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

MARCILIO MARTINS DE MORAES

Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
08/04/2016

MARCILIO MARTINS DE MORAES

Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK

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
2016

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

Moraes, Marcilio Martins de
M827b Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK / Marcilio Martins de Moraes. -- São Paulo, 2016.
136p.

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

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

547.7 CDD

Dedico este trabalho aos meus pais, minha tia, irmão e noiva pelo apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química pela oportunidade em realizar este trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e recursos financeiros, sem os quais esse projeto de Doutorado não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa, pela sua orientação e compreensão. Muito obrigado por seus ensinamentos!

Aos professores Alcindo Aparecido dos Santos e Erick Bastos por todo auxilio na realização desse projeto.

Aos meus pais Marcondes e Margarida, minha tia Maria, meu irmão Márcio e a minha noiva Elaine pelo apoio, compreensão e estímulo.

Aos amigos e colegas do LQPN: Anderson, Augusto, Celso, Eduardo, Érica, Fábio Rodrigues, Gerardo, Giovana, Harold, Lydia, Mauro, Renan, Jean, Tara e Yasmin, Wilman, Nora, Elizabete por toda a ajuda e momentos compartilhados.

Aos amigos e família, Cláudia, Rodolfo, Almir, Gesiane, Nayde, Telma, Cláudio Câmara por todo incentivo e momentos compartilhados.

Aos amigos Welber, Joca, ML, Mônica, George, Marcos, Vitor, Cleverson, Antônio, Fabiana, Andreas e à toda galera da pelada pela força, amizade, pelas boas risadas, momentos de descontração. Muito obrigado!

Aos funcionários da Central Analítica do IQUSP, pelas análises realizadas, em especial à Janaína, Márcio Nardelli e Márcio Santos.

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 todos, meus sinceros agradecimentos…

"A persistência é o menor caminho do êxito"

Charles Chaplin

RESUMO

Moraes, M. M. Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peperomia pellucida (L.) HBK (Piperaceae) (erva de jaboti) é uma herbácea amplamente encontrada nos trópicos e que possui diversas propriedades biológicas. Seus estudos fitoquímicos haviam demonstrado a presença da pellucidina A, uma rara dinorlignana ciclobutânica, que seria formada por acoplamento oxidativo de 2,4,5-triidroxi-estireno seguido de metilações. Nesse trabalho, foram caracterizados o ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, 2,4,5-trimetoxi-estireno, 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído, dilapiol, 5,6,7-trimetoxi-flavona, sesamina, além da pellucidina A. Estudos de aspectos dinâmicos envolvidos na formação da pellucidina A incluíram a ontogenia e respostas à diferentes tratamentos como estresse hídrico, predação por herbívoros, ácido jasmônico e luz UV. O tratamento com ácido jasmônico resultou num significativo incremento do dilapiol enquanto que, o tratamento sob luz UV resultou no aumento na produção da pellucidina A sugerindo um mecanismo de cicloadição [2+2] para sua biossíntese. A administração de diferentes precursores *in vivo* revelou que a *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina (0,75%), ácido [8-^{13}C]-cinâmico (1,32%), ácido [8-^{13}C]-ferúlico (0,51%), ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico (7,9%) e o 2,4,5-trimetoxi-estireno (13,3%) foram incorporados à pellucidina A. Ensaios de conversão enzimática indicaram a descarboxilação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico em 2,4,5-trimetoxi-estireno enquanto que o 2,4,5-trimetoxi-estireno foi dimerizado em pellucidina A através da reação de cicloadição [2+2] sensibilizada pela presença da 5,6,7-trimetoxi-flavona (18,45%), tal qual a benzofenona (11,15%). Assim, sugere-se a sequência *L*-fenilalanina, ácido cinâmico, ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, 2,4,5-trimetoxi-estireno e pellucidina A, sendo a última etapa através de mecanismo fotoquímico tendo como sensibilizador a 5,6,7-trimetoxi-flavona.

Palavras-chave: Piperaceae, *P. pellucida,* pellucidina A, fitoquímica, biossíntese, conversão enzimática.

ABSTRACT

Moraes, M. M. Biosynthesis of pellucidin A in *Peperomia pellucida* (L.) HBK. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peperomia pellucida (L.) HBK (Piperaceae) (erva de jaboti) is an herbaceous plant that is widespread in the tropics and have several biological properties. Previous reports described the presence of pellucidin A, a rare dinorlignan having the unique cyclobutane moiety, that was supposedly formed by oxidative coupling of the precursor 2,4,5-trihydroxy-styrene followed by methylations steps. In this study, a comprehensive phytochemical study resulted in the description of 2,4,5-trimethoxy-cinnamic acid, 5,6,7-trimethoxy-flavone, 2,4,5-trimethoxy-styrene, 2,4,5-trimethoxy-benzaldehyde, dillapiol and sesamin in addition to pellucidin A. Studies of the dynamic aspects involved in the formation of pellucidin A included changes during ontogeny and responses to different treatments such as drought stress, herbivory, jasmonic acid and UV light. The treatment with jasmonic acid resulted in a significant increase in dillapiol whereas treatment under UV light resulted in an increase in production of pellucidin A, suggesting that a cycloaddition [2+2] mechanism is involved in its formation. The *in vivo* administration of different precursors to plants of *P. pellucida* revealed that *L*-[2-^{13}C]-phenylalanine (0.75%), [8-^{13}C]-cinnamic acid (1.32%), [8-^{13}C]-ferulic acid (0.51%) 2,4,5-trimethoxy-[8-^{13}C]-cinnamic acid (7.9%) and 2,4,5-trimethoxy-[8-^{13}C]-styrene (13.3%) were incorporated into pellucidin A. The enzymatic conversion assays indicated decarboxylation of 2,4,5-trimethoxy-cinnamic acid into 2,4,5-trimethoxy-styrene while the 2,4,5-trimethoxy-styrene was dimerized in the pellucidin A by cycloaddition reaction [2+2] sensitized by 5,6,7-trimethoxy-flavone (18.45%), as well as by benzophenone (11.15%). Thus, we suggest the sequence *L*-phenylalanine, cinnamic acid, 2,4,5-trimethoxy-cinnamic acid, 2,4,5-trimethoxy-styrene and pellucidin A, the last step being carried out by a photochemical mechanism having 5,6,7-trimethoxy-flavone as a sensitizer.

Keywords: Piperaceae, *P. pellucida*, pellucidin A, phytochemistry, biosynthesis, enzymatic conversion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição geográfica de espécies de *Peperomia*. **22**
Figura 1.2. *Peperomia pellucida* (L.) HBK **23**
Figura 1.3. Metabólitos secundários isolados em *Peperomia pellucida*..... **26**
Figura 1.4. Pellucidina A (**1**) **28**
Figura 1.5. Exemplos de produtos naturais contendo ciclobutanos isolados de fungos, plantas, organismos marinhos e insetos..... **30**
Figura 1.6. Exemplos de feromônio de agregação contendo anel ciclobutânico. **31**
Figura 1.7. Exemplos de terpenoides contendo anel ciclobutânico. **31**
Figura 1.8. Configuração cabeça-cabeça e cabeça-cauda dos ácidos truxínico e truxílico. **32**
Figura 1.9. Alcaloides derivados dos ácidos truxínico e truxílico. **33**
Figura 1.10. Lignanas, neolignanas e compostos relacionados contendo anel ciclobutânico..... **35**
Figura 1.11. Ciclobutanos considerados como produtos de cicloadição [2+2] 38
Figura 3.1. Predadores naturais de *P. pellucida* utilizados nos experimentos de estresses. **50**
Figura 3.2. Fracionamento e purificação dos metabólitos das folhas de *P. pellucida.* **52**
Figura 3.3. *P. pellucida* cultivada em sistema de hidroponia. **58**
Figura 3.4. Curva de calibração construída com BSA para determinar a concentração de proteínas em *P. pellucida.*..... 62
Figura 4.1. Análise por CLAE dos extratos das folhas, caules, frutos e raízes de *P. pellucida.* **64**
Figura 4.2. Substâncias isoladas e identificadas de *P. pellucida.*..... **64**
Figura 4.3. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da pellucidina A (**7**)... **65**
Figura 4.4. (A) Espectro de massas (IE) da pellucidina A. (B) expansão entre a região de 300 a 400 Da do espectro de massas da pellucidina A (**7**). **66**
Figura 4.5. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**)..... **69**
Figura 4.6. Espectro de massas (IE) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**)..... **70**
Figura 4.7. Espectro de massas (IE) da sesamina (**4**)..... **73**
Figura 4.8. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**). **75**
Figura 4.9. Espectro de massas (IE) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**)..... **77**
Figura 4.10. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**)..... **78**
Figura 4.11. Espectro de massas (IE) do dilapiol (**6**)..... **79**
Figura 4.12. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de *P. pellucida* (folhas adultas e folhas das plântulas em diferentes estágios). **82**
Figura 4.13. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de *P. pellucida*..... **83**
Figura 4.14. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. pellucida*.. ..... **84**

Figura 4.15. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de *P. pellucida* **86**
Figura 4.16. Estrutura da pellucidina A e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de *P. pellucida*. **87**
Figura 4.17. Estrutura do dilapiol com atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrado. **88**
Figura 4.18. Análise por CLAE dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* sob diferentes condições de estresses. **89**
Figura 4.19. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (A); (B) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina. **96**
Figura 4.20. Incorporação da pellucidina A enriquecida com isotopômeros de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina. **97**
Figura 4.21. Espectro de massas (IE) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico com abundância natural (A); (B) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina; (A1) Ampliação de (A); (B1) ampliação de (B). **98**
Figura 4.22. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno com abundância natural (A); (B) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina; (A1) ampliação de (A); (B1) ampliação de (B). **99**
Figura 4.23. Incorporação do isotopômeros de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina no ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico e no 2,4,5-trimetoxi-estireno. **100**
Figura 4.24. Incorporação na pellucidina A e do 2,4,5-trimetoxi-estireno enriquecidos com isotopômeros de ácido [8-^{13}C]-cinâmico. **101**
Figura 4.25. Incorporação na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno enriquecidos com isotopômeros de ácido [8-^{13}C]-ferúlico. **102**
Figura 4.26. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (A); (B) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico; (A1) ampliação de (A); (B1) e (B2) ampliação de (B). **103**
Figura 4.27. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno com abundância natural (A); (B) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico; (A1) ampliação de (A); (B1) Ampliação de (B). **104**
Figura 4.28. Incorporação do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno. **105**
Figura 4.29. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (A); (B) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-estireno; (A1) ampliação de (A); (B1) e (B2) ampliação de (B). **106**
Figura 4.30. Incorporação da pellucidina A enriquecida com isotopômeros do 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno. **107**
Figura 4.31. Análise por CLAE do 2,4,5-trimetoxi-estireno, ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, da amostra controle (extrato enzimático) reação de bioconversão do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico a 2,4,5-trimetoxi-estireno. **110**
Figura 4.32. Cinética de reação dos estirenos formados durante a conversão enzimática. **111**
Figura 4.33. Perfil cromatográfico (CG-EM) das reações da pellucidina A. **113**
Figura 4.34. Espectro de massas (IE) da pachipostaudina A. **114**

Figura 4.35. Espectro de massas (IE) da pachipostaudina B. **114**
Figura 5.1. Proposta biossintética para a pellucidina A em *P. pellucida.*..... **118**

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1. Rota biossintética de monolignóis.....**41**
Esquema 1.2. Acoplamento enantiosseletivo do (+)-pinoresinol auxiliado por proteína irigente..... **42**
Esquema 1.3. Mecanismo de formação do (*E*)- e (*Z*)-hinokiresinol..... **43**
Esquema 1.4. Proposta biossintética da pellucidina A.....44
Esquema 3.1. Preparação dos ácidos cinâmicos.....**55**
Esquema 3.2. Preparação do iodeto de metil-trifenilfosfônio..... **55**
Esquema 3.3. Preparação dos estirenos.....**56**
Esquema 3.4. Desmetilação dos diferentes benzaldeídos.....**56**
Esquema 3.5. Proteção das hidroxilas fenólicas dos diferentes benzaldeídos..... **57**
Esquema 3.6. Desproteção das hidroxilas fenólicas dos diferentes estirenos.....**58**
Esquema 4.1. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a pellucidina A (**7**).....**67**
Esquema 4.2. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a sesamina (**4**).....**73**
Esquema 4.3. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**).....**75**
Esquema 4.4. Propostas biossintéticas para rota metabólica de formação da pellucidina A.....**91**
Esquema 4.5. Reação de desaminação da *L*-fenilalanina em *trans*-cinamato.....**100**
Esquema 4.6. Reação de descarboxilação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno.....**105**
Esquema 4.7. Reação de dimerização do 2,4,5-trimetoxi-estireno formando a pellucidina A.....**107**
Esquema 4.8. Proposta biossintética para a formação da pellucidina A partindo do 2,4,5-triidroxi-estireno.....**108**
Esquema 4.9. Análise da incorporação do 2,4,5-triidroxi-etilbenzeno formando 2,4,5-trimetoxi-etilbenzeno.....**108**
Esquema 4.10. Biossíntese de magnosalina e endiandrina A na *P. pellucida*.....**109**
Esquema 4.11. Descarboxilação por via enzimática do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno..... **111**
Esquema 4.12. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a pachipostaudina A.....**115**
Esquema 4.13. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a pachipostaudina B.....**115**

LISTA DE TABELA

Tabela 1.1. Constituintes majoritários encontrado nos óleos essenciais em *P. pellucida*. **27**
Tabela 3.1. Gradiente de eluição no CLAE dos extratos clorofórmico. **47**
Tabela 4.1. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (500 e 125 MHz) da pellucidina A obtidos, com os dados da literatura.....**68**
Tabela 4.2. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (300 e 125 MHz) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).....**71**
Tabela 4.3. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (300 e 125 MHz) da sesamina (**4**).....**74**
Tabela 4.4. Análise quantitativa das substâncias identificadas nas diferentes partes da *P. pellucida*.....**80**
Tabela 4.5. Preparações dos ácidos cinâmicos.....**93**
Tabela 4.6. Preparações dos estirenos..... **94**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
1.1. Metaboloma 19
1.2. Gênero *Peperomia* 21
1.3 *Peperomia pellucida* 23
1.4. Pellucidina A 28
1.5. Produtos naturais contendo ciclobutanos 29
1.6. Biossíntese de lignanas, neolignanas e norlignanas 39
2. OBJETIVOS 45
2.1. Objetivo geral 45
2.2. Objetivos específicos 45
3. MATERIAIS E MÉTODOS 46
3.1. Tratamento dos reagentes e solventes 46
3.2. Equipamentos 46
3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 46
3.2.2. Ressonância magnética nuclear (RMN) 47
3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (“electrospay”, modo positivo) (CLAE/EM-ESI) 47
3.2.4. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) 48
3.2.5. Cromatografia planar analítica e preparativa 48
3.2.6. Cromatografia planar preparativa radial (cromatotron) 48
3.2.7. Cromatografia de coluna 49
3.3. Material vegetal 49
3.4. Espécies de insetos usados nos experimentos de herbivoria 49
3.5. Obtenção dos extratos brutos para análise metabolômica 51
3.6. Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das folhas de *P. pellucida* 51
3.7. Curva de calibração 53
3.8. Análise da formação da pellucidina A durante o processo de extração 53
3.9. Análise de componentes principais 54
3.10. Preparação dos precursores 54
3.10.1. Preparação dos ácidos cinâmico 54
3.10.2. Preparação do iodeto de metil-trifenilfosfônio 55
3.10.3. Preparação dos estirenos 55

3.10.4. Desmetilação dos metoxi-benzaldeídos 56
3.10.5. Proteção das hidroxilas fenólicas dos hidroxi-benzaldeídos com cloreto de *tert*-butildimetilsilano..... 57
3.10.6. Desproteção das hidroxilas fenólicas dos estirenos 57
3.11. Administração *in vivo* dos precursores na *P. pellucida*..... 58
3.11.1. Administração dos precursores marcados *L*-[2-^{13}C] fenilalanina 58
3.11.2. Administração dos diferentes ácidos [8-^{13}C]-cinâmicos 59
3.11.3. Administração dos [8-^{13}C]-estirenos 59
3.12. Cálculo do percentual de incorporação dos precursores isotopicamente marcados. 60
3.13. Ensaios enzimáticos 60
3.13.1. Extração enzimática..... 61
3.13.2. Protocolo para obtenção do extrato enzimático das folhas de *P. pellucida* 61
3.13.3. Dosagem Protéica (Reagente de Bradford)..... 61
3.13.4. Solução de albumina bovina 61
3.13.5. Quantificação das proteínas nos extratos enzimáticos 61
3.13.6. Ensaios de incubação dos precursores com os extratos enzimáticos . 62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 63
4.1. Estudo fitoquímico de *P. pellucida* 63
4.1.1. Identificação da pellucidina A (**7**) 65
4.2.2. Identificação da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**) 69
4.2.3. Identificação da sesamina (**4**) 71
4.2.4. Identificação do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**)..... 74
4.2.5. Identificação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**) 76
4.2.6. Identificação do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**) 77
4.2.7. Identificação do dilapiol (**6**) 79
4.3. Quantificação dos compostos isolados presentes nos extratos..... 80
4.4. Variações ontogenéticas e perfil químico das folhas das plântulas da *P. pellucida.* 81
4.5. Variações metabólicas no perfil químico das folhas da *P. pellucida* sob estresses. 85
4.6. Proposta biossintética para a formação da pellucidina A..... 90
4.7. Preparação dos derivados de ácidos cinâmicos e estirenos..... 92
4.8. Incorporação dos precursores na pellucidina A 95

4.8.1. Análise da incorporação de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina 95
4.8.2. Análises da incorporação do ácido [8-^{13}C]-cinâmico e ácido [8-^{13}C]-ferúlico. 100
4.8.3. Análises da incorporação do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico.... 102
4.8.4. Análises da incorporação do 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno 105
4.8.5. Análises da incorporação do 2,4,5-triidroxi-[8-^{13}C]-estireno 107
4.8.6. Análises da metilação do 2,4,5-triidroxi-etilbenzeno, 3,4-diidroxi-estireno e 4-hidroxi-estireno 108
4.8.7. Análises de incorporação da série de derivados do ácido cinâmico e estireno. 109
4.9. Conversão enzimática 109
4.9.1. Experimentos de conversão enzimática com os precursores da pellucidina A. 109
4.10. Síntese da pellucidina A 112
5. CONCLUSÕES 116
6. REFERÊNCIAS. 119
7. ANEXOS 137

1. INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos primários que são essenciais para sua manutenção, nutrição, crescimento e reprodução. Esses metabólitos incluem proteínas, lipídios, carboidratos, nucleotídeos e aminoácidos (Villas-Bôas et al., 2005; Wolfender et al., 2013). Outra classe de metabólitos de baixa massa molecular e de distribuição limitada em algumas famílias e gêneros são chamados de metabólitos secundários (Dixon et al., 2001).

Os metabólitos secundários são substâncias que geralmente não fazem parte do metabolismo básico, possuem características químicas muito variadas, podendo agir como mediadores das interações das plantas com o ambiente e outros organismos (Ivanisevic et al., 2011; Jones and Firn, 1991; Newman et al., 2003; Pichersky and Gang, 2000; Wolfender et al., 2013; Zhang et al., 2003). Podem variar de forma qualitativa e quantitativa de acordo com o órgão, estágio de desenvolvimento, mudanças sazonais, condições de estresse, infecção, herbivoria entre outros fatores (Wink, 2003).

Essas substâncias apresentam uma grande variabilidade em suas estruturas, e por isso, são classificados de acordo com sua origem biossintética sendo agrupados em diferentes classes como terpenoides, fenilpropanoides, lignanas, flavonoides, xantonas, policetídeos, alcaloides, cromenos, amidas, entre outros (Newman and Cragg, 2012).

Estudos com plantas são tão antigos quanto à própria química orgânica (Croteau, 2000) e têm despertado interesse de pesquisadores em todo mundo que tentam compreender como e por que as plantas produzem grande diversidade dos metabolitos secundários que são produzidos por complexas vias metabólicas (Kumar and Pandey, 2014).

A diversidade estrutural dos metabolitos secundários encontrada nas plantas é gigantesca considerando que menos de 10% da biodiversidade mundial foi investigada. Os metabólitos secundários podem ser purificados por métodos clássicos de análise fitoquímica que consistem no isolamento seguido da determinação estrutural por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (Dias et al., 2012). Porém, a purificação desses compostos torna-se, na maioria dos casos, uma tarefa laboriosa, de alto custo, com longo período de execução e inadequada quando é necessário analisar um grande número de amostras (Wolfender et al., 2013).

Com o desenvolvimento de poderosos métodos analíticos, as análises fitoquímicas podem ser auxiliadas com a aplicação de técnicas metabolômicas usando diretamente extratos brutos, sem a necessidade de purificações, o que torna o processo, mais rápido e permite, muitas vezes, uma caracterização das principais classes de metabólitos (Villas-Bôas et al., 2005).

1.1. METABOLOMA

O metaboloma compreende o conjunto de todos os metabólitos primários e secundários presentes em um determinado organismo. Esses metabólitos são os produtos finais dos processos regulatórios celulares e seus níveis e composições podem variar como resposta a mudanças genéticas e ambientais (Fiehn, 2002).

Em termos práticos a análise metabolômica envolve a determinação qualitativa e quantitativa de todos (ou do maior número possível) dos metabólitos de baixa massa molecular (menor que 1000 Da) que participam das reações metabólicas em um organismo, (Cox et al., 2014; Dunn and Ellis, 2005; Verpoorte et al., 2008).

A análise metabolômica surgiu como uma poderosa ferramenta capaz de analisar um grande número de amostras com grande quantidade de metabólitos fornecendo valiosas informações a nível molecular (Baker, 2011).

A técnica ganhou grande popularidade em diferentes campos da ciência por descobertas de biomarcadores (Liu et al., 2010), diagnóstico de doenças (Nishiumi et al., 2010), caracterização fenotípica de micro-organismos e plantas (Hirai et al., 2010; Villas-Bôas et al., 2008) caracterização de atividade enzimática (Goldstone et al., 2009) entre outros.

A aplicação da análise metabolômica em sistemas biológicos é a chave para a compreensão da complexidade de seu metabolismo constituindo-se na ligação entre genótipos e fenótipos (Villas-Bôas and Gombert, 2006). A metabolômica representa uma ferramenta prática para análise das variações dos metabólitos em plantas frente a perturbações como variações nutricionais, mudanças climáticas, fases de desenvolvimento, fungos, vírus e herbivoria.

Estima-se que o número de metabólitos produzidos nas plantas esteja em torno de 200.000. por essa razão, estudos metabolômicos de plantas têm atraído muitos grupos de pesquisas no Brasil e no mundo (Wolfender et al., 2013).

As principais abordagens metabolômicas utilizadas em análises de plantas são o *fingerprint* metabólico, o perfil metabólico e a análise direcionada (Villas-Bôas and Gombert, 2006).

O *fingerprint* metabólico é usado para identificar variações nos padrões metabólicos associados às respostas em condições de estresses sem identificação nem quantificação dos metabólitos envolvidos (Shulaev et al., 2008). O perfil metabólico tem como objetivo analisar, identificar e quantificar de forma simultânea um conjunto de metabólitos (Villas-Bôas and Gombert, 2006). Já a análise direcionada (*targeted*) é amplamente utilizada para acompanhar a variação de um limitado número de metabolitos conhecidos que pode estar envolvido em uma particular condição de estresse (Villas-Bôas et al., 2005).

