biology, 2011. v. 50. p. 602.

3. Yoshida, N. C.; Yamaguchi, L. F.; Salatino, A.; Kato, M. J. Reconstruction of the evolution os chemical characters in *Piper* species, using a phylogenetic approach. In: 51st Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (ASP) and The Phytochemical Society of North America (PSNA), 2010, Saint Petersburg/FL. 2010 Joint Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy and the Phytochemical society of North America - Program and Abstracts, 2010. v. P-130.

4. Coutinho, J. P.; Batista, R.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J.; Santos, R. R. C. Atividade antioxidante dos frutos de *Inga laurina* (Fabaceae). In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador/BA. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

5. Yoshida, N. C.; Lima, P. F.; Colombo, C. A.; Kato, M. J. Chemical and genetic variability in *Piper solmsianum* (Piperaceae). In: Escola São Paulo de Ciência Avançada (ESPCA), 2010, Campinas/SP. Escola São Paulo de Ciência Avançada (ESPCA), 2010.

6. Yoshida, N. C.; Yamaguchi, L. F.; Salatino, A.; Kato, M. J. Phylogenetic analysis and reconstruction of chemical characters in Brazilian *Piper* species. In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products, 2009, São Pedro/SP. 2nd Brazilian Conference of Natural Products, Livro de resumos PS-214, 2009.

7. Benedetti, A. M.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J. Alkenylphenols from *Piper diospyrifolium*. In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products, 2009, São Pedro/SP. 2nd Brazilian Conference of Natural Products, Livro de resumos PS-180, 2009.

8. Coutinho, J. P.; Yoshida, N. C.; Kato, M. J.; Ramos, C. S.; Amorim, A. M. A.; Batista, R. Chemical constituents of the cytotoxic root extract of *Piper cuyabanum* D. DC. (Piperaceae). In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products, 2009, São Pedro/SP. 2nd Brazilian Conference of Natural Products, Livro de resumos PS-254, 2009.

9. Yamaguchi, L. F.; Freitas, G. C.; Yoshida, N. C.; Silva, R. A.; Gaia, A. M.; Kato, M. J. Metabolomic analysis of Piperaceae species using ESI/1H NMR and PCA. In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products, 2009, São Pedro/SP. 2nd Brazilian Conference of Natural Products, Livro de resumos PS-338, 2009.

10. Yoshida, N. C.; Garcez, W. S.; Siqueira, J. M.; Rodrigues, R. P.; Fabri, J. R. Nova azalfuorenona e alcalóides aporfinóides de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae. In: 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia/SP. Livro de Resumos - PN 007, 2007.

11. Yoshida, N. C. ; Siqueira, J. M. ; Garcez, W. S.; da Silva, D. B. ; Patussi, R. F.; Grassi, R. F. Sesquiterpenos das folhas de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia/SP. Livro de resumos - PN 177, 2006.

12. Yoshida, N. C.; da Silva, D. B.; de Siqueira, J. M.; Garcez, W. S.; Miglio, H. S.; Tulli, E. C. O. Avaliação teórica de produtos majoritários com atividade auxínica do óleo essencial de *Duguetia furfuracea.* In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Quimica., 2006, Águas de Lindóia/SP. Livro de Resumos - QT 012, 2006.

13. Pereira, R. P.; Siqueira, J. M.; Yoshida, N. C.; Garcez, W. S. Estudo fitoquímico biomonitorado do óleo essencial das folhas de *Unonopsis lindmanii* R. E. Fries - Annonaceae. In: 57º Encontro Nacional de Botânica, 2006, Gramado/RS. Anais do 57º Encontro Nacional de Botânica, 2006.

14. Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M.; Fabri, J. R.; Alencar, K. M. C.; Valter, J. L.; Sartori, A. L. B.; Nascimento, E. A.; Chang, R.; Morais, S. A. L. Quimiotipos do óleo essencial das folhas de *Duguetia furfuraceae* (A. St.-Hill) Benth.\& Hook. f. - Annonaceae, uma planta invasora de pastagem. In: 28º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas/MG. Livor de Resumos - PN 212, 2005.

15. Yoshida, N. C.; Garcez, W. S.; de Siqueira, J. M.; Patussi, R. F. Estudo fitoquímico das folhas de *Unonopsis lindmanii.* In: Encontro de Divulgação de Pesquisas da Química - UFMS, 2005, Campo Grande/MS. Anais do 5º Encontro de Divulgação de Pesquisas da Química -UFMS, 2005.

16. Yoshida, N. C.; Siqueira, J. M.; Tulli, E. C. O.; Grassi, R. F.; Vieira, M. C. Avaliação da atividade capturadora de radicais livres das plantas mais utilizadas na medicina popular em Mato Grosso do Sul. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas/MG. Livro de Resumos - PN 021, 2005.

17. Solom, S.; Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M. Estudo fitoquímico biomonitorado de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). In: Encontro Nacional de Inovação Científica para o Homem do Século XXI, 2005, Campo Grande/MS. Anais do Encontro Nacional de Inovação Científica para o Homem do Século XXI, 2005.

18. Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M.; Fabri, J. R.; Alencar, K. M. C.; Valter, J. L.; Sartori, A. L. B. Variação quantitativa e qualitativa dos constituintes voláteis do óleo essencial de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea.* In: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - Encontro de Iniciação Científica - UFMS, 2004, Campo Grande/MS. Anais do Encontro de Iniciação Científica- UFMS, 2004.

19. Yoshida, N. C.; Tulli, E. C. O.; de Siqueira, J. M.; Fabri, J. R.; Grassi, R. F.; da Silva, D. B. Avaliação da Atividade Antioxidante de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. In: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - Encontro de Iniciação Científica - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2004, Campo Grande/MS. Anais do Encontro de Iniciação Científica - UFMS, 2004.

20. Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M.; Fabri, J. R.; Grassi, R. F.; da Silva, D. B. Atividade Antioxidante em *Baccharis trimera* - carqueja. In: VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003, São Pedro - SP. Vi Jornada Paulista de Plantas Medicinais - tecnologia e saúde, 2003.

21. Grassi, R. F.; de Siqueira, J. M.; Yoshida, N. C.; Saffran, F. P.; Fabri, J. R. 6-beta-hidroxiipolamiida, um iridóide glicosilado de *Memora peregrina* (Bignoniaceae). In: Sociedade Brasileira de Química/ 26ª Reunião Anual, 2003, Poços de Caldas/MG. Livro de Resumos - PN 195, 2003.

22. Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M.; Patussi, R. F. O isolamento de liriodenina das folhas de *Unonopsis lindmanii.* In: VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003, Águas de São Pedro/SP. Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003.

23. Yoshida, N. C.; de Siqueira, J. M.; Fabri, J. R.; Grassi, R. F. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii.* In: III Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2002, Campo Grande/MS. Anais do III Encontro Interno de Iniciação Científica da UFMS, 2002.