A primeira etapa da análise metabolômica é a "*supressão"* que consiste no congelamento imediato do organismo consequentemente do metabolismo, normalmente usando nitrogênio líquido. A "supressão" reduz o aparecimento de artefatos resultantes de degradações ou de atividade enzimática que possam ocorrer após a coleta do material (Villas-Bôas et al., 2005).

Depois da etapa da "supressão", a extração dos metabólitos deve ser realizada de forma a se obter o maior número de metabólitos possíveis. Assim, a utilização de um ou mais solventes de polaridades distintas devem ser empregados. Muitas vezes uma combinação de solventes de diferentes polaridades como $CHCl_3$:H_2O:MeOH (2:1:1) é aplicada com o objetivo de se extrair e ao mesmo tempo fracionar metabólitos de diferentes polaridades em uma única etapa (Duportet et al., 2012; Kim et al., 2010).

As etapas de supressão e extração devem ser feitas de maneira precisa e mais rápida possível. Uma falha nesses processos pode resultar em informações equivocadas distorcendo a interpretação metabolômica (Choi and Verpoorte, 2014).

Uma vez realizada a extração, a análise dos metabólitos deve ser feita com o objetivo de se obter o máximo de informações possíveis. Para isso diversas análises espectroscópicas e espectrométricas podem ser empregadas. Entre as análises mais usadas estão a ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (EC-EM) e, em alguns casos, uma combinação dessas técnicas. As aplicações dessas técnicas são importantes, pois permitem a detecção e identificação de dezenas de compostos em uma única análise

(Dunn et al., 2011; Kim et al., 2010; Obata and Fernie, 2012; Schripsema, 2009; Yamaguchi et al., 2011).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais aplicadas em análises metabolômicas de plantas, porque permite a detecção simultânea de metabólitos de diferentes classes, quantificação dos metabólitos extraídos, não necessita de curvas de calibração e permite ainda a caracterização de compostos conhecidos e desconhecidos (Kim et al., 2010; Villas-Bôas and Gombert, 2006).

Além da RMN de ^{1}H outras técnicas 2D como COSY, HMQC, TOCSY e J-resolved também são bastante empregadas na identificação dos metabólitos em análises metabolômicas (Choi and Verpoorte, 2014; Kim et al. 2010).

Nas análises das amostras um grande número de dados complexos é gerado o que dificulta a interpretação manual. Surge daí a necessidade da utilização de ferramentas estatísticas de análises multivariadas de dados como a análise de componentes principais (PCA), análise de agrupamento hierárquico (HCA), análise diferencial por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), análise discriminante linear (LDA), análise de componente independente (ICA) entre outras. Em alguns casos para obtenção de informações mais precisas essas análises são executadas em conjunto.

As análises multivariadas são capazes de extrair importantes informações das amostras, permitindo assim uma interpretação das possíveis variações metabólicas ocorridas no organismo (Kim et al., 2010; Schripsema, 2009; Yamaguchi et al., 2011).

Desta forma, a metabolômica representa uma ferramenta que vem se mostrando muito útil para o estudo de plantas e outros organismos (Fukusaki, 2005; Verpoorte et al., 2008).

1.2. GÊNERO *PEPEROMIA*

O gênero *Peperomia* pertence à família Piperaceae, que ainda compreende outros quatro gêneros: *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia* e *Piper* (Samain et al., 2009). *Piper e Peperomia* são os dois gêneros com maior número de espécies, com aproximadamente 2000 e 1500 espécies, respectivamente (Wanke et al., 2007).

As espécies de *Peperomia* são relatadas na Ásia, África, Oceania e América Central e do Sul. As espécies do gênero são encontradas principalmente em regiões de florestas úmidas ou montanhosas (Wanke et al., 2006) (Figura 1.1).

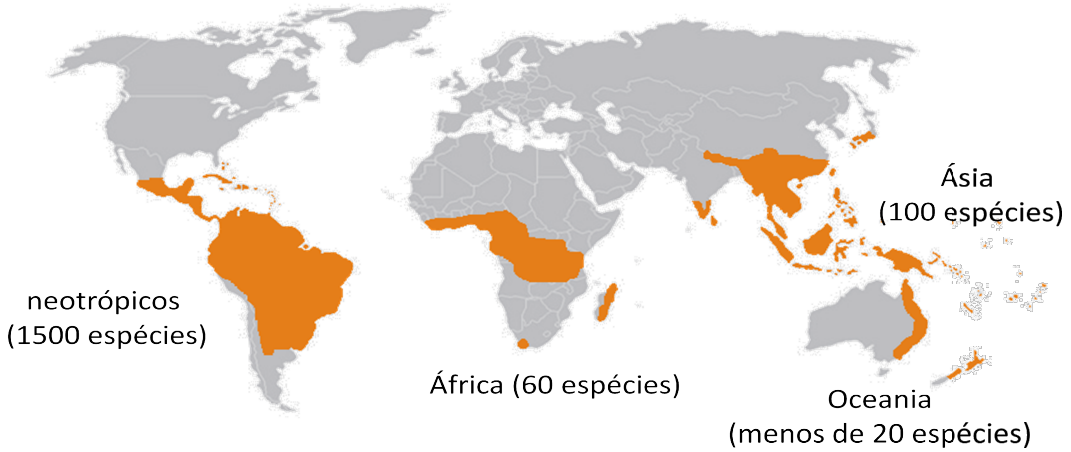


Figura 1.1. Distribuição geográfica de espécies de *Peperomia* (Wanke et al., 2006).

A maioria das espécies de *Peperomia* apresentam folhas com tecidos especializados no armazenamento de água, com grau de suculência variando consideravelmente de acordo com a morfologia foliar (Kaul, 1997). A principal forma de dispersão das sementes ocorre por meio da resina presente nos frutos que se prendem nas patas e asas de pássaros, morcegos e insetos, fazendo com que estas sementes sejam transportadas por longas distâncias (Valdebenito et al., 1990).

Por conta de sua grande capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas, tipos de solo, alta resistência a ambientes secos e facilidade de cultivo, o gênero é amplamente cultivado com finalidades ornamentais (Smith et al., 2008).

Na medicina popular, as espécies de *Peperomia* são utilizadas na preparação de beberagens para tratamento da asma, tosse, úlcera, antiinflamatório, diurético, analgésico, antibiótico, conjuntivite, controle do colesterol entre outras (Bayma et al., 2000; Felippe et al., 2008; Wang et al., 2012). Extratos brutos bem como substâncias isoladas de espécies do gênero têm apresentado diversas atividades biológicas como citotóxica (Wu et al., 2005; Wu et al., 2006), antifúngica (Salazar et al., 2005), inseticida (Govindachari et al., 1998), anti-HIV (Zhang et al., 2007), antiinflamatória (Li et al., 2007) e tripanocida (Felippe et al., 2008), entre outras.

Como conseqüência das atividades biológicas apresentadas por compostos isolados de espécies de *Peperomia* é crescente o interesse no isolamento e sínteses de derivados de compostos ativos de espécies do gênero (Salazar et al., 2005).

Com cerca de 1500 espécies identificadas no gênero *Peperomia*, apenas 30 espécies foram estudadas até o momento (Valero et al., 2016). Mesmo assim, mais de 200 compostos de diferentes classes já foram identificados, o que mostra a grande diversidade química do gênero. Entre os metabolitos secundários isolados encontram-

se fenilpropanoides (Bayma et al., 2000; Manalo et al., 1983), lignanas tetraidrofurânicas (Felippe et al., 2008), secolignanas (Monache and Compagnone, 1996), lignanas furofurânicas (Cheng and Chen, 2008), neolignanas (Mbah et al., 2012), dinorlignanas (Bayma et al., 2000), flavonoides (Wu et al., 2005), policetídeos (Wang et al., 2012), policetídeos prenilados (Mahiou et al., 1996), cromenos (Reigada, 2009) e amidas (Salazar et al., 2012), entre outras.

1.3. *Peperomia pellucida*

Entre as espécies de *Peperomia*, a *P. pellucida* (Figura 1.2) é a mais estudada, isso se dá principalmente por conta de sua ampla distribuição, aplicações na medicina popular e capacidade de adaptação a diferentes ambientes (Majumder, 2011). Existem cerca de 100 trabalhos referentes a estudos com a planta que incluem trabalhos com extratos brutos, óleos essenciais, estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Popularmente conhecida como “coraçãozinho”, “língua de sapo”, “erva de vidro” e “erva de jabuti” (Arrigoni-Blank et al., 2004), a planta é uma herbácea suculenta com folhas codiformes alternadas e inflorescências terminais em forma de espiga com diversos pontos de frutificação. Cresce principalmente em solos soltos, ambientes úmidos e preferencialmente nas sombras. Quando adulta a espécie chega a medir 40 cm de altura, tendo um ciclo de vida médio de oito meses (Majumder, 2011).

Figura 1.2. *Peperomia pellucida (L.) HBK*

O uso na medicina popular da planta varia dependendo da região. Existem relatos de seu uso no tratamento para dores abdominais, cólica, gota, fadiga, dor de cabeça, dor nas articulações tratamento de furúnculos, feridas na pele, problemas renais, hemorragias e inflamação nos olhos (Arrigoni-Blank et al., 2004; Bayma et al., 2000; Khan et al., 2008; Majumder, 2011). No Nordeste brasileiro a planta também é usada para controlar níveis de colesterol (dos Santos et al., 2001), no tratamento da tosse e diurético. Suas raízes são empregadas para o tratamento de febre e suas partes aéreas como cicatrizante (Munoz et al., 2000).

Ensaios biológicos confirmaram atividade bactericida (Bojo, 1994; Khan and Omoloso, 2002), antioxidante (Pappachen and Chacko, 2013) analgésica (Arrigoni-Blank et al., 2004; Aziba et al., 2001), atividade antiulcerogênica (Rojas-Martinez et al.; Roslida and Noor, 2009), citotóxica (Xu et al., 2006) e antiinflamatória (Arrigoni-Blank et al., 2004) para extratos brutos e substâncias puras.

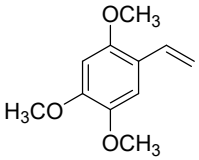
As partes aéreas da planta também são consumidas na forma de salada. As folhas são uma rica fonte de proteínas, nutrientes e minerais que ajudam na regulação da insulina e controle dos níveis de açúcares no sangue (Sussa et al., 2013; Olabanji et al., 2014; Ooi et al., 2012).

Modificações genéticas realizadas na *P. pellucida* mostram que a planta também pode ser empregada como modelo para produções de transgênicos para aplicações em tratamentos da diarréia (Nguyen et al., 2010).

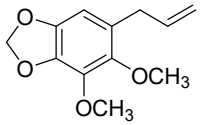
A *P. pellucida* tem como característica física o caule transparente e por isso, é utilizada como modelo para estudo da eficiência de sondas fluorescentes de complexos de Zn^{+2} "*in vivo*" (Dey et al., 2014; Sinha et al., 2013; Sinha et al., 2014).

Trabalhos referentes à composição química do óleo essencial das folhas da *P. pellucida,* coletadas em diversas partes do mundo, revelam a presença dos fenilpropanoides dilapiol e apiol como constituintes majoritários, além da presença de mono- e sesquiterpenos em menores percentuais (da Silva et al., 1999; François et al., 2013; Moreira et al., 1999; Ogunwande et al., 2009; Verma et al., 2014).

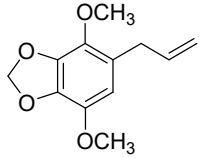
Estudos fitoquímico da *P. pellucida* relatam a presença de fenilpropanoides (Manalo et al., 1983), lignanas tetraidrofurânicas, secolignanas, lignanas furofurânicas (Oloyede, 2010; Xu et al., 2006), dinorlignanas (Bayma et al., 2000), flavonoides (Aqil, 1993) e cromenos (Susilawati, 2015) (Figura 1.3 e Tabela 1.1).



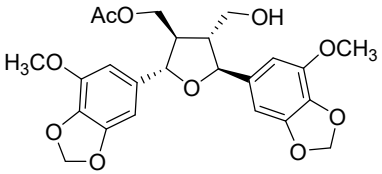
2,4,5-trimetoxi-estireno
(Manalo et al., 1983)



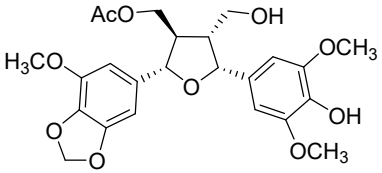
dilapiol
atividade fungicida e citotóxica
(Bayma et al.,2000; Chan, 2014)



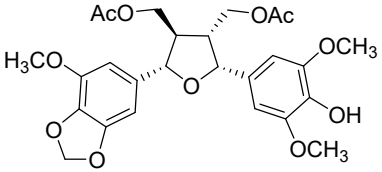
apiol
(Manalo et al., 1983)



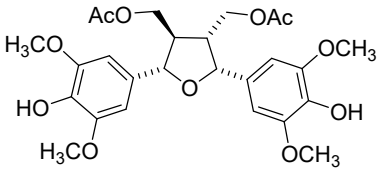
atividade citotóxica
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



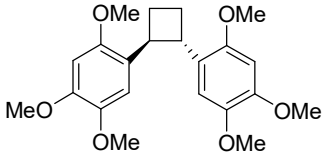
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



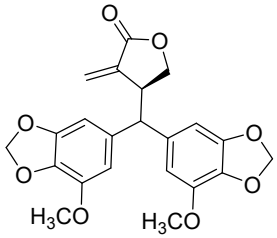
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



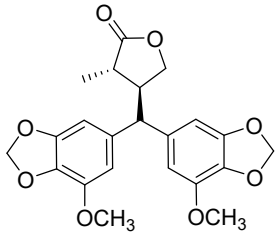
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



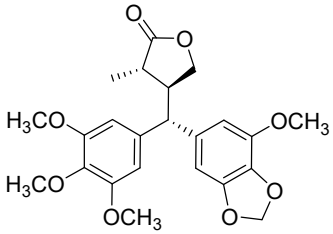
pellucidina A
atividade fungicida
(Bayma et al., 2000; Regasa et al., 1998)



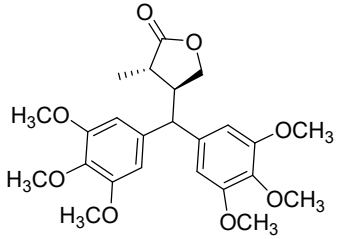
peperomia E
atividade citotóxica
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



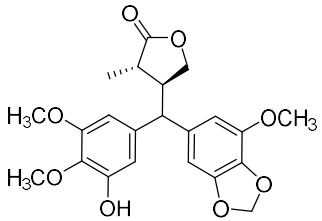
peperomina A
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



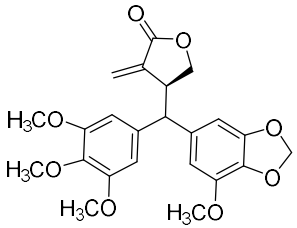
peperomina B
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



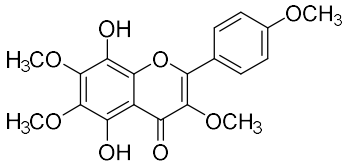
Peperomina C
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



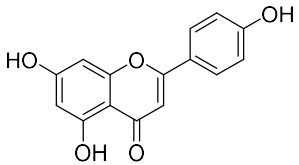
atividade citotóxica
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



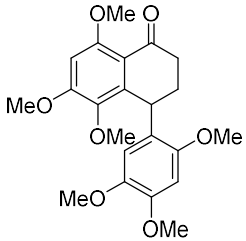
atividade citotóxica
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



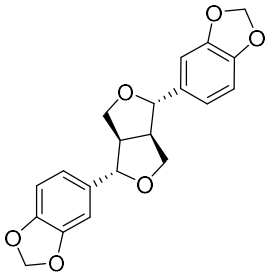
pellucidatina
(Aqil, 1993)



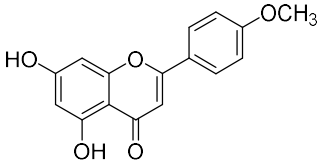
apigenina
(Aqil, 1993)



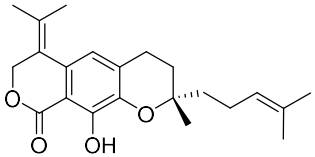
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



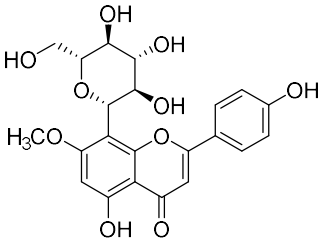
(+) sesamina
(Oloyede, 2010; Xu et al., 2006)



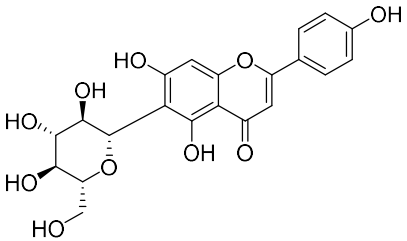
acacetina
(Aqil, 1993)



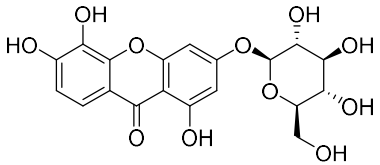
(Susilawati, 2015)



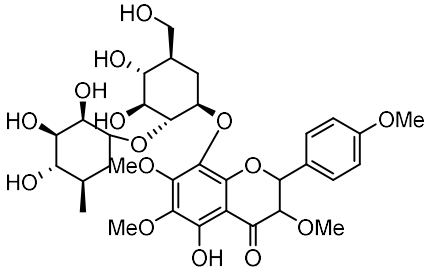
vitexina
(Pappachen and Chacko, 2013)



isovitexina
(Aqil, 1993)



patulosideo A
atividade bactericida, citotóxica e antifúngica
(Khan, 2010)



(Aqil, 1993)

Figura 1.3. Metabólitos secundários isolados em *Peperomia pellucida*.

Tabela 1.1. Constituintes majoritários encontrado nos óleos essenciais em *Peperomia pellucida*.

Parte	Constituintes majoritários nos óleos essenciais	Atividade biológica	Referências
(Planta inteira)	5-hidroxi-3,4-metilenodioxi-alilbenzeno (10,5%); dilapiol (36,9%)	-	Moreira et al., 1999
	dilapiol (55,3%); (*E*)-cariofileno (14,3%); carotol (8,1%)	Atividade larvicida sobre *Artemia salina* LC_{50}: 2.4 ± 0.5 µg/mL.	de Lira et al., 2009
	dilapiol (37,8%); miristicina (11,3%)	Atividade fungicida sobre *Fusarium moniliforme* (46.2%) e *Rhizopus stolonifer* (97.3%)	François et al., 2013
	dilapiol (39,7%); *trans*-cariofileno (10,7%)	-	da Silva et al., 1999
	germacreno D (14,9%)	-	dos Santos et al., 2001
	trans-3-pinanona (32,59%); metiletilideno propano dinitrila (18,56%); acetato de 3-octanila (13,12%)	Atividade antioxidante: método DPPH a 0.1 mg/mL (97.95%) e 0.2 mg/mL (98.61%.)	Oloyede, 2010
	dilapiol (55,3%); (*E*)-cariofileno (14,3%); carotol (8,1%)	-	de Lira et al., 2009
	decanal (22,8-44,4%); limoneno (28,7-35,0%)	-	Zoghbi et al., 2005
	(*E*)-nerolidol (38,0%); ledol (27,1%), *α*-humuleno (11,5%); (*E*)-cariofileno (4,0%); *α*-eudesmol (2,7%)	-	Pinheiro et al., 2011
	carotol (26,6–32,0%); dilapiol (25,1–30,2%)	-	Verma et al., 2014
Raiz	dilapiol (63,9%); apiol (9,2%)		
(Partes aéreas)	dilapiol (20,7%)		
	dilapiol (38,6); biciclogermacreno (10,7 %); germacreno D (9,6 %)	-	Ogunwande et al., 2009

1.4. PELLUCIDINA A

Entre os produtos naturais isolados de *P. pellucida*, a pellucidina A (**1**) (Figura 1.4) destaca-se em função da presença do anel ciclobutânico em sua estrutura.
Desde sua descoberta, a estrutura da pellucidina A foi motivo de contradições na literatura. A substância foi primeiramente isolada dos caules de *Pachypodanthium staudtii* (Anonnaceae) (Ngadjui et al., 1989) e denominada de pachipofilina. Quase dez anos depois a substância foi também isolada das folhas da *P. pellucida* e referenciada com o mesmo nome (Regasa, 1998). Porém, mesmo já tendo sido relatada em dois trabalhos, no ano 2000 a substância foi novamente isolada das partes aéreas da *P. pellucida* e erroneamente considerada como uma substância inédita, recebendo o nome de pellucidina A, nome pelo qual é conhecida atualmente (Bayma et al., 2000).

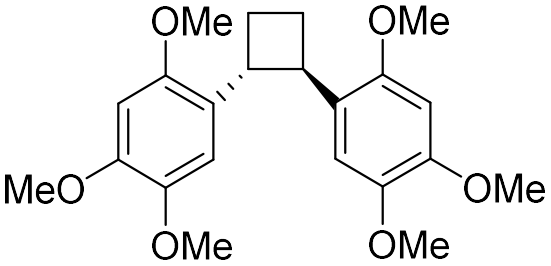


Figura 1.4. Estrutura da pellucidina A (**1**)

As lignanas são produtos naturais formados por duas unidades C_6C_3 unidas por meio dos carbonos C8-C8' (Haworth, 1936). Já o termo neolignana foi introduzido por Gottlieb (Gottlieb, 1978) que definiu a classe como dímeros de fenilpropanoides nos quais as duas unidades C_6C_3 são unidas por ligações diferentes das posições C8-C8'. De acordo com a IUPAC (Moss, 2000) as diferenças na estrutura básica das lignanas e neolignanas devem ser indicadas na nomenclatura com prefixos específicos. Por exemplo, a presença de anéis adicionais deve receber o prefixo "ciclo". A quebra de ligações carbono-carbono recebe o prefixo "seco". A adição de carbonos deve receber o prefixo "homo" e a remoção de um carbono requer o prefixo "nor"; dois carbonos "dinor" e assim por diante. Nesses casos o número do carbono ausente deve ser indicado. Desta forma a pellucidina A é classificada como uma 9,9'-dinor-lignana, na qual a numeração 9-9' se refere à ausência dos carbonos nessa posição caso fosse uma lignana regular.

1.5. PRODUTOS NATURAIS CONTENDO CICLOBUTANOS

Os ciclobutanos sempre despertaram grande interesse aos químicos orgânicos sendo amplamente utilizados como intermediários em sínteses (Hoffmann, 2008). A tensão angular e torcional dos anéis de quatro membros permitem sua conversão à cadeia acíclica por abertura do anel (energia liberada: 23-26 kcal mol^{-1}), expansão do anel para cinco ou seis membros (energia liberada 20 e 25 kcal mol^{-1}, respectivamente) ou até mesmo contração formando ciclopropanos (Lee-Ruff and Mladenova, 2003).

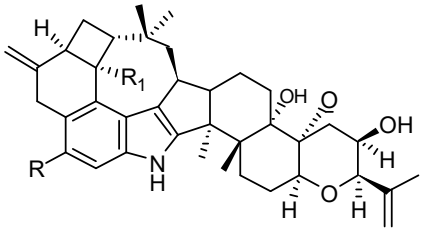
A formação desses compostos ocorre por meio de reação fotoquímica envolvendo 4n elétrons são definidas como reação de cicloadição [2+2]. São reações permitidas por via fotoquímica, mas não térmicas. Netas reações duas ligações π são rompidas e duas ligações σ são formadas. A incompatibilidade na adição de dois alquenos por via térmica está na simetria dos orbitais HOMO e LUMO dos dois alquenos. Esse problema é resolvido convertendo um deles ao estado excitado através de uma reação mediada por luz UV. O elétron excitado pela adição de luz passa do orbital π para o estado $\pi*$ e assim se obtém uma simetria que permite uma adição ao outro alqueno que se encontra no estado não excitado. Os mecanismos envolvidos nas cicloadições [2+2] ainda são motivos de debate. Em alguns casos são sugeridas reações concertadas e em outros na forma de dirradicais. A reação é favorecida quando estão envolvidos alquenos conjugados que facilitam a absorção de luz UV (Clayden et al., 2001).

A presença de ciclobutanos em produtos naturais é intrigante a respeito de sua finalidade e mecanismos envolvidos em sua formação (Hong and Tantillo, 2014). O trabalho de revisão realizado por Bach e Hehn (2011) relata uma grande variedade de sínteses totais de compostos naturais contendo aneis ciclobutânicos. A importância de reações fotoquímicas na síntese desses ciclobutanos foi enfatizada e a possibilidade desses mecanismos ocorrerem na natureza foram exploradas (Bach and Hehn, 2011).

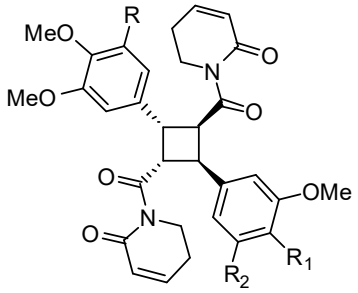
Os ciclobutanos de origem natural podem ser observados em diversas classes de substâncias como ácidos graxos, aminoácidos, mono-, sesqui-, di-, triterpenos, esteroides, alcaloides e lignanas. Esses produtos naturais são encontrados em fungos, insetos, organismos marinhos e principalmente em plantas (Figura 1.5) (Dembitsky, 2008; Hong and Tantillo, 2014; Sergeiko, 2008).

Artigos de revisão, direcionados às atividades biológicas desses ciclobutanos de origem natural, relatam a ocorrência de mais de 200 substâncias. Algumas

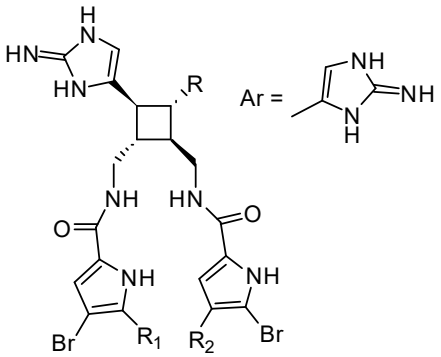
apresentam atividade citotóxica, antifúngica, anticancerígena, inseticida, antiinflamatória, propriedades fotoprotetoras, entre outras (Avotinsh, 1993; Dembitsky, 2008, 2014; Ortuno et al., 2005; Sergeiko, 2008).



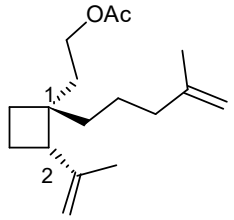
Penicillium ssp.
R = Cl, R_1 = OH penitreno A
R = R_1 = H penitreno B
R = H, R_1 = OH penitreno E
R = Cl, R_1 = H penitreno F



Piper ssp
R,R_1,R_2 =OMe dímero da piplartina
R,R_2 = H, R_1 = OMe piperarborenina A
R,R_1 = OMe, R_2 = H piperarborenina B
R = OMe, R_1,R_2 = OCH_2O



esponjas marinhas
R = Ar, R_1,R_2 = H esceptrina
R = Ar, R_1 = H, R_2 = Br bromoseceptrina
R = Ar, R_1,R_2 = Br dibromoesceptrina
R = CO_2H, R_1,R_2 = H ácido nakamurico



feromônio sexual de *Aspidiotus nerii*
(1*S*, 2*R*)- e (1*R*,2*S*)-cis-2-isopropenil-1-(4'-metil-4'-penten-1'-il)-ciclobutaneetanol acetato

Figura 1.5. Exemplos de produtos naturais contendo ciclobutanos isolados de fungos, plantas, organismos marinhos e insetos.

Alguns produtos naturais contendo anéis ciclobutânicos apresentam importância econômica como é o caso do (+)-grandisol (1*R*, 2*S*)-(+)-*cis*-2-isopropenil-1-metilciclobutiletanol (**2**) que atua como feromônio de agregação de algumas pragas agrícolas como *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro) (Tumlinson et al., 1969), *Tripodendron signatum* (Francke, 1986), *Pityophthorus pityographus* (Francke et al., 1989) *Pityogenes bidentaus, P. quadridens* e *P. calcaratus, Curculio caryae* (Hedin et al., 1997). O grandisol e o grandisal (**3**) têm propriedades de agregação sobre *Pissodes strobi* e *P. nemorensis* (Booth et al., 1983; Phillips et al., 1984). Outros análogos como o acetato de (1*R*, 3*R*)-(+)-*cis*-2,2-dimetil-3-isopropenil-ciclocutilmetanol (**4**), têm sido descrito como feromônio sexual do *Planacoccus citris* (cochonilha branca)

(Bierlleonhardt et al., 1981), bem como o acetato de (1*R*, 2*S*)-*cis*-2-isopropenil-1-(4'-metil-pent-4'-en-1-il)-ciclobutiletanol (**5**) como feromônio sexual da praga fitófaga *Aspidiotus nerii* (piolho branco) (Figura 1.6) (Moreno, 1972).

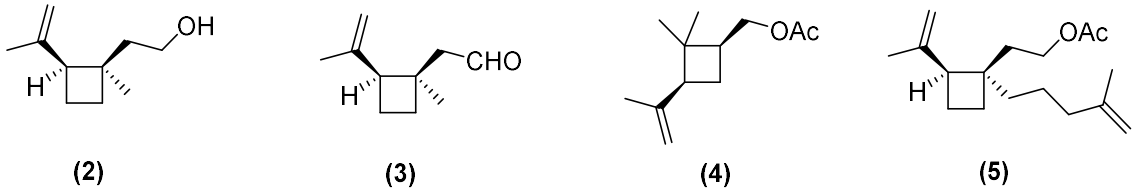


Figura 1.6. Exemplos de feromônio de agregação contendo anel ciclobutânico.

Os terpenoides contendo anéis ciclobutânicos como *α*-pineno (**6**), *β*-pineno (**7**), *β*-cariofileno (**8**), α-panasinseno (**9**), carioleno (**10**) e dendrowardol (**11**) também são de ocorrência comum em óleos essenciais de diversas plantas e apresentam funções ecológicas, principalmente na proteção contra herbívoros (Figura 1.7) (Hong and Tantillo, 2014; Wang and Tantillo, 2008).

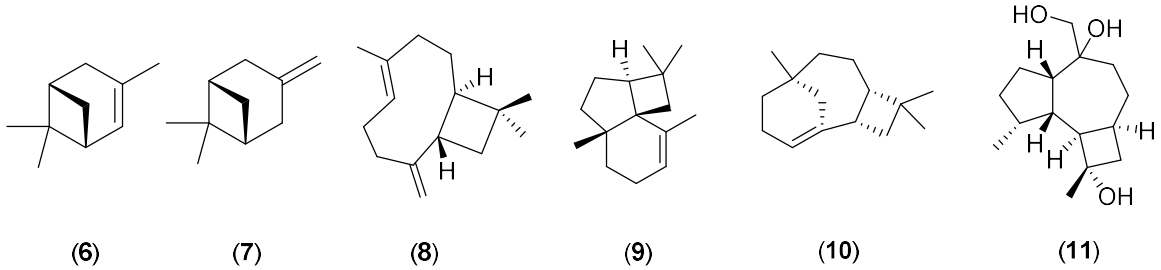


Figura 1.7. Exemplos de terpenoides contendo anel ciclobutânico.

A formação de ciclobutanos por mecanismo intermolecular pode gerar diferentes isômeros. Os dímeros ciclobutânicos de ácido cinâmico, ácido truxínico e truxílico, isolados da parede celular de gramíneas são dois bons exemplos de isômeros constitucionais que podem ser formados durante a dimerização dos ácidos. As duas unidades de ácido cinâmicos são unidas por ligações entre os carbonos C7-C7' e C8-C8'. Os ácidos truxínico e truxílico se diferenciam em seu modo de acoplamento, sendo o primeiro resultante do acoplamento cabeça-cabeça com os grupos iguais, arila e carboxila, ligados a carbonos vicinais. No caso do ácido truxílico o acoplamento é do tipo cabeça-cauda e os grupos arila e carboxila encontram-se em posições 1-3 no anel de quatro membros. Os estudos não relatam estereosseletividade na formação desses compostos e várias formas isoméricas (*E*/*Z*) desses ácidos podem ocorrer dependendo da orientação relativa dos materiais de partida (Figura 1.8) (Baranowska, 2002; Bassani, 2004; Natarajan and Ramamurthy, 2005).

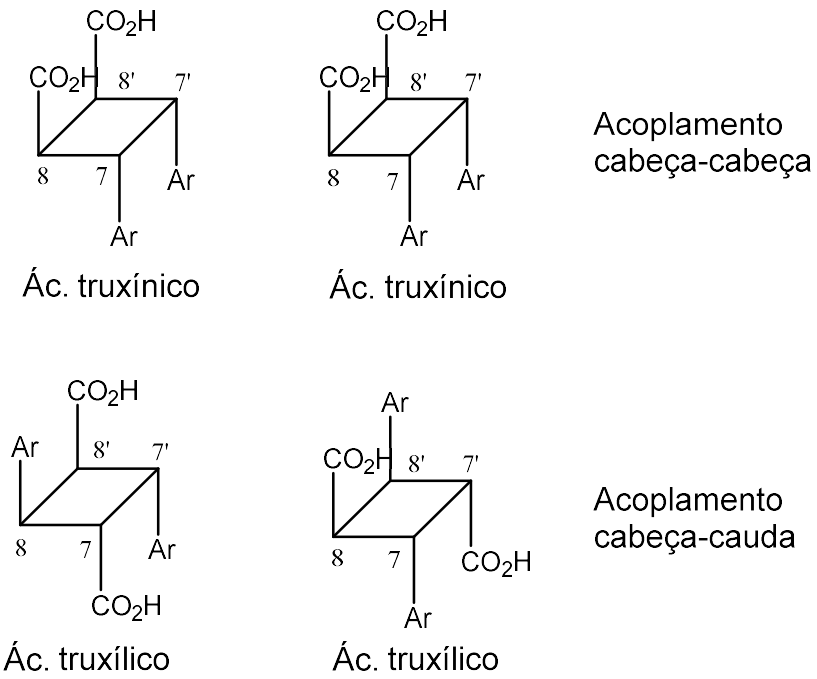
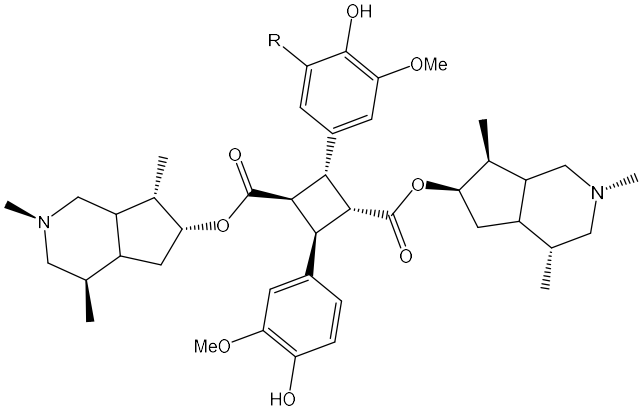


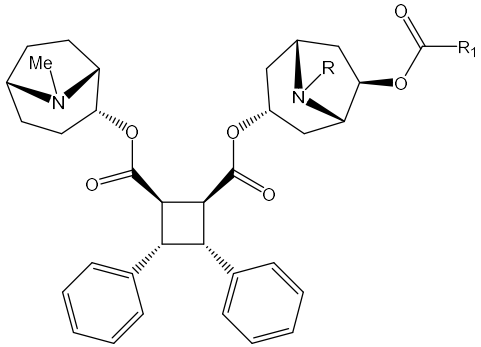
Figura 1.8. Configuração cabeça-cabeça e cabeça-cauda dos ácidos truxínico e truxílico.

Os ácidos truxínico e truxílico são estruturas básicas presentes em diversos alcaloides. O estabelecimento das configurações destes ácidos auxilia na determinação da configuração desses alcaloides (Figura 1.9) (Baranowska, 2002; Hanley et al., 1993).

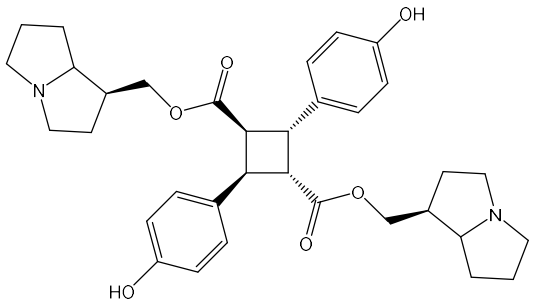
Os alcaloides são responsáveis pela maior diversidade estrutural de ciclobutanos encontrados na natureza. Os anéis de quatro membros são encontrados em diversos tipos de alcaloides como alcaloides contendo amida, tropânicos, quinolínicos, terpênicos, indólicos, pirrolizidínicos, bromopirrolizidinicos entre outros (Dembitsky, 2008).



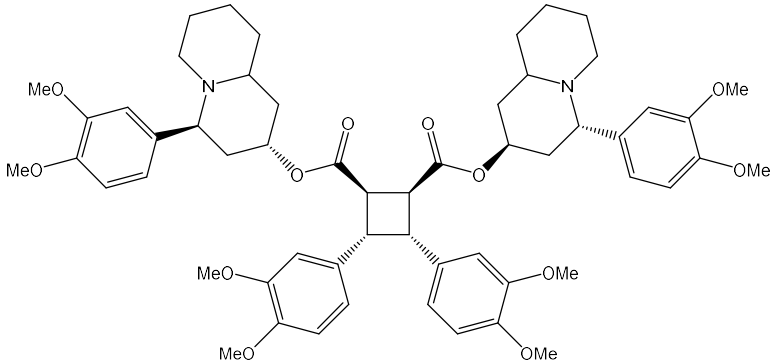
R= H incarvilateina
R = OMe metoxiincarvilateina
(*Incarvillea sinensis*)



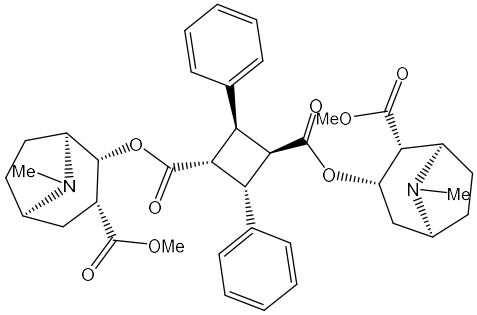
R = H, R_1 = CH_2CH_3 mooniina A
R = CH_3, R_1 = CH_3 mooniina B
(*Erythroxylum moonii*)



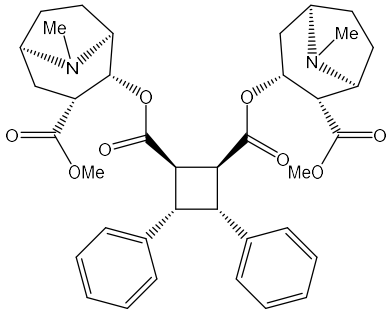
Tesina
(*Thesium minkwizianum*)



sarusubina A
(*Lagerstroemia subcostata*)



α-truxílina
(*Erythroxylon truxillense*)



β-truxílina
(*Erythroxylon truxillense*)

Figura 1.9. Alcaloides derivados dos ácidos truxínico e truxílico.

A presença de anel ciclobutânico em lignanas, neolignanas e norlignanas são de rara ocorrência na natureza (Riener and Nicewicz, 2013). Além da pellucidina A, são relatados a endiandrina A (**12**), o diacetato de endiandrina A (**13**), dimetilediandrina A (**14**) isolados da raiz de *Endiandra anthropophagorum* (Davis et al., 2007), magnosalina (**15**) isolada das folhas de *Flos magnoliae, Mosla scabra* e *Piper cubeba* (Badheka et al., 1987; Kikuchi et al., 1983; Wang et al., 2000), cinbalansana (**16**) isolada nas folhas de *Cinnamomum balansae* (Cuong et al., 2001), heterotropano (**17**) isolado das folhas de *Heterotropa takaoi* e *Piper cubeba* (Badheka et al., 1987; Yamamura et al., 1978), andamanicina (**18**) presente em *Piper sumatranum* e *Mosla scabra* (Malhotra et al., 1990; Wang et al., 2000), o ácido antocerotônico (**19**) isolado de *Anthoceros puncfatus* (Takeda et al., 1990), peperotetrafina (**20**) e outros dois estereoisômeros (**21-22**) presentes no extrato etanólico de *Peperomia tetraphylla* coletada na China (Li et al., 2007; Li et al., 2012) e as moslolignanas A (**23**) e B (**24**) isoladas da *Mosla scabra* (Wang et al., 2000) (Figura 1.10).

Os mecanismos envolvidos na formação dos ciclobutanos de ocorrência natural ainda são motivos de debates. Um dos casos mais estudados ocorre no tecido celular, onde muitas moléculas podem absorver radiação UV quando expostas. Em particular, o caso do DNA das células que absorvem radiação UV em curtos comprimentos de ondas, resultando em vários tipos de danos ao DNA. Entre os fotoprodutos produzidos, os ciclobutanos dímeros de pirimidina são predominantes. Estes fotoprodutos são responsáveis por lesões que interferem em mecanismos celulares essenciais, como replicação e transcrição, e a sua persistência pode originar mutações, que interferem nas funcionalidades das células, levando à morte celular, degeneração de tecidos envelhecimento, instabilidade genômica e processos carcinogênicos (Costa et al., 2003; Wondrak et al., 2006).

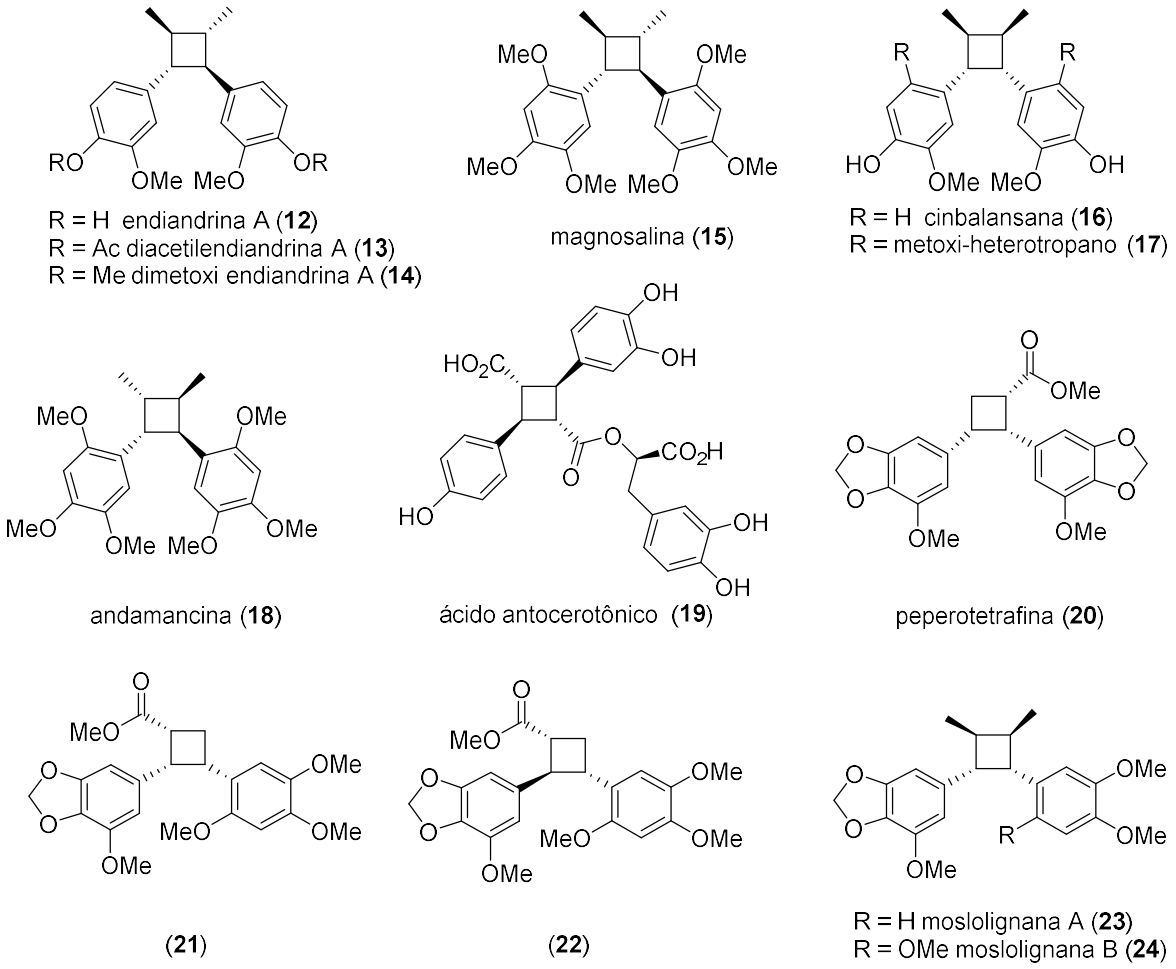


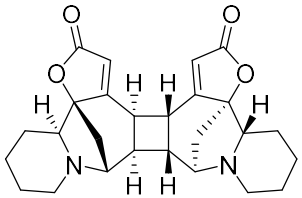
Figura 1.10. Lignanas, neolignanas e produtos naturais relacionados contendo anel ciclobutânico.

Os mecanismos de cicloadição [2+2] envolvidos na formação dos dímeros de pirimidina servem de suporte para que os mecanismos envolvidos na formação intra- e intermoleculares de diversos ciclobutanos sejam sugeridos. Incluem-se como exemplos as lignanas (**12-23**), a fluegedina (**24**) (Zhao et al., 2013), bismutipterosina (**25**) (Liu et al., 2011), ortidina E (**26**) (Pearce et al., 2008), quasidina A (**27**) (Jiao et al., 2010), oxifadichalconas A (**28**), B (**29**), C (**30**) (Zhang et al., 2013), crotoeurina A (**31**) (Pan et al., 2015), piperciclobutanamida A (**32**), piperchabamida G (**33**), nigramidas (**34**) e dipiperamida A (**35**), E (**36**), piperarborenina B (**37**) D (**38**) (Liu et al., 2012), salascona (**39**) (Fujimori et al., 1978), bielschowkskisina (**40**) (Tang et al., 2015), hipolachinina A (**41**) (Piao et al., 2013) e ácido escopariusico (**42**) (Zhou et al., 2013) (Figura 1.11).

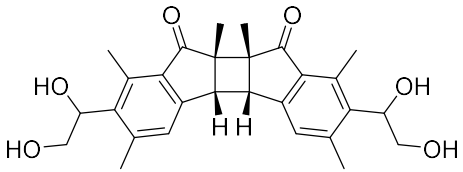
A biossíntese dessas substâncias contendo anéis ciclobutânicos encontradas em plantas é prevista como sendo resultante de cicloadição [2+2], que ocorrem em função da alta intensidade de luz solar em seus habitats (Bach and Hehn, 2011; Hong

and Tantillo, 2014; Liu et al., 2011; Pan et al., 2015; Tan et al., 2006; Tang et al., 2015; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2013).

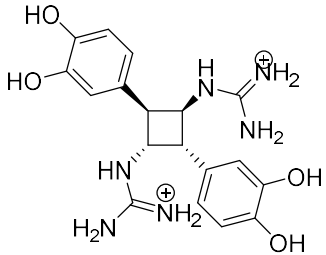
Outros autores propõem que a biossíntese desses ciclobutanos deve ocorrer através de mecanismos mediados por enzimas (Hao et al., 2001). Além disso, estudos teóricos vêm sendo realizado com o objetivo de decifrar os mecanismos envolvidos na formação desses compostos (Bach and Hehn, 2011; Hoffmann, 2008; Hong and Tantillo, 2014; Ortuno et al., 2005; Rappoport, 2005; Sergeiko, 2008). Porém, poucos trabalhos foram realizados a fim de se investigar os mecanismos envolvidos na formação desses compostos.



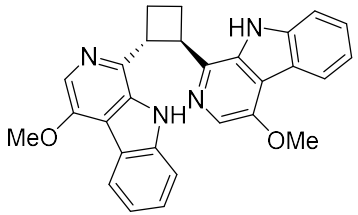
fluegedina (**24**)
(*Flueggea virosa*)



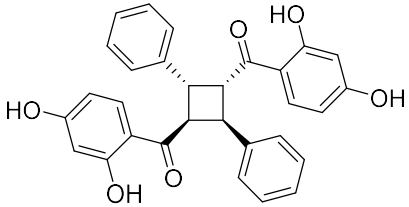
bismutipterosina (**25**)
(*Pteris mutifida*)



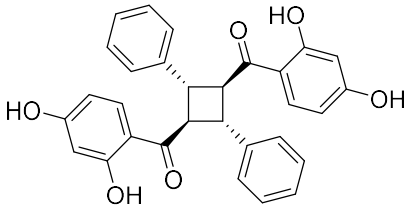
ortidina E (**26**)
(*Aplidium orthium*)



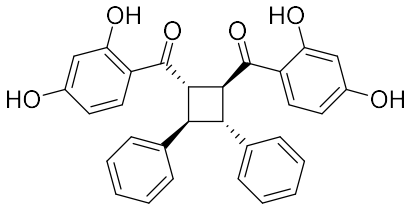
quassidina (**27**)
(*Picrasma quassioides*)



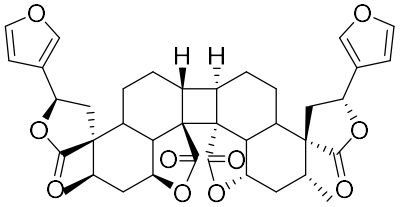
oxifadichalconas A (**28**)
(*Oxytropis falcata*)



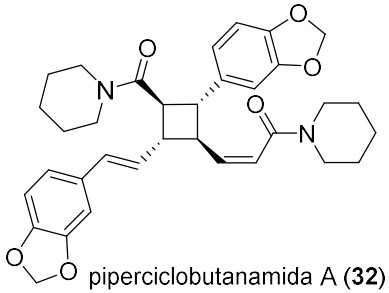
oxifadichalconas B (**29**)
(*Oxytropis falcata*)



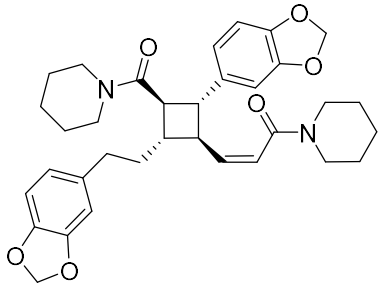
oxifadichalconas C (**30**)
(*Oxytropis falcata*)



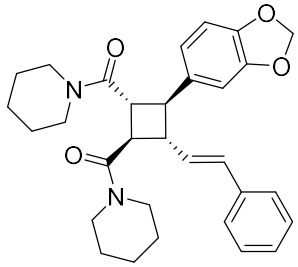
crotoeurina A (**31**)
(*Croton euryphyllus*)



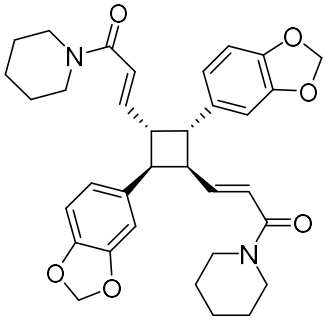
piperciclobutanamida A (**32**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



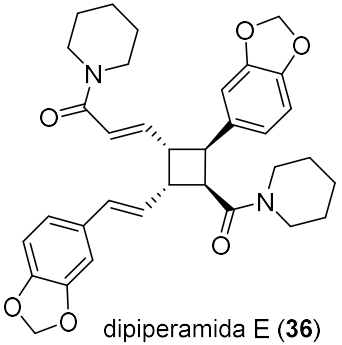
piperchabamida G (**33**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



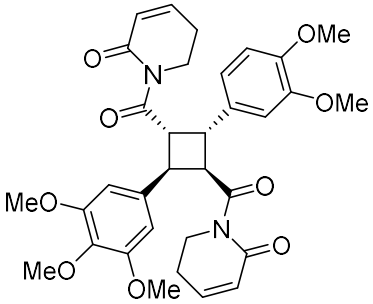
nigramida Q (**34**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



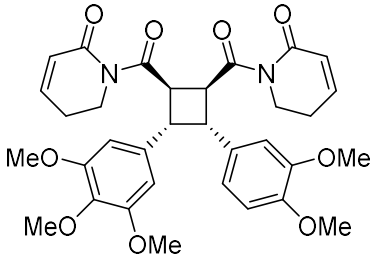
dipiperamida A (**35**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



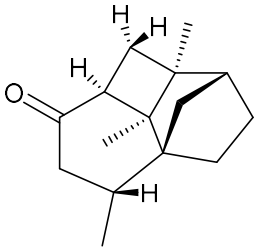
dipiperamida E (**36**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



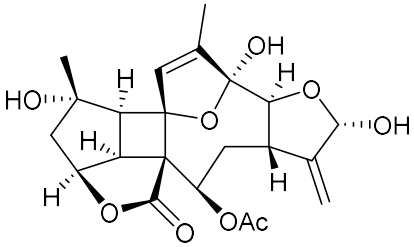
piperaborenina B (**37**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



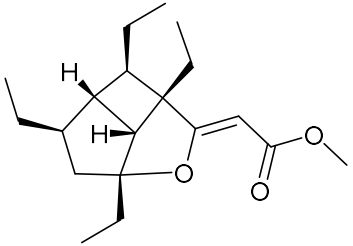
piperarborenina D (**38**)
(*Piper nugrum* e *P. chaba*)



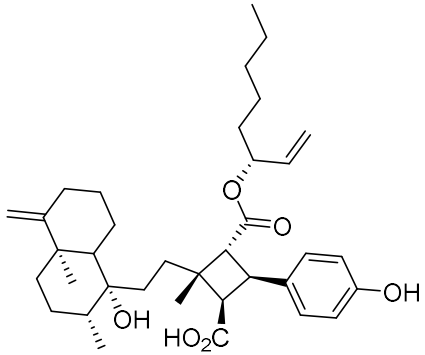
salascona (**39**)
(*Nicotiana tabacum*)



bielschowkskisina (**40**)
(*Pseudopterogorgia kallos*)



hippolachinina A (**41**)
(*Hippospongia lachne*)



ácido escopariusico (**42**)
(*Isodon scoparius*)

Figura 1. 11. Ciclobutanos considerados como produtos de cicloadição [2+2].

1.6. BIOSSÍNTESE DE LIGNANAS, NEOLIGNANAS E NORLIGNANAS

A biossíntese representa a intersecção da química com a biologia molecular. Uma vez elucidada a estrutura de um composto, é possível propor sua biogênese, a partir de blocos construtores, tais como: acetato, mevalonato, chiquimato, aminoácidos e produtos oriundos de rotas mistas (Dewick, 2001; Mann, 1995).

As lignanas, neolignanas e norlignanas se constituem em classes estruturalmente diversificadas de metabólitos resultantes da via do chiquimato. Essas substâncias são formadas a partir da dimerização de fenilpropanoides, que também estão envolvidos na formação dos polímeros como as ligninas, que são de importância protetora e estrutural para as plantas (Klink et al., 2007).

Tanto as lignanas quanto as neolignanas tem como estrutura básica duas unidades de C_6C_3. Nas lignanas os monômeros de fenilpropanoides são ligados pelos carbonos C8-C8' e nas neolignanas estas ligações envolvem posições diferentes de C8-C8'. As norlignanas apresentam uma cadeia estrutural básica contendo C_6C_2 ligado a C_6C_3. Essas classes de metabólitos foram descritas na década de 40, mas apenas na década de 90 sua biossíntese começou a ser desvendada (Suzuki and Umezawa, 2007; Umezawa et al., 2011).

A biossíntese de lignanas, neolignanas e norlignanas é de grande interesse pelo fato de vários desses compostos apresentarem importantes atividades biológicas. Além do mais, suas reações biossintéticas envolvem mecanismos enantiosseletivos gerando metabólitos opticamente ativos. A elucidação desses mecanismos é de grande interesse para desenvolvimento de novos sistemas em sínteses enantiosseletivas (Anterola and Lewis, 2002; Dewick, 2001; Gang et al., 1999).

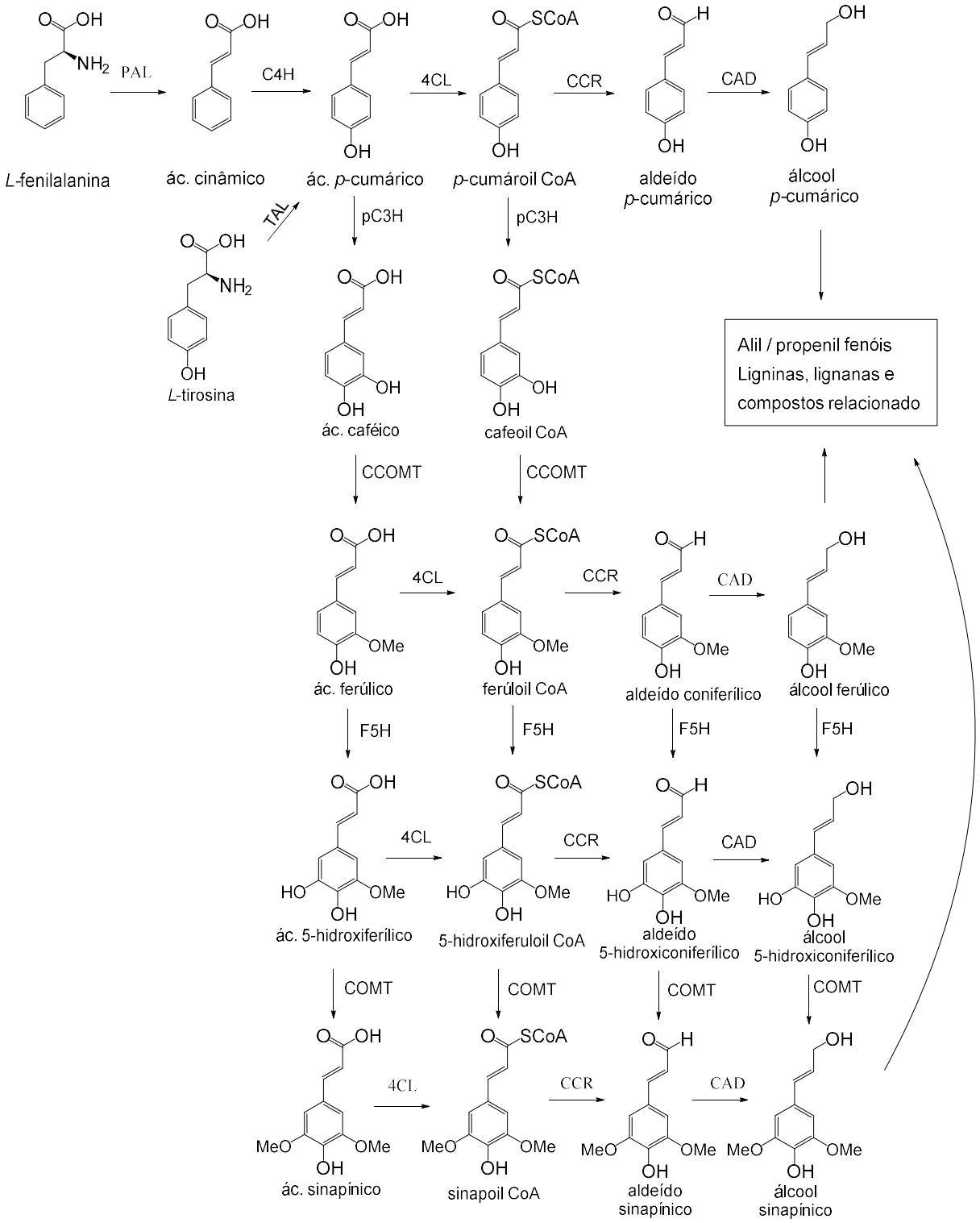
As lignanas, neolignanas e norlignanas têm como precursores os aminoácidos *L*-fenilalanina ou *L*-tirosina, produtos finais da via do ácido chiquímico. A primeira etapa desta via é a desaminação da *L*-fenilalanina pela enzima PAL (fenilalanina amônia-liase) formando o ácido cinâmico. A enzima ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) catalisa a introdução do grupo hidroxila na posição 4 (para) no anel aromático do ácido cinâmico, produzindo o ácido *p*-cumárico. O grupo carboxílico do ácido *p*-cumárico é ativado pela ligação com o tioéster-CoA, catalisada pela enzima hidroxicinamato CoA ligase (4CL) (Esquema 1.1). Outras enzimas mediam etapas de hidroxilações, metilações e reduções fornecendo aldeídos e alcoóis cinamílicos com diferentes substituintes e, por redução destes, resultam na formação de diversos fenilpropanoides que são os precursores diretos das ligninas, neolignanas, norlignanas

e compostos relacionados (Dewick, 2001; Dixon et al., 2001; Dixon, 2003; Ferrer et al., 2008).

As lignanas, neolignanas e norlignanas têm como precursores metabólitos de origem fenilpropanoidica, que sob controle assimétrico induzido por proteínas, formam dímeros opticamente ativos como o pinoresinol, que é intermediário para a biossíntese de uma variedade de lignanas (Halls and Lewis, 2002).

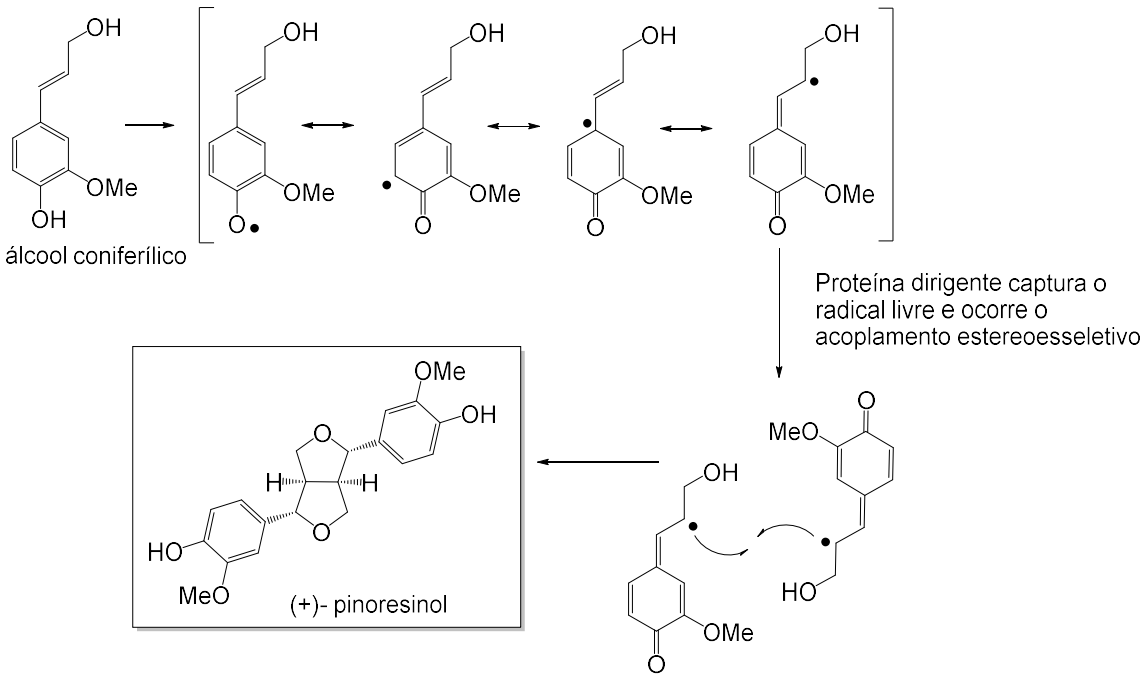
O principal mecanismo para a formação das lignanas e compostos relacionados envolve acoplamento oxidativo de alil e/ou propenilfenois, no qual radicais fenóxidos são iniciados por oxidases através de catálise oxidativa monoeletrônica (Gottlieb, 1989).

O controle estéreo- e enantiosseletivo é mediado pela ação de enzimas especificas e só foi compreendida com maior clareza ao ser isolada a primeira representante de uma classe de proteínas denominada de proteína dirigente, a partir de *Forsythia intermedia* (Davin and Lewis, 2000; Davin et al., 1997; Gang et al., 1999; Halls and Lewis, 2002; Ralph et al., 2006; Ralph et al., 2007).



Esquema 1.1. Rota biossintética de monolignóis, álcool *p*-cumárico, coniferílico e sinapílico. *p*-C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; CAD, cinamil álcool desidrogenase; CCOMT, hidroxicinamil CoA O-metiltransferases; CCR, cinamil-CoA oxidoredutase; 4CL, hidroxicinamoil CoA ligase; COMT, ácido cafeico O-metiltransferases; F5H, ferulato 5-hidroxilase; PAL, fenilalanina amônia-liase; TAL, tirosina amônia-liase.

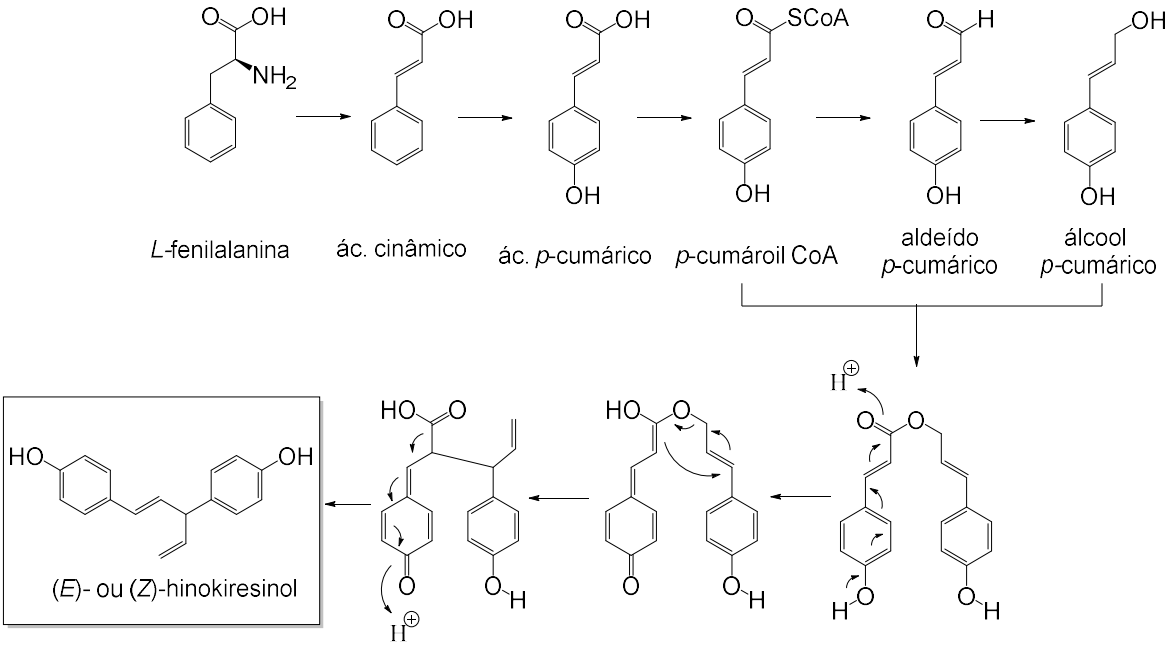
Estudos de cinética para formação do (+)-pinoresinol indicaram que a proteína dirigente atua de maneira muito singular em que, primeiro, uma oxidase gera radicais livres intermediários a partir do álcool (*E*)-coniferílico, seguido por acoplamento estereosseletivo formando como produto o (+)-pinoresinol (Davin and Lewis, 2000; Davin et al., 1997) (Esquema 1.2). As proteínas dirigentes determinam a estereosseletividade do acoplamento fenóxi-radicalar. O controle estereosseletivo para a formação do (+)-pinoresinol para esta proteína tem sido estendido, desde então, para descrever o controle regioespecífico do acoplamento oxidativo de alilfenois na biossíntese de lignanas, neolignanas e norlignanas (Davin and Lewis, 2000; Gang et al., 1999).



Esquema 1.2. Acoplamento enantiosseletivo do (+)-pinoresinol auxiliado por proteína dirigente.

Na biossíntese de norlignanas além de todas as etapas que envolvem a formação de lignanas e neolignanas é verificada uma etapa adicional que culmina com a eliminação de um ou mais carbonos.

A biossíntese dos isômeros (*E*)- e (*Z*)-hinokiresinol é o caso de norlignana mais estudado. A formação do hinokiresinol resulta do acoplamento entre uma unidade de álcool 4-hidroxi-cumarilico e uma unidade de ácido 4-hidroxi-cumárico seguido de rearranjo e descarboxilação (Esquema 1.3) (Suzuki and Umezawa, 2007; Suzuki et al., 2001).

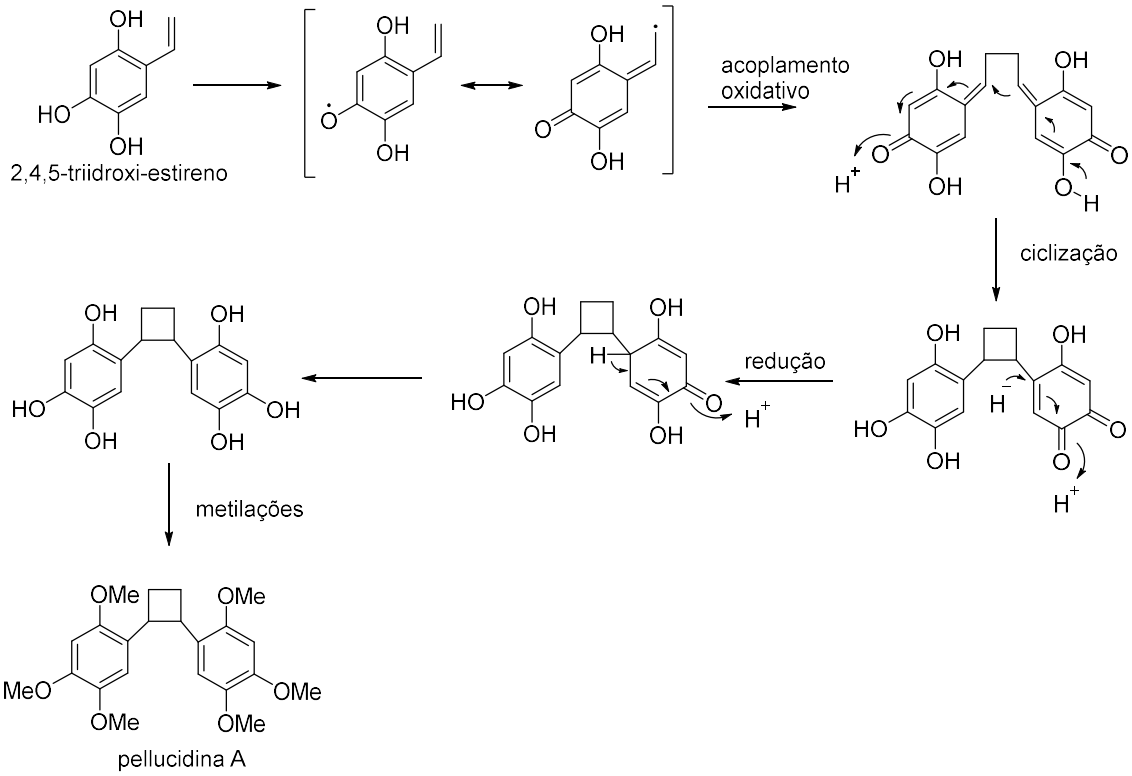


Esquema 1.3. Mecanismo de formação do (*E*)- e (*Z*)-hinokiresinol

No caso da pellucidina A uma das possibilidades para a formação do anel ciclobutânico seria por meio de uma dimerização entre duas unidades de 2,4,5-trimetoxi-estireno através de uma cicloadição [2+2]. Essa hipótese é suportada pelo fato da co-ocorrencia da pellucidina A e do 2,4,5-trimetoxi-estireno tanto em *P. staudtii* quanto em *P. pellucida.*

Porém, em sua publicação Bayma e colaboradores (Bayma et al., 2000) descartam a hipótese alegando que a presença das metoxilas nas posições 2/2' dos anéis aromáticos causariam um impedimento estérico, inviabilizando a aproximação dos dois monômeros. Os autores ainda propõem que a formação do anel ciclobutânico deva ocorrer por meio de acoplamento oxidativo de duas unidades de 2,4,5-triidroxi-estireno, seguido por uma serie de metilações, formando então a pellucidina A (Esquema 1.4).

Devido ao fácil cultivo de *P. pellucida* e do fato de que nenhuma das propostas de formação da pellucidina A terem sido comprovadas, o presente trabalho tem como objetivo determinar precursores, intermediários e os mecanismos envolvidos na formação da pellucidina A em *P. pellucida.*



Esquema 1.4. Proposta biossintética da pellucidina A (Bayma et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo investigar as hipóteses biossintéticas de formação da dinorlignana pellucidina A produzida pela *Peperomia pellucida*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença da pellucidina A em diferentes partes da *P. pellucida*;
- Caracterizar o maior número de metabólitos da *P. pellucida* e diante da presença destes propor alternativas biossintéticas para a formação da pellucidina A;
- Monitorar possíveis variações na produção da pellucidina A em *P. pellucida* em função de sua ontogenia;
- Determinar variações na produção da pellucidina A na *P. pellucida* sob diferentes tratamentos;
- Preparar possíveis precursores marcados e não marcados isotopicamente para realização dos estudos biossintéticos da pellucidina A;
- Avaliar as hipóteses biossintéticas para a formação da pellucidina A através da administração de precursores marcados de caráter geral e intermediário da via fenilpropanoídica em folhas de *P. pellucida* e por meio de estudo de conversão com frações enzimáticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. TRATAMENTO DOS REAGENTES E SOLVENTES

Acetato de etila (AcOEt) hexano, clorofórmio ($CHCl_3$) e ácido fórmico foram adquiridos da LabSynth (SP, Brasil). Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (grau HPLC) foram obtidos da J.T. Baker (EUA). Os solventes foram destilados na Central de Solventes do Instituto de Química – USP. O clorofórmio deuterado utilizado nas análises de RMN de ^{1}H foi adquirido junto a Tedia Brazil. Os precursores isotopicamente marcados ácido [2-^{13}C]-malônico e iodo-[^{13}C]-metano foram adquiridos junto a Sigma Aldrich.

Todas as reações foram realizadas em vidraria secadas em estufa (temperatura ≥100ºC) e resfriadas em dessecador. A água dos solventes utilizados foi removida segundo metodologias descritas na literatura (Armarego and Chai, 2003). Tetraidrofurano (THF) foi refluxado e destilado com sódio/benzofenona sob atmosfera de N_2, diclorometano (CH_2Cl_2), trietilamina (Et_3N) e piridina foram refluxados e destilados de hidreto de cálcio (CaH_2) sob atmosfera de N_2. A água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Nas análises cromatográficas e espectroscópicas foram utilizados solventes de grau analítico (Merck®, Tedia® e J.T. Baker®) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®). Os reagentes obtidos comercialmente com alto grau de pureza, foram utilizados sem purificação prévia.

3.2. EQUIPAMENTOS

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em aparelho Shimadzu modelo SCL-10Avp, equipado com duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10Avp e um injetor automático modelo SIL-9A, controlados por um módulo de comunicação SCL-10AVP. As análises foram realizadas em coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 (Luna C-18 150 x 4,6 mm, 5 µm) e os dados analisados pelo programa Class-VP versão 6.10.

Todas as amostras foram dissolvidas em metanol (grau HPLC), levando-os a uma concentração de 1 mg/mL e filtrados em filtro de 0,45 µm (Acrodisc CR. PTFE) para remoção de partículas insolúveis. O volume de injeção foi 20 µL. A eluição em HPLC foi feita utilizando-se gradiente de concentração de solventes (Tabela 3.1), que permitiu uma melhor resolução dos componentes dos extratos e assim foi mantida na injeção de todas as amostras.

Tabela 3.1. Gradiente de eluição no CLAE dos extratos clorofórmico.

Solventes	Tempo (min.)	%B
	0-2	30
	10	40
A. Água + 0,01% ácido fórmico	45	100
B. Acetonitrila + 0,01% ácido fórmico	50	100
	55	30
	60	30

3.2.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ - USP). As análises de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C foram feitas nos equipamentos Bruker DPX 300 (300 MHz RMN ^{1}H, 75 MHz RMN ^{13}C) ou Bruker DRX 500 (500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C). Os valores de deslocamentos químicos (δ) são mostrados em ppm. O espectro de ^{1}H é relatado como se segue δ (multiplicidade, constante de acoplamento J, número de hidrogênios e atribuição). A multiplicidade é indicada por s (singleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto); ddd (duplo duplo dupleto), t (tripleto), q (quarteto), quint. (quinteto), sext. (sexteto) e m (multipleto). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (“electrospay”, modo positivo) (CLAE/EM-ESI)

Os extratos provenientes das incorporações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas

(CLAE/EM). Na análise por CLAE, o detector utilizado foi por arraste de diodos modelo Shimadzu SPD-M10Avp. Os dados foram analisados pelo programa de computador Class-VP versão 6.10. A análise por espectrometria de massas foi realizada em um equipamento da Bruker, Esquire 2000 plus em modo “electrospray” positivo, voltagem do capilar 4,5 kV e do skimmer 40 eV.

3.2.4. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas utilizando um cromatógrafo à gás modelo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, equipado com um alto injetor AOC-5000 Plus. O sistema foi operado em modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV em uma coluna Rxi®-5ms (Crossbond® 5% diphenyl / 95% dimethylpolysiloxane) de 10 m x 0,10 mm ID x 10 µm df. A temperatura de injeção foi de 250°C e as amostras foram eluídas em uma rampa de programada de 40 a 280 °C a uma taxa de 25° $Cmin^{-1}$. O gás Helio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 0,56 mL min^{-1} em modo split (1:30).

3.2.5. Cromatografia planar analítica e preparativa

As análises por CCDA foram efetuadas em placas da Merck®, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F_{254}, com suporte em alumínio de espessura 0,2 mm. As análises em CCDP foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 x 20 cm, espessura de 1,0 mm de sílica gel 60 da Merck® e indicador de fluorescência PF_{254}. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta com comprimentos de onda 254 e 366 nm e/ou nebulizadas com solução de solução de vanilina sulfúrica (5,1 g de vanilina, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 800 mL de etanol), seguida de aquecimento.

3.2.6. Cromatografia planar preparativa radial (cromatotron)

Para a cromatografia em cromatotron foram utilizadas placas de vidro redondas, recobertas com uma camada de 2,0 mm de espessura de sílica Kieselgel 60 PF254, contendo gesso. As amostras (cerca de 50 mg) foram solubilizadas em hexano: acetato de etila, aplicadas na parte central da placa e as frações foram recolhidas na borda em

erlenmeyers. As revelações das substâncias foram realizadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.2.7. Cromatografia de coluna

A purificação de substâncias através de cromatografia de coluna foi realizada em cromatografia em coluna (CC) de vidro, com comprimento e diâmetro de acordo com as massas de amostras a serem fracionadas. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 HF_{254} (70-230 mesh ASTM) da Merck® e sílica de fase reversa C18. A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

3.3. MATERIAL VEGETAL

Os espécimes de *P. pellucida* foram cultivados durante todo o desenvolvimento do projeto no Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ – USP em substrato comercial colocados em potes plásticos e mantidos em estufas sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 ºC) e fotoperíodo (12 horas) (com lâmpadas fluorescentes de 85 W).

3.4. ESPÉCIES DE INSETOS USADOS NOS EXPERIMENTOS DE HERBIVORIA

No cultivo de *P. pellucida* mantidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ – USP são comumente encontrados três espécies de predadores naturais da planta *Edessa meditabunda* (Hemiptera), *Monoplatus* sp. (Coleoptera) e Geometridae sp. (Lepidoptera) (Figura 3.1) que foram coletados e utilizados nos experimentos de estresses bióticos da planta.

Monoplatus sp.

Geometridae sp.

Edessa meditabunda

Figura 3.1. Predadores naturais de *P. pellucida* utilizados nos experimentos de estresses.

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS PARA ANÁLISE METABOLÔMICA

As folhas das plantas adultas e plântulas foram congeladas imediatamente após a coleta utilizando N_2 líquido, trituradas em almofariz e pistilo até obter um pó fino que foi transferido para eppendorf de 2 mL. A extração foi realizada com um sistema de 3 solventes, clorofórmio:metanol:água na proporção 2:1:1, 500 µL de clorofórmio, 250 µL de metanol e 250 µL de água. A seguir foram agitados em vortex durante 5 minutos e centrifugados a 10000 rpm a 0°C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, as fases foram separadas. O procedimento de extração foi repetido e as fases iguais foram reunidas. Todo o procedimento foi feito mantendo-se as amostras a baixa temperatura. A fração clorofórmica foi seca utilizando-se um fluxo de nitrogênio gasoso, enquanto o extrato aquoso foi seco em SpeedVac.

3.6. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *P. PELLUCIDA*

Partes aéreas frescas de *P. pellucida* (500g) foram extraídas da mesma forma citada acima e após concentração a vácuo obteve-se 4 g de extrato bruto que foi suspendido em MeOH:H_2O (1:4, 400ml) depois filtrado em um funil de vidro sinterizado contendo celite (2/3 v/v). Em seguida o filtrado foi extraído com $CHCl_3$ (3 x 150mL) em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e em seguida concentrada e em rota-evaporador produzindo um extrato (7g) livre de clorofila. Parte desse extrato foi fracionado em coluna de sílica, eluída com hex:AcOEt (9:1) aumentando até AcOEt puro e daí misturas eluída com AcOEt:MeOH (9:1) aumentando até MeOH, resultando em 25 frações. Estas frações foram reunidas e purificadas usando-se Coluna Cromatográfica Preparativa e Cromatotron (Figura 3.2).

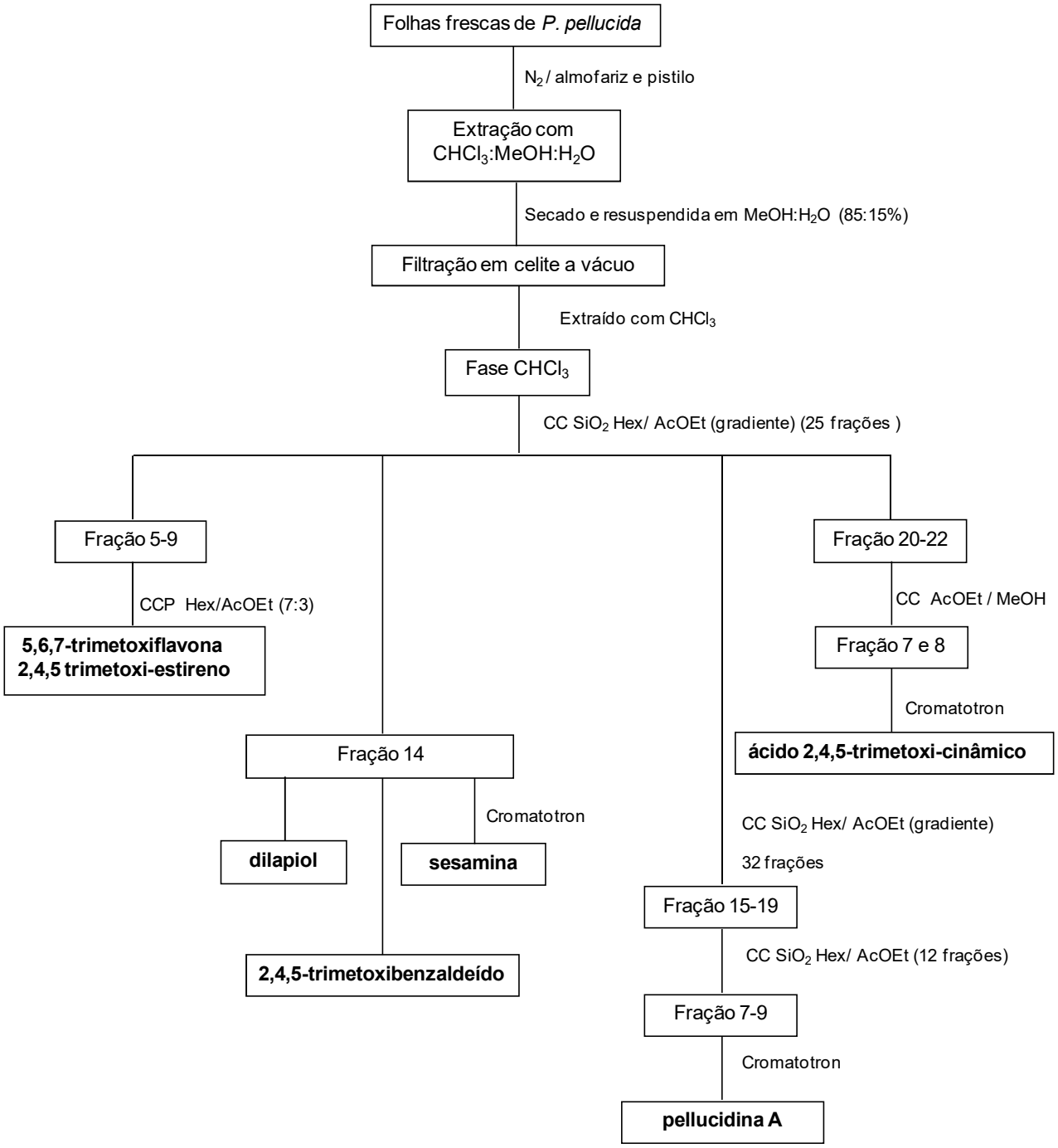


Figura 3. 2. Fracionamento e purificação dos metabólitos das folhas de *P. pellucida.*

3.7. CURVA DE CALIBRAÇÃO

A pellucidina A, 5,6,7-trimetoxi-flavona, sesamina, 2,4,5-trimetoxi-estireno, ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído e o dilapiol foram quantificados por CLAE-DAD (Collins et al., 1995). As curvas de calibração foram geradas usando soluções padrão dos respectivos compostos puros. Para cada composto preparou-se uma solução estoque em MeOH (1mg/mL). A partir desta solução, foram preparadas quatro outras soluções por meio de diluições com as concentrações de 1,000; 0,5000; 0,2500; 0,1250; 0,0625 e 0,0312 mg/mL. Todas as soluções foram analisadas por CLAE nas mesmas condições de análise dos extratos.

3.8. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DA PELLUCIDINA A DURANTE O PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Apesar dos diversos relatos de compostos naturais contendo anel ciclobutânicos, alguns autores afirmam que a produção desses compostos podem ser artefatos formados durante o processo de extração (McCracken et al., 2012; Seidel et al., 2000). Dessa forma, diante da possibilidade, da pellucidina A ser um produto produzido pela dimerização de duas unidades de 2,4,5-trimetoxi-estireno formado durante o processo de extração, foram realizados dois experimentos com o objetivo de verificar essa possibilidade.

No primeiro experimento, 1 mg do 2,4,5-trimetoxi-estireno sintetizado foi colocado em um ependorff e com ele realizado todo o procedimento de extração realizado na extração dos extratos das folhas da *P. pellucida* (seção 3.5). No segundo experimento 1 mg do 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno foi solubilizado em 500 µL de clorofórmio e essa solução foi utilizada para obtenção dos extratos das folhas de *P. pellucida* seguindo a metodologia descrita na seção 3.5.

Nos dois casos não foi verificada a formação da pellucidina A, não marcada para o primeiro caso e isotopicamente marcada com carbono treze no segundo caso, o que indicou que o composto não é um produto formado durante o processo de extração, e sim produzido na planta.

3.9. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

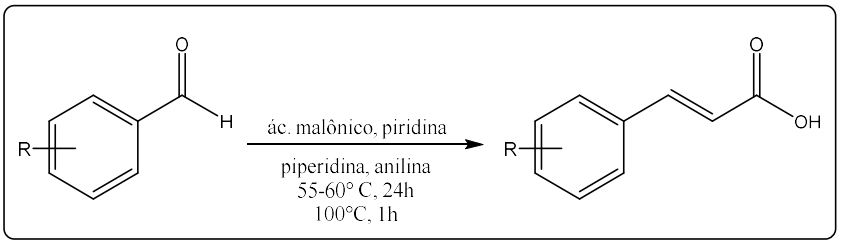
Em torno de 7 mg dos extratos foram dissolvidos em clorofórmio deuterado, $CDCl_3$, filtrados e realizado a análise de RMN ^1H de 300 MHz, na Central Analítica do IQ-USP.

Os dados obtidos foram tratados no programa MestreNova, ajustando-se o sinal do TMS δ 0,00 o ajuste de fase foi manual e a correção de linha base foi automática. Foram considerados os dados de deslocamento químico entre δ 1,4-12, desconsiderando-se o sinal residual de clorofórmio entre 7,20-7,28 ppm. Posteriormente foi feito um "binning" para um intervalo de δ 0,02 e os dados foram normalizados pela área total. Os dados foram salvos como arquivo de texto ASCII, para serem tratados no programa The Unscrambler (versão 9.5, CAMO Process AS, Noruega).

3.10. PREPARAÇÃO DOS PRECURSORES

3.10.1. Preparação dos ácidos cinâmico

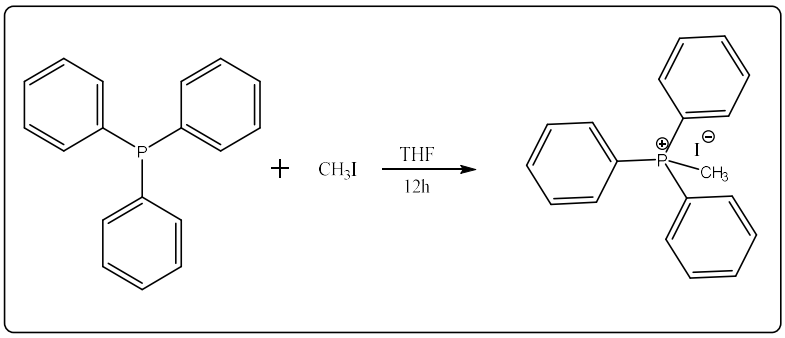
Os ácidos cinâmicos foram sintetizados através da condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e os diferentes benzaldeídos, catalisados por aminas aromáticas (Esquema 3.1) (Katayama et al., 1992). Ácido malônico (9,60 mM) e os diferentes benzaldeídos (10,51 mM) foram dissolvidos em piridina (3,5 mL), adicionou-se 1 gota de piperidina e uma gota de anilina previamente destiladas. A temperatura reacional foi mantida em 55-60°C por 24 horas e depois por mais 1h a 100°C. A mistura reacional foi esfriada a temperatura ambiente e depois evaporada a vácuo. O resíduo foi solubilizado em água (15 mL) a 80°C e acidificado com HCl 2 mol/L (pH 1-2) (3 mL). A solução opaca resultante foi extraída com AcOEt (2x75mL). As fases com AcOEt foram reunidas e extraídas com solução saturada de NaCl (80 mL), secadas com Na_2SO_4 anidro, evaporadas, fornecendo os cristais dos ácidos cinâmicos. Para a preparação dos ácidos cinâmicos isotopicamente marcados o material de partida foi o ácido malônico isotopicamente marcado adquirido junto a Sigma Aldrich.



Esquema 3.1. Preparação dos ácidos cinâmicos.

3.10.2. Preparação do iodeto de metil-trifenilfosfônio

Em um balão de duas bocas de 50 mL sob refluxo adicionou-se 125µL (2 mmol) de iodeto de metila e 0,84 g de trifenilfosfina (3,2 mmol) em 30 ml de THF seco. A reação permaneceu por 12 horas a uma temperatura de 110°C. Ao final deste período, observou-se a formação de um sólido branco que foi lavado com hexano (3 x 50 mL) e em seguida seco a vácuo (Sato et al., 2005) (Esquema 3.2).



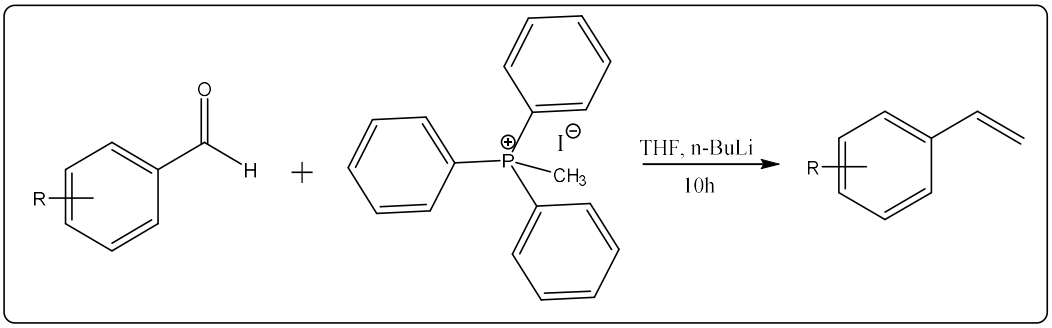
Esquema 3.2. Preparação do iodeto de metil-trifenilfosfônio.

3.10.3. Preparação dos estirenos

Os estirenos foram preparados através da reação de Wittig utilizando-se os respectivos benzaldeídos e o iodeto de metil-trifenilfosfônio preparado no item 3.10.2 (Esquema 3.3) (Farina et al., 2007). Em um balão de três bocas de 25 mL munido de agitação magnética funil de adição foram adicionados 3 mL de THF seco e 1,2 mmol de iodeto de metil-trifenilfosfônio. A mistura foi mantida resfriada sob agitação a -40°C, depois de 20 min foi adicionado 1 ml (12.85 mmol) de n-BuLi. Após a adição a solução levemente amarela foi mantida em banho de gelo a 0°C, sob agitação, por 30 minutos. Em seguida, com auxílio do funil de adição, foi adicionada, durante cerca de 30 minutos,

uma solução de 1,2 mmol dos benzaldeídos em 2 mL de THF seco. A mistura passou a apresentar uma mudança na coloração, foi agitada por 10 horas a temperatura ambiente. A solução foi então vertida em 50 mL de água gelada e extraída com hexano (3 x 50mL). A fase orgânica foi filtrada em uma coluna de sílica flash de 4 cm utilizando hexano:EtOAc (9:1) como eluente. Para a preparação dos estirenos isotopicamente marcados a preparação do iodeto de metil-trifenilfosfônio partiu da preparação do iodeto de metila isotopicamente marcado adquirido junto a Sigma Aldrich.

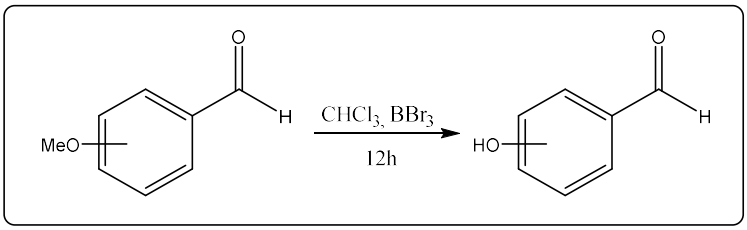
A preparação dos hidroxi-estirenos foi realizada partindo da desmetilação dos respectivos metoxi-benzaldeídos utilizando BBr_3. As hidroxilas foram protegidas com TBS e após a reação de Wittig os grupos TBS foram removidos usando TBAF.



Esquema 3.3. Preparação dos estirenos.

3.10.4. Desmetilação dos metoxi-benzaldeídos

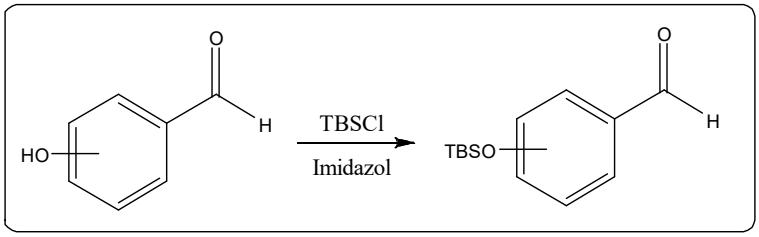
A uma solução de 1,2 mmol dos metoxi-benzaldeídos em clorofórmio (12,5 mL) foi adicionado BBr_3 0,306 mmol (2eq) a 0 °C. A mistura reacional foi agitada sob uma atmosfera de nitrogênio por 12h. Após este tempo foi adicionado uma solução de 25 mL de hidróxido de sódio. Em seguida foi adicionado H_2SO_4 concentrado e o precipitado foi extraído com éter etílico. À fração orgânica foi adicionado NaS_2O_4 anidro, filtrado e concentrada à vácuo (Esquema 3.4) (Unver et al., 2011).



Esquema 3.4. Desmetilação dos diferentes benzaldeídos.

3.10.5. Proteção das hidroxilas fenólicas dos hidroxi-benzaldeídos com cloreto de *tert*-butildimetilsilano.

O hidroxi-benzaldeído (2,40 mmol) cloreto de *tert*-butildimetilsilano (2,88 mmol, 1,2 eqv) e imidazol (4,8 mmol, 2 eqv.) foi adicionado em um balão de 50 mL de fundo redondo (Esquema 3.5). O balão aberto foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculita e o conjunto foi posicionado dentro de um forno de microondas convencional. A mistura reacional foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W (potência 1). Após o tempo decorrido, foi observada a formação de duas fases líquidas dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2-3 min), a mistura reacional foi aquecida novamente em potência de 180 W (potência 2). A reação foi acompanhada por CCDA, hexano:AcOEt (7:3). A reação foi finalizada pela adição de 15 mL de água Milli-Q, seguida de extração com éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas, secadas com $NaSO_4$ anidro e evaporadas sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado em coluna, eluída com hexano:AcOEt (7:3) resultando em um rendimento acima de 80%. Todos os compostos protegidos foram confirmados por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (Bastos et al., 2005).

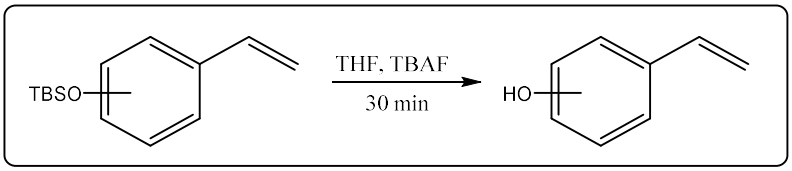


Esquema 3.5. Proteção das hidroxilas fenólicas dos diferentes benzaldeídos.

3.10.6. Desproteção das hidroxilas fenólicas dos estirenos

Determinadas quantidades de estirenos (0,898 mmol) contendo hidroxila fenólica protegidas com TBS foram dissolvidas em 3,0 mL de THF seco. A solução foi resfriada a 0°C em banho de gelo e mantida sob agitação por 30 min. Após este período, por meio de um funil de adição, foi adicionado lentamente 312 µL de fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) a 1,2 $mol.L^{-1}$ em THF seco. A mistura foi mantida sob agitação por 30 min, e a reação foi acompanhada por CCD. O produto bruto foi purificado por CC eluída com

hexano:AcOEt 4:1. Os produtos foram confirmados por CG-EM e RMN de ^{1}H (Esquema 3.6).



Esquema 3.6. Desproteção das hidroxilas fenólicas dos diferentes estirenos.

3.11. Administração *in vivo* dos precursores na *P. pellucida*

As folhas da *P. pellucida* foram cultivadas por 21 dias em sistema hidropônico. Após esse período as folhas já apresentavam a formação de raízes (Figura 3.3), então foram transferidas para eppendorf contendo água Milli-Q e em seguida a adição dos precursores marcados isotopicamente.

Figura 3. 3. *P. pellucida* cultivada em sistema de hidroponia.

3.11.1. Administração dos precursores marcados *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina

Foram testadas soluções contendo 0,25; 0,5 e 1,0 mg da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina em 100 µL de água Milli-Q. Foram administradas alíquotas de 1,0 mL de solução aquosa do precursor, nas respectivas concentrações. Cada uma das concentrações foi testada em triplicata, em um período de 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 25°C, com reposição da

solução do precursor quando necessário. O controle foi realizado sem a adição do precursor marcado.

Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, extraídas com $CHCl_3$:MeOH:H_2O (2:1:1), a fração clorofórmica foi separada e solvente foi evaporado em evaporador rotativo e as amostras foram re-suspendidas em MeOH filtradas em filtro Millipore 0,45 µm e submetidas à análise por CG-EM. As quantificações de incorporação dos precursores foram realizadas de acordo com o descrito (Opitz et al., 2014).

3.11.2. Administração dos diferentes ácidos [8-^{13}C]-cinâmicos

A administração dos ácidos [8-^{13}C]-cinâmicos na *P. pellucida* foram realizadas nas mesmas condições que os isotopômeros da *L*-fenilalanina. Os diferentes ácidos [8-^{13}C]-cinâmicos foram solubilizados em 0,5 µL de DMSO, 0,5 µL o volume completado com água Milli-Q. Cada uma das concentrações, 0,25; 0,5 e 1,0 mg do ácido em 100 µL da solução foram testadas nos tempos de 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os controles foram realizados adicionando apenas com a adição de 0,5 µL de DMSO em água Milli-Q.

Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, extraídas com $CHCl_3$:MeOH:H_2O (2:1:1), a fração clorofórmica foi separada, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, as frações foram re-suspendidas em MeOH filtradas em filtro Millipore 0,45 µm e submetidas à análise por CG-EM. A quantificação da incorporação dos precursores foi realizada de acordo com o descrito (Opitz et al., 2014).

3.11.3. Administração dos [8-^{13}C]-estirenos

A administração do [8-^{13}C]-estireno nas folhas da *P. pellucida* foram realizadas nas mesmas condições que os isotopômeros da *L*-fenilalanina. O [8-^{13}C]-estireno foi solubilizado em 0,5 µL de DMSO, 0,5 µL o volume completado com água Milli-Q. Cada uma das concentrações, 0,25, 0,5 e 1,0 mg dos estirenos em 100 µL da solução foram testadas nos t = 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os controles foram realizados adicionando apenas de 0,5 µL de DMSO em água Milli-Q. Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, extraídas com $CHCl_3$:MeOH:H_2O (2:1:1), a fração clorofórmica foi separada e solvente foi evaporado em evaporador rotativo e as amostras

foram re-suspendidas em MeOH filtradas em filtro Millipore 0,45 µm e submetidas à análise por CG-EM. As quantificações de incorporação dos precursores na pellucidina A foram realizadas de acordo com o descrito (Opitz et al., 2014).

3.12. CÁLCULO DO PERCENTUAL DE INCORPORAÇÃO DOS PRECURSORES ISOTOPICAMENTE MARCADOS.

O percentual de incorporação com carbono treze dos compostos foi calculado baseado nas integrações dos sinais de massas dos isotopômeros (M; M+1; M+2;... M+n). Após a integração dos picos moleculares das amostras não marcados com carbono treze (M), os valores para os isotopômeros foram calculados:

$$M + n = \frac{\int (M + n) \times 100}{\int M}$$

Considerando a abundância natural do carbono treze nas plantas, para cada isotopômero a diferença (D) entre os valores das amostras tratadas (trat.) e os valores das amostras controle (contr.) foi calculada de acordo com as seguintes equações:

$$D_M = M_{trat.} - M_{contr}$$

$$D_{M+n} = M + n_{trat} - M + n_{contr}$$

Desta forma o percentual de incorporação (*I*) de cada isotopômero nos extratos foi calculado da seguinte forma:

$$I_{M+n} = \frac{D_{M+n} \times 100\%}{M + \sum M + n}$$

3.13. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios de conversões enzimáticas foram desenvolvidos de acordo com (Lu et al., 2004; Martins, 2002; Vassao et al., 2006).

3.13.1. Extração de Enzimas

Para a obtenção de extratos enzimáticos foram utilizadas 25 g de folhas de *P. pellucida* congeladas em N_2 líquido imediatamente após a coleta e trituradas com gral sob N_2 líquido.

3.13.2. Protocolo para obtenção do extrato enzimático das folhas de *P. pellucida*

As folhas trituradas foram submetidas à extração com 100 mL de tampão fosfato (kPi) de pH 7 e adição de EDTA (37,2 mg), ácido ascórbico (35 mg), $MgCl_2$ (30 mg), PVPP (5,0 g), sob branda agitação de 30 minutos a 4°C seguida de filtração com gaze. Uma alíquota de sobrenadante foi separada e o precipitado descartado.

A precipitação salina foi realizada utilizando a fração solúvel da primeira centrifugação, adicionando lentamente 128 mg de $(NH_4)_2SO_4$, sob constante agitação. Essa nova fração foi centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm, descartando o sobrenadante e utilizando o centrifugado como fonte de proteínas.

3.13.3. Dosagem Protéica (Reagente de Bradford)

O reagente Cromassie Brillant Blue G-250 (100 mg) foi dissolvido em 50 mL de solução etanólica 95%. A essa solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e diluídos a 1L.

3.13.4. Solução de albumina bovina

Para o preparo desta solução foram adicionados 20 mg de albumina sérica bovina em 20 mL de água desionizada, e diversas alíquotas de solução foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração. As análises foram realizadas com base nas leituras de absorbância = 595 nm (Figura 3.4).

3.13.5. Quantificação das proteínas nos extratos enzimáticos

A quantificação das proteínas presentes no extrato enzimático foi determinada pelo método de Bradford, 1976. Para o ensaio foi realizada a curva padrão de albumina sérica

bovina (BSA). A curva apresentou uma boa linearidade (R^2 = 0,994). O teor de proteínas solúveis obtidas no extrato enzimático foi de 33,3 mg/mL.

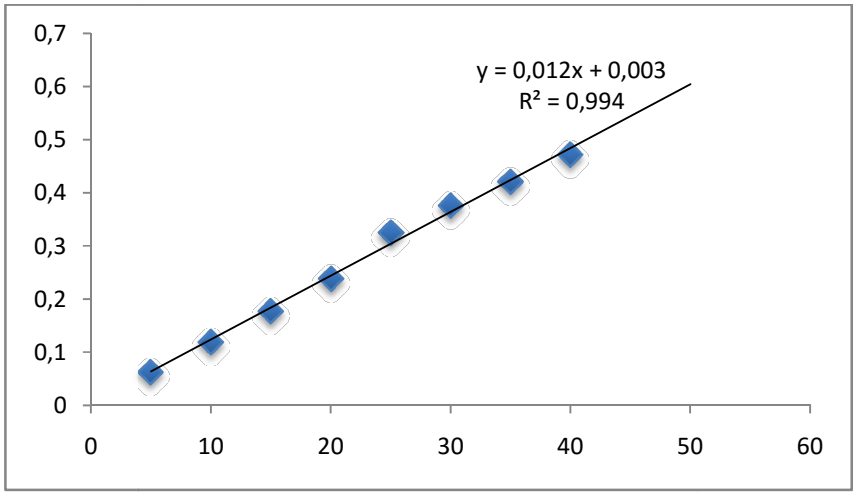


Figura 3.4. Curva de calibração construída com BSA para determinar a concentração de proteínas em *P. pellucida.*

3.13.6. Ensaios de incubação dos precursores com os extratos enzimáticos

Os ácidos cinâmicos e estirenos foram testados com as frações enzimáticas, obtidas a partir da *P. pellucida*.

A conversão enzimática foi realizada para uma reação contendo 200 µL de volume final, 100 µL de extrato enzimático, uma solução de 20 µL dos precursores a 10 mM, 76 µL de tampão kPi a 40 mmol.L^{-1} (pH = 7,0). Após 30, 60, 90, 120 minutos de incubação a 25°C, a reação foi finalizada pela extração com acetato de etila (2 x 500 µL). Como controle, foi incubado somente o precursor e somente a preparação enzimática em tampão kPi a 40 mmol.L^{-1} (pH = 7,0). Com o objetivo de verificar uma possível reação de acoplamento oxidativo foram testados H_2O_2 e NADPH 50 mM como oxidantes tanto em conjunto como separadamente.

No ensaio de conversão enzimática, os padrões foram incubados nas mesmas condições das reações, sem adição das frações enzimáticas. As frações enzimáticas, os precursores e os possíveis produtos da reação foram analisados por CLAE, em coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 (Luna C-18 150 x 4,6 mm, 5 µm), com fluxo de 1mL.min^{-1}, acompanhada com detector em λ = 260 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo fitoquímico de *P. pellucida*

Através de fracionamento cromatográfico dos extratos das partes aéreas foram isoladas sete substâncias: ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**); 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**); 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**); sesamina (**4**); 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**); dilapiol (**6**) e pellucidina A (**7**) (Figura 4.2).

A pellucidina A (**7**) havia sido anteriormente encontrada nas partes aereas da *P. pellucida* (Bayma et al., 2000; Regasa et al., 1998) e, nesse estudo, a substância foi determinada como constituinte minoritário através análises por CLAE-UV e CG-EM nos extratos clorofórmicos de diferentes partes das plantas cultivadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Figura 4.1).

As análises por CG-EM dos extratos das diferentes partes da *P. pellucida* confirmaram a presença de pellucidina A nos extratos das folhas, caule e frutos; além da presença de outros constituintes ainda não descritos para a espécie.

Assim, foi iniciado um estudo fitoquímico com o objetivo de obter a pellucidina A pura para ser utilizada como padrão nos estudos biossintéticos e também objetivando caracterizar os demais metabólitos biossinteticamente relacionados à pellucidina A. Essas seriam as condições iniciais a serem cumpridas para o estabelecimento de hipóteses biossintéticas da pellucidina A e de suas avaliações através do uso de precursores isotopicamente marcados.

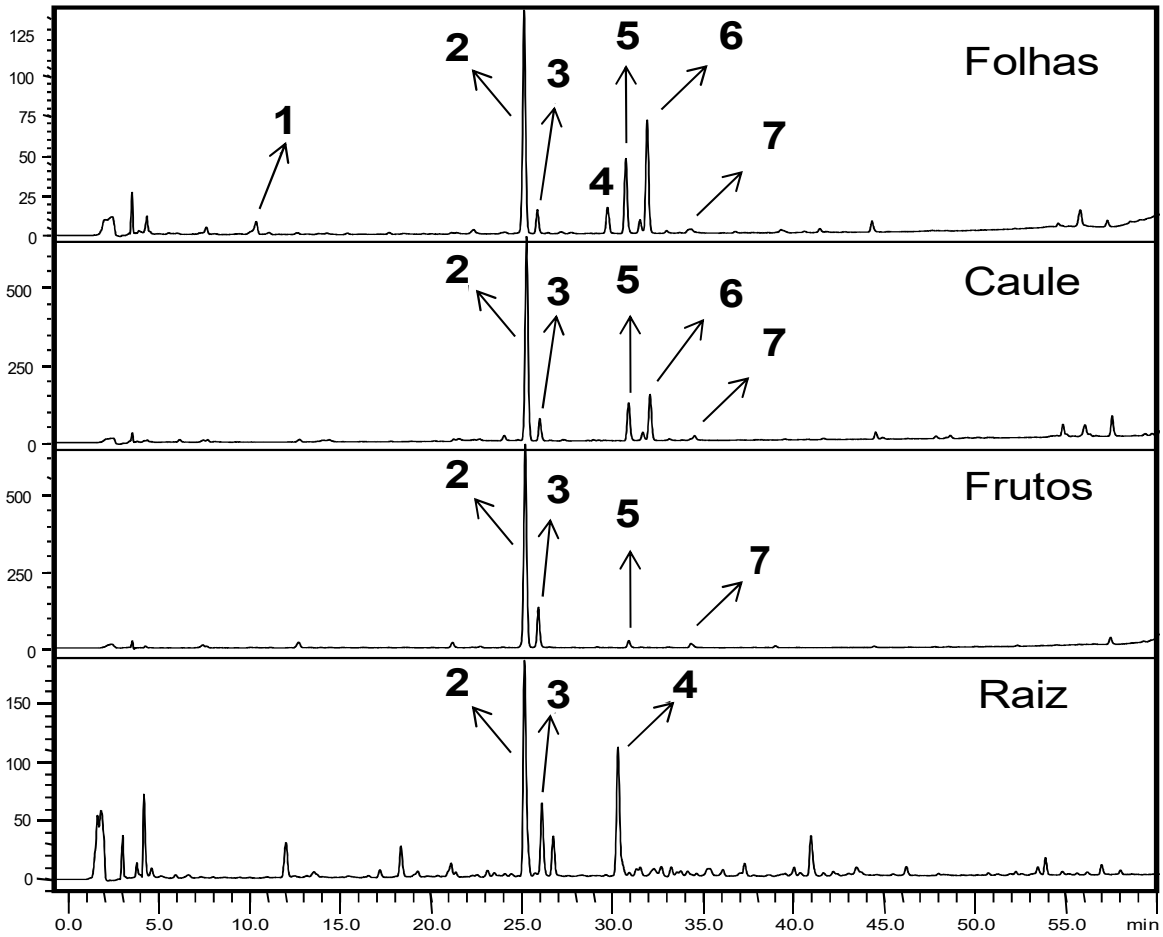


Figura 4.1. Análise por CLAE dos extratos das folhas, caules, frutos e raízes de *P. pellucida.*

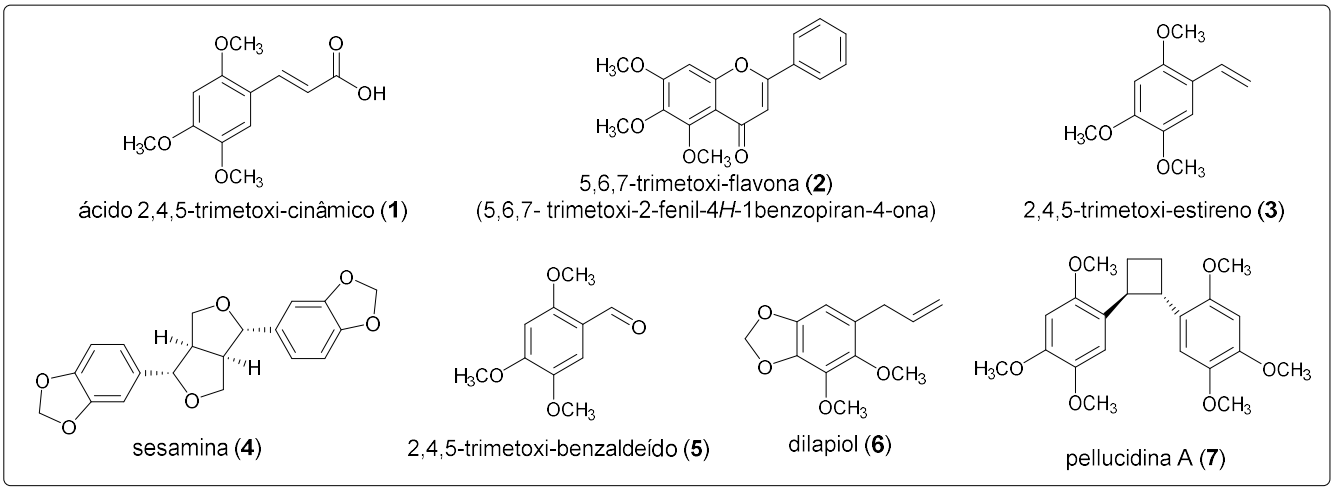
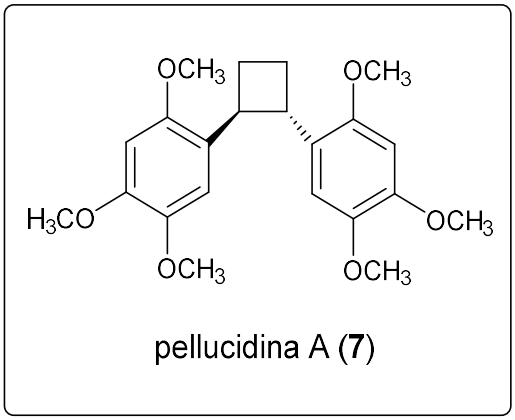


Figura 4.2. Substâncias isoladas e identificadas de *P. pellucida.*

4.1.1. Identificação da pellucidina A (7)

A pellucidina A foi isolada do extrato bruto das folhas da *P. pellucida* através de fracionamento cromatográfico e sua estrutura foi determinada por análise de RMN de ^{1}H, ^{13}C e dos dados de fragmentação do espectro de massas (EM-IE e ESI-TOF) bem como por comparação com os dados descritos na literatura (Bayma et al., 2000). A pellucidina A foi obtida em forma de cristais brancos e para a substância observou-se no espectro de massas de alta resolução um íon quase molecular de massa *m/z* 389,1987 Da $[M+H]^+$ (Figura 4.3), compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_6$ (valor calculado para $[M+H]^+$: 389,1958 Da).



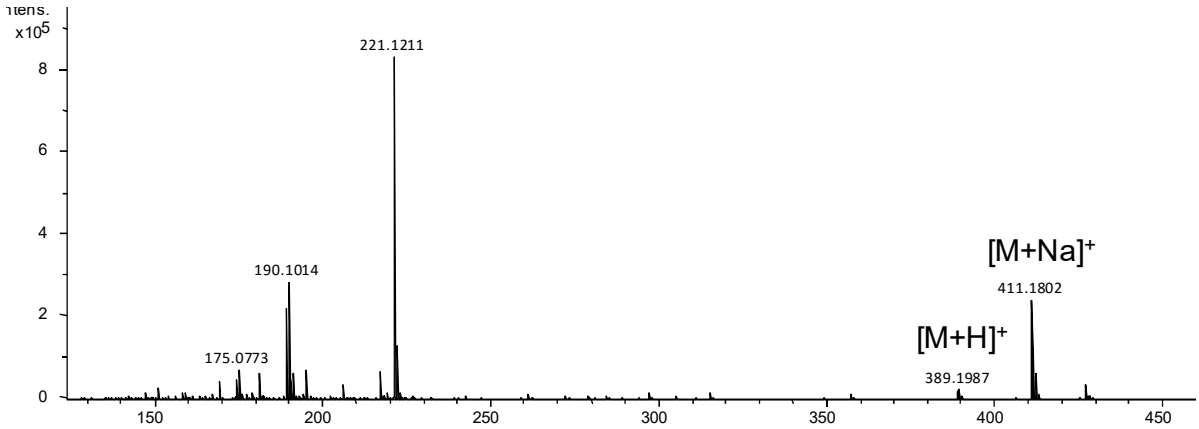


Figura 4.3. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da pellucidina A (**7**).

No espectro de massas da pellucidina A obtido por EM-IE (Figura 4.4) observou-se um íon de massa *m/z* 388 Da (1,1%) (pico molecular) correspondente ao pico molecular ($[M]^{+\bullet}$). O pico do íon fragmentário em *m/z* = 194 Da (pico base) indicou a quebra do anel

ciclobutânico entre as ligações C7-C7' e C8-C8' fragmentando a molécula ao meio (perda de uma unidade de 2,4,5-trimetoxi-estireno). O pico do íon fragmentário em *m/z* = 360 Da (1,0%) indicou outra quebra do anel ciclobutânico, essa entre as ligações C7-C8 e C7'-C8' com a perda de um grupo etileno, esta fragmentação descarta a possibilidade do composto ter uma configuração cabeça-cauda. O pico do íon fragmentário em *m/z* = 179 Da (31,8%) é proveniente da perda de uma metila de uma das metoxilas do fragmento responsável pelo pico base e o íon fragmentário em *m/z* = 151 Da (14,1%) é proveniente de uma perda de CO (*m/z* = 28) do anel aromático (Esquema 4.1).

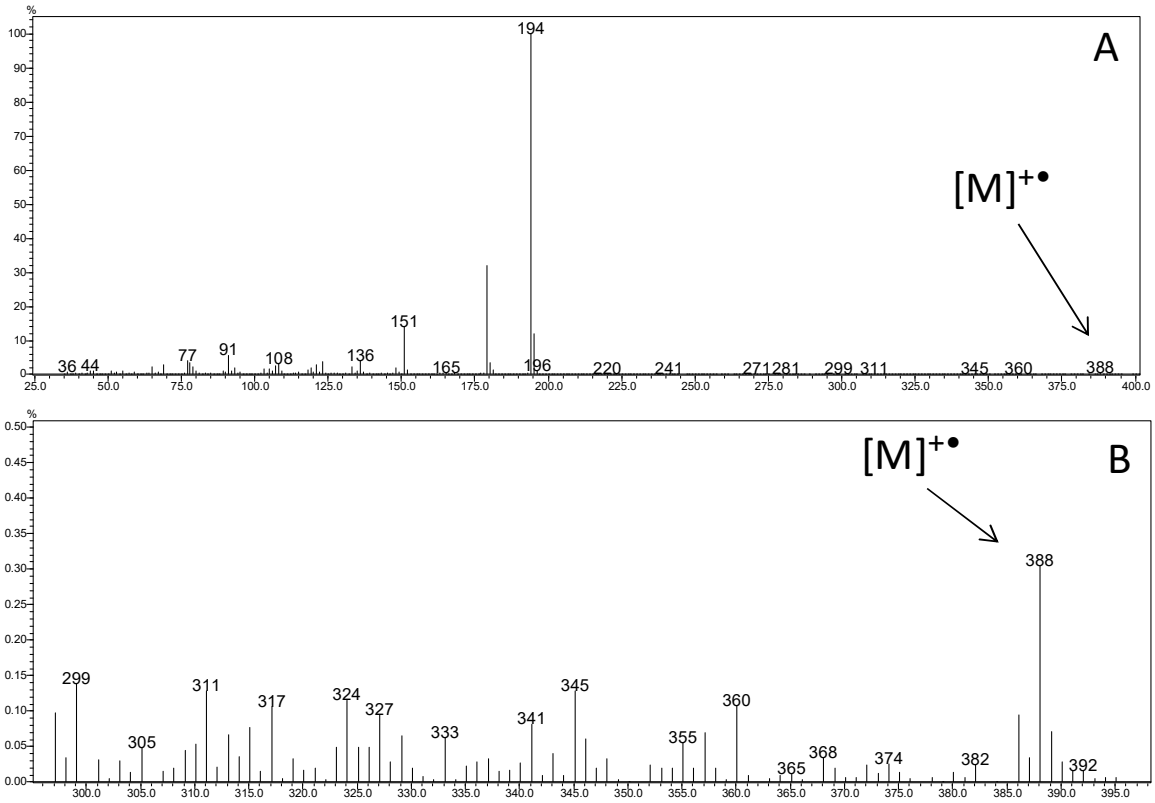
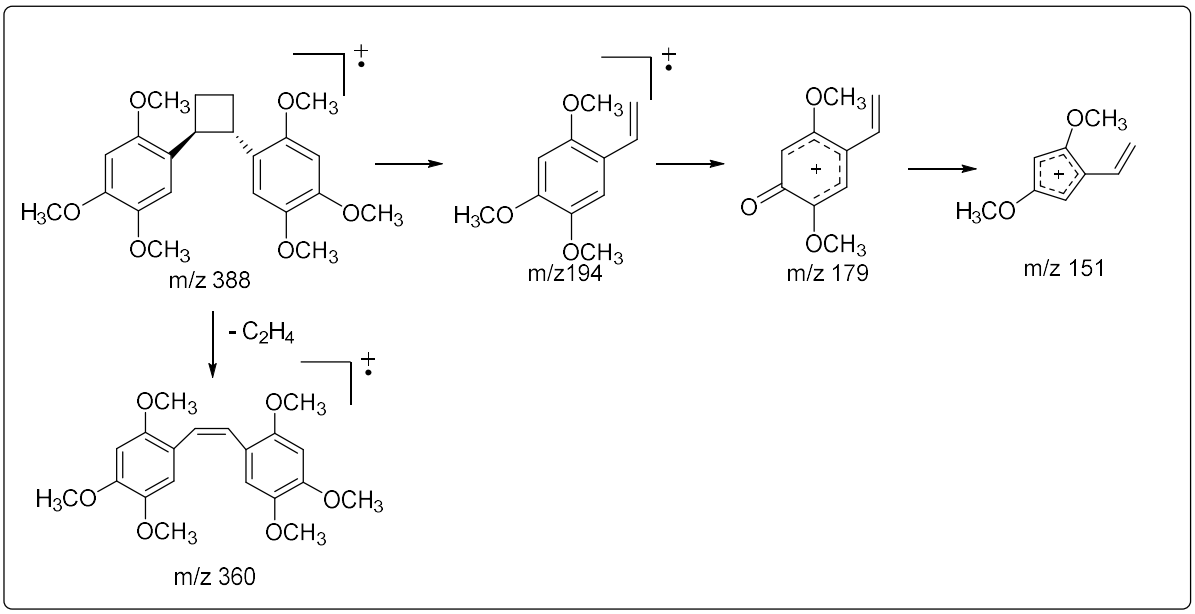


Figura 4.4. (A) Espectro de massas (IE) da pellucidina A. (B) expansão entre a região de 300 a 400 Da do espectro de massas da pellucidina A (**7**).



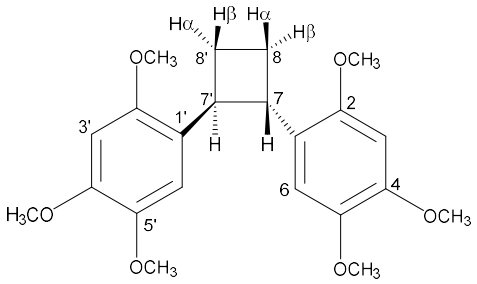
Esquema 4.1. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a pellucidina A (**7**).

No espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz, $CDCl_3$ (Figura 7A.12) da pellucidina A observou-se a presença de dois singletos (1H cada) em δ 6,98 e 6,48 atribuídos aos hidrogênios do anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído, um sinal (3H,s) em δ 3,75 correspondente a uma metoxila aromática, dois sinais (1H cada) em δ 2,31 e 1,94 sugerindo a presença de um grupo metileno, dois singletos em δ 3,86 e 3,85 se sobrepondo a um sinal de multipleto, todos integrando para 7H, caracterizando duas metoxilas aromáticas e um hidrogênio metínico. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7A.13) revelou a presença de seis carbonos na região de carbonos aromáticos, sendo dois metinícos (δ 111,8 e 97,8), três quartenário oxigenados (δ 151,0, 147,5 e 143,1) e um quaternário alquil-substituido (δ 124,6), além de três sinais de metoxilas (δ 56,6; 56,5 e 56,2), um sinal de carbono metinico benzilico (δ 40,5) e um carbono metilênico (δ 27,0).

Em sua publicação Bayma e colaboradores (2000) afirmam através da análise dos dados de RMN ^{1}H que a pellucidina A isolada das folhas da *P. pellucida* apresenta uma configuração cabeça-cabeça e que os dois anéis aromáticos estão em uma configuração *cis.* Porém, em 2013 a substância foi sintetizada, teve sua estereoquímica revisada (Riener and Nicewicz, 2013) e através de técnicas de raios X, contrariando a proposta inicial para a configuração da substância, foi confirmada a configuração *trans* para pellucidina A. Comparando-se os dados de RMN ^{1}H e ^{13}C obtidos nesse estudo para a

pellucidina A com os dados de RMN ^{1}H e ^{13}C do composto sintetizado no trabalho de Riener e Nicewicz, verificou-se que os deslocamentos químicos apresentam grande semelhança e com isso pode-se afirmar que a *pellucida* A isolada de *P. pellucida* possui a configuração *trans* (Tabela 4.1) (Riener and Nicewicz, 2013).

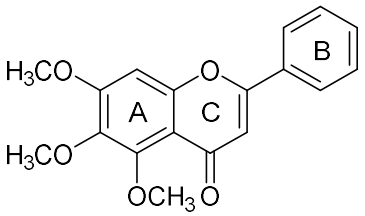
Tabela 4.1. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (500 e 125 MHz) da pellucidina A com os da literatura (Riener and Nicewicz, 2013).



Posição	^{1}H	$^{13}C_{obt.}$	$^{1}H_{lit}$	$^{13}C_{lit.}$
1/1’	-	124,6	-	124,6
2/2’	-	147,5	-	147,6
3/3’	6,48 (s, 2H)	97,8	6,48 (s, 2H)	97,8
4/4’	-	151,0	-	151,1
5/5’	-	143,1	-	143,1
6/6’	6,98 (s, 2H)	111,8	6,98 (s, 2H)	111,8
7/7’	3,87 (m, 2H)	40,5	3,87 (m, 2H)	40,4
	α-2,31 (dt, 5,1; 2,1 Hz, 2H)		*α*-2,31 (dt, 5,1; 2,1 Hz, 2H)	
8/8’		27,0		27,1
	β-1,94 (dt, 5,1; 2,1 Hz, 2H)		*β*-1,95 (dt, 5,1; 2,1 Hz, 2H)	
OCH_3-2/2’	3,75 (s, 6H)	56,5	3,75 (s, 6H)	56,5
OCH_3-4/4’	3,85 (s, 6H)	56,6	3,85 (s, 6H)	56,6
OCH_3-5/5’	3,86 (s, 6H)	56,2	3,86 (s, 6H)	56,2

4.2.2. Identificação da 5,6,7-trimetoxi-flavona

A substância **2**, majoritária em todos os órgãos da *P. pellucida* foi purificada na forma de um sólido amarelo. Por análise dos dados de RMN de ^{1}H,^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) bem como por comparação com os dados descritos na literatura a estrutura da substância foi confirmada como sendo a 5,6,7-trimetoxi-flavona.



5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**)
(5,6,7- trimetoxi-2-fenil-4*H*-1benzopiran-4-ona)

Para a substância observou-se um pico correspondente ao íon molecular em *m/z* 313,1079 Da no espectro de massas de alta resolução (Figura 4.5), compatível com a fórmula molecular proposta $C_{18}H_{16}O_5$ (valor calculado para $[M + H]^+$: 313,1031 Da). No espectro de massas obtido por EM-IE (Figura 4.6) observou-se o pico em *m/z* 312 Da (6,5%) correspondente ao íon molecular $[M]^{+\bullet}$ e o íon fragmentário em *m/z* = 297 (pico base) correspondente a perda de uma metila.

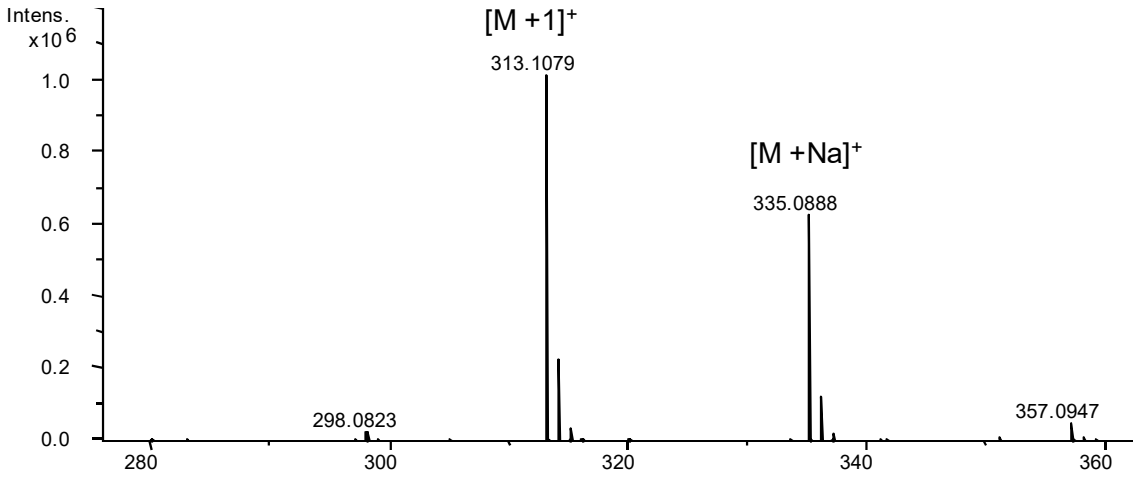


Figura 4. 5. Espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).

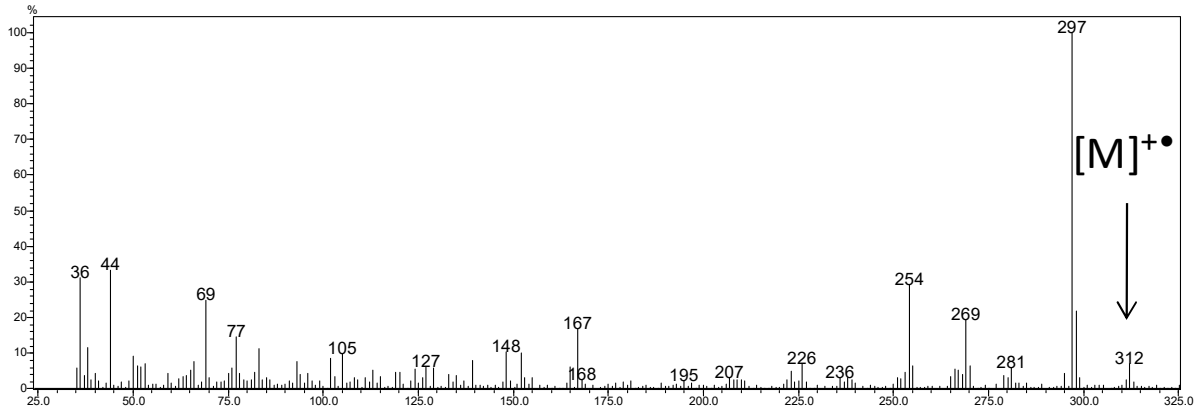
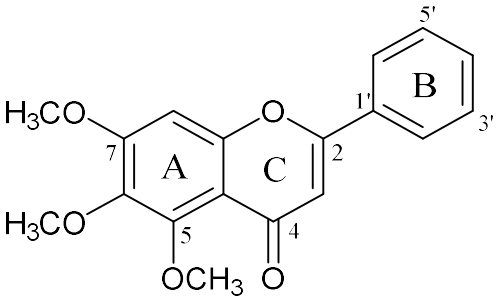


Figura 4.6. Espectro de massas (IE) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).

No espectro de RMN de ^{1}H da 5,6,7-trimetoxi-flavona (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7A.3, Tabela 4.2) observou-se a presença de um multipleto em δ 7,89 (m, 2H, H-2' e H-6') e em δ 7,51 (m, 3H, H-3'; H-4' e H-5') indicativos de um sistema aromático monossubstituído atribuído ao anel B. Observaram-se também dois singletos um em δ 6,82 (s, 1H, H-8) referente ao hidrogênio do anel aromático A pentasubstituído e o outro em δ 6,66 (1H, H-3) referente à dupla ligação no anel C da flavona. O espectro apresentou ainda três singletos em δ 4,00; 3,99 e 3,92 (3H cada, $-OCH_3$-5, $-OCH_3$-6 e $-OCH_3$-7) correspondentes aos hidrogênios das três metoxilas. O espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de um total de dezoito átomos de carbonos, sendo o sinal de carbono carbonílico em δ 177,1 atribuído ao carbono 4 do anel C não aromático (Figura 7A.4). Também foram observados seis sinais entre δ 125,9 a 135,5 correspondentes aos seis carbonos do anel aromático B, três sinais em 140,4; 152,5 e 157,7 correspondentes aos três carbonos oxigenados do anel aromático A alem de três sinais dos carbonos de metoxilas (δ 56,3; 61,5 e 62,2). Este é o primeiro relato da ocorrência desta substância em espécies de *Peperomia.*

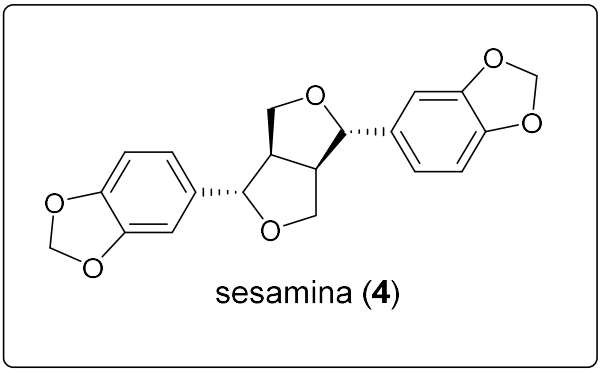
Tabela 4.2. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (300 e 125 MHz) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).

Posição	^{1}H	^{13}C
2	-	161,0
3	6,66 (s, 1H)	108,4
4	-	177,1
4ª		112,9
5	-	152,5
6		140,4
7	-	157,7
8	6,82 (s, 1H)	96,3
8a	-	154,5
1’	-	131,5
2’	7,89 (m,1H)	128,9
3’	7,51 (m,1H)	125,9
4’	7,51 (m,1H)	131,2
5’	7,51 (m,1H)	125,9
6’	7,89 (m,1H)	128,9
$-OCH_3$-5	3,92 (s,3H)	62,2
$-OCH_3$-6	3,99 (s,3H)	61,5
$-OCH_3$-7	4,00 (s,3H)	56,3



4.2.3. Identificação da sesamina

A substância **4** foi purificada na forma de um sólido branco. Por análise dos dados de RMN de ^{1}H,^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) (Figura 4.7) bem como por comparação com os dados descritos na literatura a estrutura da substância foi confirmada como sendo a sesamina (Kato et al., 1998).



O espectro de RMN de ^{1}H da substância **4** (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7A.7, Tabela 4.3) apresentou um singleto em δ 6,84 (s, 2H, H-2, H-2'), um dupleto (d, 4H, H-5, H-5', H-6 e H-6') que associados a sinais de dois hidrogênios em δ 5,95 (s, 2H, $-OCH_2O-$) referente a dois hidrogênios de um grupamento metilenodioxílico, indicaram um anel aromático 1,3,4- trissubstituídos. Foi observado ainda um dupleto em δ 4,72 (d, 2H, J = 3,5 H-7, H-7'), dois duplo dupletos em δ 3,89 (dd, 2H, J = 9,2 e 3,5 Hz, H_{α}-9) e δ 4,24 (dd, 2H, J = 9,2 e 6,9 Hz, H_{β}-9) além de um multipleto em δ 3,05 (m, 2H, H-8, H-8'), a substancia **4** foi reconhecida como sendo uma lignana furofurânica contendo o sistema 3,7-dioxabiciclo-[3.3.0]-octânico. O espectro de massas obtido por CG-EM apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 345 Da (32,8%), um pico fragmentário em *m/z* = 149 Da referente ao pico base relativo ao fragmento $[ArCO]^+$ (Esquema 4.2).

Por conta da simetria da molécula o espectro de RMN de ^{13}C revelou somente a presença de um total de dez átomos de carbonos (Figura 7A.8). Foi observado um sinal de carbono pertencente ao grupo metilenodioxílico em δ 101,0, além de seis sinais entre δ 106,5 a 147,9 correspondentes aos carbonos aromáticos. Também foi observado sinais em δ 85,8, 54,3 e 71,7 correspondentes aos carbonos do sistema furofuranico; entre δ 125,9 a 135,5 correspondentes aos seis carbonos do anel aromático B, três sinais em 140,4, 152,5 e 157,7 correspondentes aos seis carbonos pertencentes ao sistema 3,7-dioxabiciclo [3.3.0] octânico.

A busca bibliográfica possibilitou identificação da substância **4** como sendo a (1*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-1,4-bis-(benzo-[1,3]-dioxol-5-il)-tetraidro-1*H*,3*H*-furo-[3,4]-furano, conhecida como sesamina encontrada nas sementes de *Sesamum indicum* (Kato et al., 1998). No caso de *P. pellucida,* a sesamina ocorre em proporção relativa maior nas raízes. Cabe destacar que a sesamina também foi identificada em maiores percentuais

nas raízes do que em outras partes em *P. richardiaefolium* (da Silva, 2008) e em *Virola sebifera* (Danelutte et al., 2000).

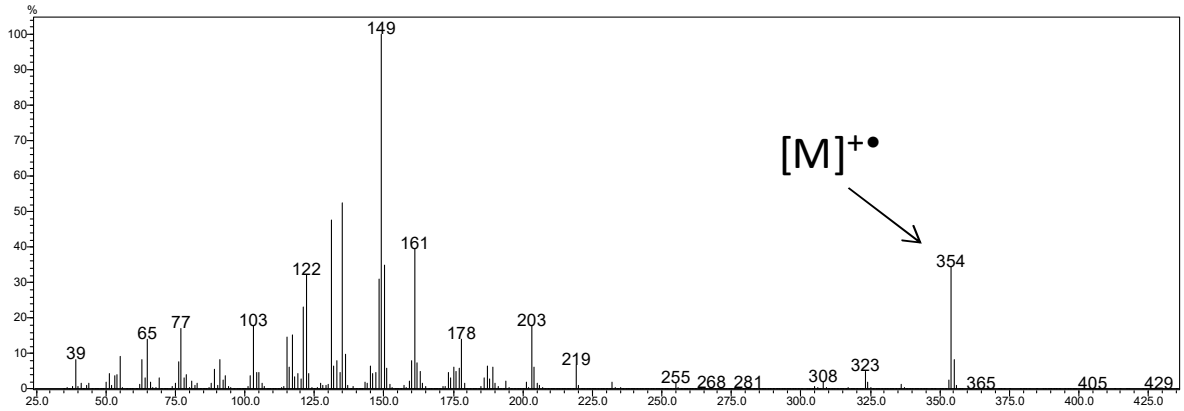
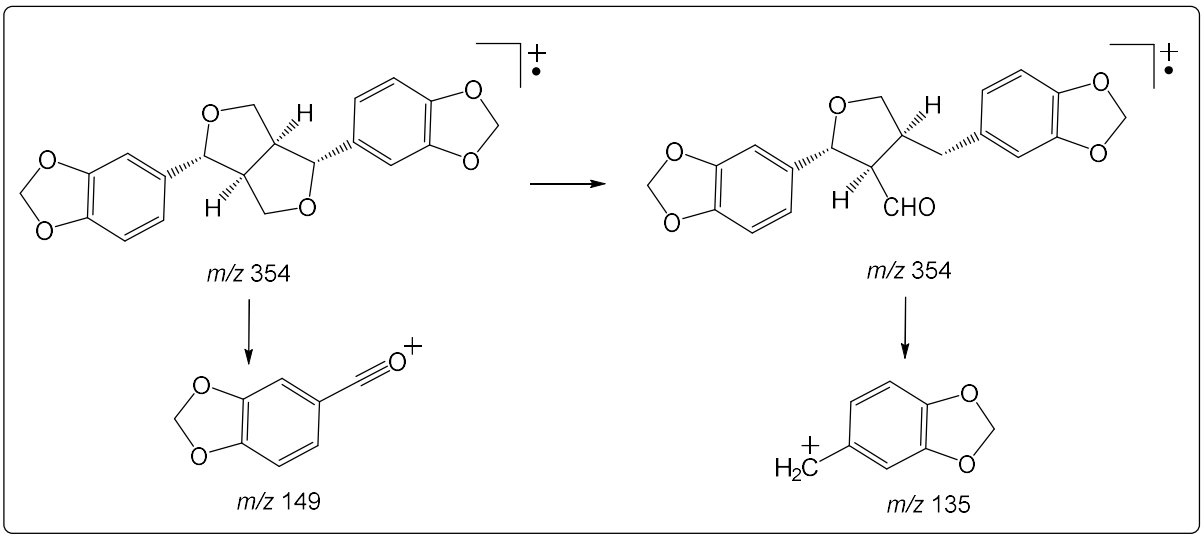
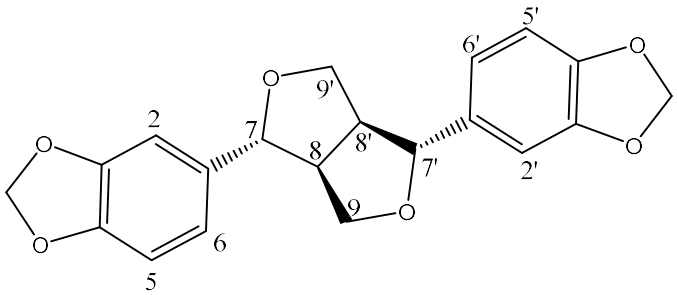


Figura 4.7. Espectro de massas (IE) da sesamina (**4**).



Esquema 4.2. Proposta de fragmentação no espectro de massas (IE) para a sesamina (**4**).

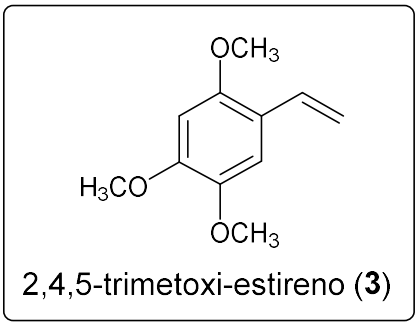
Tabela 4.3. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (300 e 75 MHz) da sesamina (**4**).



Posição	^{1}H	^{13}C
1/1’	-	135,0
2/2’	6,84 (s, 2H)	106,5
3/3’	-	147,9
4/4’	-	147,1
5/5’	6,79 (d, J = 5,7, 2H)	108,2
6/6’	6,79 (d, J = 5,7, 2H)	119,3
7/7’	4,72 (d, J = 3,5, 2H)	85,8
8/8’	3,05 (m, 2H)	54,3
9/9’	*α*-3,89 (dd, J = 9,2 e 3,5 Hz, 2H) *β*-4,26 (dd, J = 9,2 e 6,9 Hz, 2H)	71,7
OCH_2O / OCH_2O’	5,95 (s, 4H)	101,0

4.2.4. Identificação do 2,4,5-trimetoxi-estireno

A substância **3** foi purificada do extrato das partes aéreas da *P. pellucida* como um sólido branco amorfo. A análise dos dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) bem como por comparação com os dados descritos na literatura (Manalo et al., 1983) permitiu a identificação da substância como o 2,4,5-trimetoxi-estireno.



No espectro de massas da substância **3** obtido por EM-IE (Figura 4.8) observou-se a presença de um pico em *m/z* 194 Da (pico base) correspondente a $[M]^{+\bullet}$, compatível com a fórmula molecular proposta $C_{11}H_{14}O_3$. Também se verificou os íons fragmentários em *m/z* = 179 Da (67,5%) proveniente da perda de uma metila de uma das metoxilas e o íon fragmentário em *m/z* = 151 Da (64,9 %) proveniente da eliminação de CO do anel aromático (Esquema 4.3).

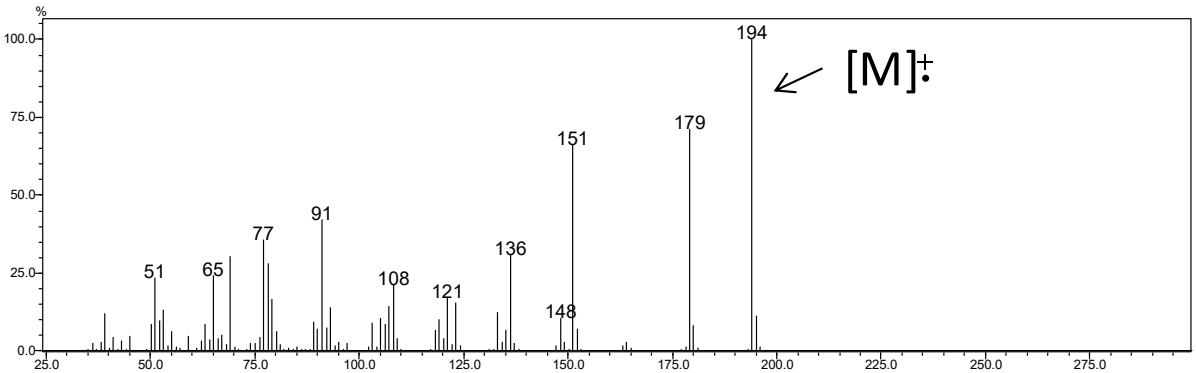
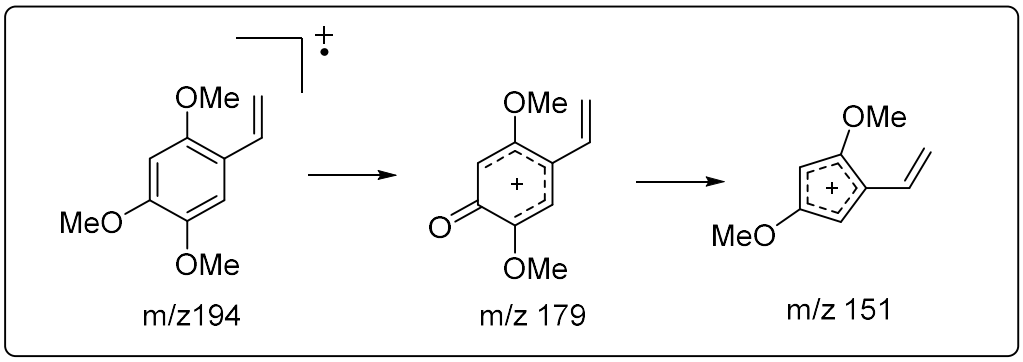


Figura 4. 8. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**).

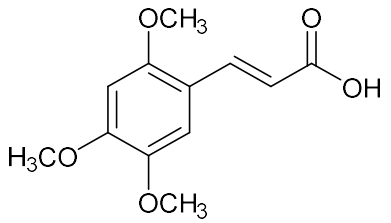


Esquema 4.3. Proposta de fragmentação no espectro de massas do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**).

No espectro de RMN de ^{1}H do 2,4,5-trimetoxi-estireno (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7A.5) observou-se a presença de dois singletos, um em δ 6,50 (s, 1H, H-3) e o outro em δ 7,01 (s,1H, H-6) sobreposto ao duplo dupleto em δ 7,00 (dd, J = 17,7 e 11,1 Hz, 1H, H-7) e outros dois duplo dupletos em δ 5,63 (dd, J = 17,7 e 1,4 Hz, 1H, H-8 *trans*) e δ 5,18 (dd, J 11,1 e 1,4 Hz, 1H, H-8 *cis*). O espectro ainda apresentou três singletos em δ 3,89; 3,87 e 3,82 (s, 3H cada, $-OCH_3$-5; $-OCH_3$-4 e $-OCH_3$-2) correspondente as três metoxilas. No espectro de RMN ^{13}C da substância **3** observou-se um total de onze sinais de carbonos, o que está de acordo com a estrutura da substância (Figura 7A.6). Os dados de RMN e EM foram comparados com a literatura confirmando a identificação da substância como o 2,4,5-trimetoxi-estireno (Manalo et al., 1983).

4.2.5. Identificação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico

A substância **1** foi purificada do extrato das partes aéreas da *P. pellucida* como um sólido amarelo. Através de análise dos dados de RMN de ^{1}H,^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) bem como por comparação com os dados descritos na literatura a estrutura do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico foi confirmada.



ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**)

No espectro de massas de obtido por EM-IE (Figura 4.9) observou-se um pico em *m/z* 238 Da (pico base e molecular) correspondente a $[M]^{+\bullet}$, compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_5$. No espectro também se observa a presença dos íons fragmentários em *m/z* = 223 Da (36,0%) proveniente da perda de uma metila e o íon fragmentário em *m/z* = 207 Da (24,6 %) proveniente da perda de uma metoxila.

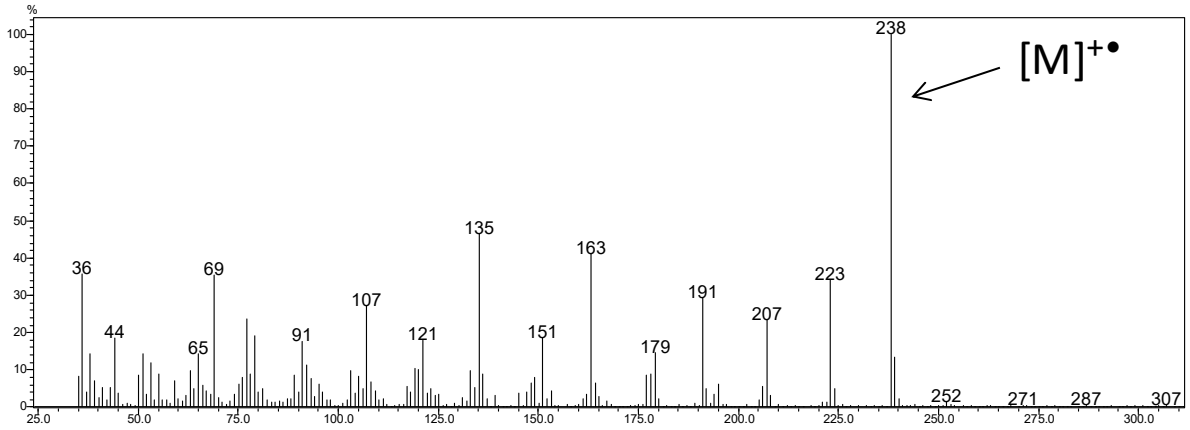
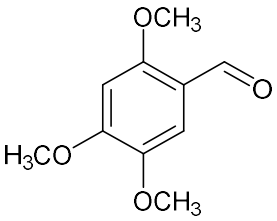


Figura 4.9. Espectro de massas (IE) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**).

No espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7A.1) observou-se a presença de dois singletos, um em δ 7,04 (s, 1H, H-3) e o outro em δ 6,51 (s,1H, H-6) referentes aos hidrogênios do anel aromático 1,2,4,5-tretrasubstituído. Observaram-se também dois dupletos um em δ 8,11 (d, J = 18,0 1H, H-7) e o outro em 6,42 (d, J = 18,0 1H, H-8), além da presença de três singletos em 3,89; 387 e 3,82 (s, 3H cada, $-OCH_3$-2; $-OCH_3$-4 e $-OCH_3$-5) correspondente as três metoxilas. No espectro de ^{13}C da substância observou-se um total de doze sinais de carbonos compatível com a fórmula molecular (Figura 7A.2). Os dados de RMN e EM foram comparados com a literatura confirmando a identificação da substância como o ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico. Este é o primeiro relato da ocorrência do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico em *Peperomia* e o mesmo padrão de substituição da pellucidina A sugerem uma relação biossintética.

4.2.6. Identificação do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído

A substância **5** foi purificada do extrato das partes aéreas da *P. pellucida* como um sólido branco. Por análise dos dados de RMN de ^{1}H,^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) bem como por comparação com os dados descritos na literatura e a estrutura do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído foi confirmada (Li et al., 2012).



2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**)

No espectro de massas de obtido por EM-IE (Figura 4.10) observou-se um pico em *m/z* = 196 Da (pico base) correspondente a $[M]^{+\bullet}$, compatível com a fórmula molecular proposta $C_{10}H_{12}O_4$. Também se observou a presença íon fragmentário em *m/z* = 181 Da (42,0%) indicando a perda de uma metila.

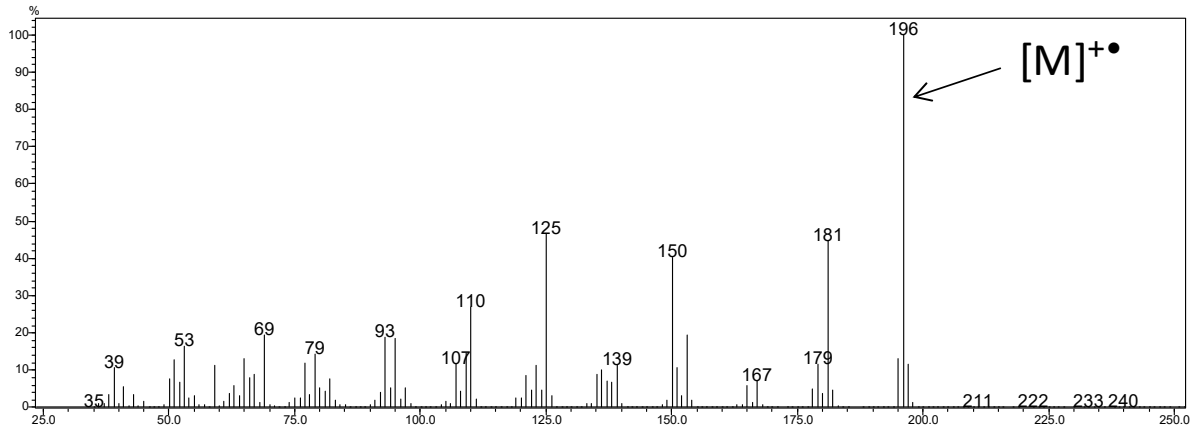


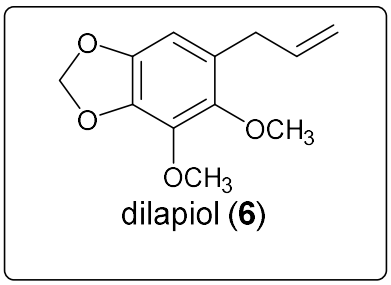
Figura 4.10. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**).

Os dados de RMN ^{1}H da substância **5** (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7A.9) obtidos para a substância, apresentaram um espectro simples contendo apenas singletos, dois sinais em δ 7.33 (s, 1H, H-6), 6.50 (s, 1H, H-3) indicativos de um sistema aromático 1,2,4,5-tretrassubstituído, um sinal em δ 10,32 (s,1H, -CHO) referente a um hidrogênio de aldeído além de três sinais em δ 3,97; 3,93 e 3,88 (s, 3H cada, $–OCH_3$) referentes as três metoxilas. No espectro de RMN ^{13}C verificou-se 10 sinais de carbonos, o que está compatível com a fórmula molecular ($C_{10}H_{12}O_4$) da substância **5** (Figura 7A.10). Um sinal de carbonila de aldeído em δ 187,99, seis sinais em δ 158,62, 155,78, 143,58, 117,38, 109,05, 95,97 confirmando a presença do anel aromático e três sinais de metoxilas em δ 56,30; 56,22 e 56,18. Os dados de RMN e EM foram comparados com os dados da

literatura confirmando a identificação da substância. O 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído já havia sido encontrado nas folhas da *Peperomia tetraphylla* (Li et al., 2012), porém esse é o seu primeiro relato para *P. pellucida* e, tal qual o ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico e o 2,4,5-trimetoxi-estireno, possuem o mesmo padrão de oxigenação do anel aromático da pellucidina A.

4.2.7. Identificação do dilapiol

O dilapiol foi purificado do extrato das folhas da *P. pellucida* como um óleo amarelo. A estrutura da substância foi confirmada por análise dos dados de RMN de ^{1}H,^{13}C e das fragmentações do espectro de massas (EM-IE) bem como por comparação com os dados descritos na literatura (Bayma et al., 2000; Chan, 2014).



No espectro de massas de obtido por EM-IE (Figura 4.11) observou-se um pico em *m/z* 222 Da (pico base) correspondente ao íon molecular ($[M]^{+\bullet}$), compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$. A comparação com os dados publicados confirmou a substância como sendo o dilapiol (Adams, 2007).

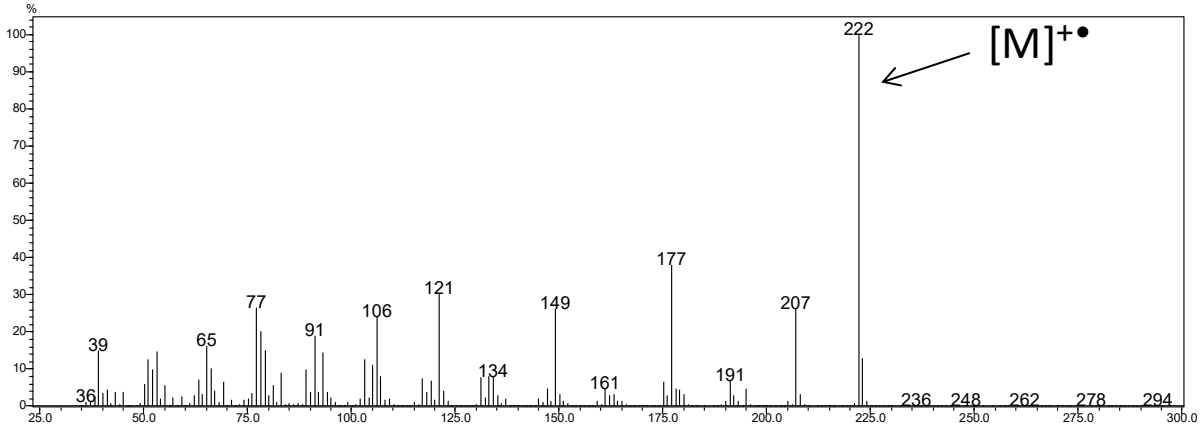


Figura 4.11. Espectro de massas (IE) do dilapiol (**6**).

No espectro de RMN ^{1}H da substância **6** ($CDCl_3$, 300 MHz) (Figura 7A.11) do dilapiol foram observados um singleto em δ 6,34 (s, 1H, H-6), compatível com um hidrogênio de anel aromático pentasubstituído, um multipleto em δ 5,92 (m,1H, H-8) sobreposto a um singleto em δ 5,95 (s, 2H, OCH_2O) correspondente ao metilenodióxido. Também se observam um multipleto em δ 5,06 (m, 2H, H-9) decorrente da sobreposição dos dois duplo dubletos dos dois hidrogênios olefínicos de uma ligação dupla terminal carbono-carbono trissubstituido, dois singletos intensos em δ 4,00 (s, 3H) e δ 3,75 (s, 3H) de grupamentos metoxilas e um dupleto em δ 3,32 (d, J 6Hz, 2H, H-7) de hidrogênios alílicos.

4.3. Quantificação dos compostos isolados presentes nos extratos

A quantificação dos compostos isolados nas diferentes partes da *P. pellucida* foi determinada de acordo com metodologia descrita (Collins et al., 1995). É nítido que a 5,6,7-trimetoxi-flavona constitui-se no principal metabólito secundário em todas as partes da planta (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Análise quantitativa das substâncias identificadas nas diferentes partes da *P. pellucida* (mg/g de extrato ± DP).

Substância	Folhas	Caule	Raiz	Frutos
ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**)	9,7 ± 0,99	-	-	-
5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**)	126,5 ± 8,32	138,0 ± 5,45	102,0 ± 1,0	99,8 ± 3,5
2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**)	17,7 ± 1,21	16,3 ± 0,76	35,2 ± 0,88	26,3 ± 1,80
sesamina (**4**)	35,5 ± 3,21	24,5 ± 0,95	-	-
2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**)	19,0 ± 0,89	-	60,6 ± 2,31	-
dilapiol (**6**)	48,9 ± 1,52	27,3 ± 1,61	-	4,4 ± 0,45
pellucidina A (**7**)	3,5 ± 0,39	2,3±0,23	-	-

A análise fitoquímica permitiu a detecção da pellucidina A nas folhas da *P. pellucida* que também foi verificada nos caules e frutos da planta, porém a substância foi encontrada apenas em pequena quantidade (Figura 4.1; Tabela 4.4). A partir desse resultado foi iniciada uma série estudos objetivando investigar possíveis fatores que resultassem em um maior acúmulo da substância na *P. pellucida* em diferentes fases de desenvolvimento ou em diferentes condições de estresses.

4.4. Variações ontogenéticas e perfil químico das folhas das plântulas da *P. pellucida.*

Devido à baixa produção da pellucidina A na *P. pellucida* foi iniciado um estudo metabolômico, com o objetivo de investigar uma possível variação na produção da pellucidina A na planta durante sua ontogenia.

O monitoramento periódico do metabolismo secundário de *P. pellucida* foi realizado a partir de coletas das folhas das plântulas em espécimes com 1, 2, 4 e 6 meses de idade. Com 6 meses de idade a *P. pellucida* pode ser considerada adulta, uma vez que já apresenta a produção de frutos.

Os extratos brutos das folhas foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) a partir dos dados obtidos por RMN de ^{1}H. A identificação dos compostos presentes nas diferentes fases de desemvolvimento da *P. pellucida* foi realizada através de análises por CG-EM e CLAE-UV dos extratos brutos e por comparação com os compostos puros.

Na análise de PCA utilizando-se dados de RMN ^{1}H dos extratos brutos, o gráfico de scores (Figura 4.12) evidenciou 93% da variância entre os dados, sendo 87% deles explicados por PC1 e 6% por PC2. Com os resultados verifica-se a discriminação entre as folhas das plântulas e as folhas adultas.

No gráfico de *loadings* (Figura 4.12) observou-se as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos. Para as folhas adultas constatou-se que os valores discriminantes são correspondentes aos deslocamentos químicos do dilapiol e da sesamina em δ 5,95 relativos ao grupo metilenodioxila, em δ 3,75 e 4,00 relativos aos grupos metoxílicos dos dilapiol e em δ 6,84 relativo ao hidrogênio 9/9' da sesamina (Figura 4.13).

Outra separação observada na análise de PCA corresponde às amostras com 4 meses de idade em que se observam os valores correspondentes aos deslocamentos químicos do 2,4,5-trimetoxi-estireno em δ 3,82, 3,82 e 3,89 associados aos sinais dos hidrogênios das metoxilas, além do sinal em δ 7,04 relativo ao duplo dupleto do grupo vinila (Figura 4.13).

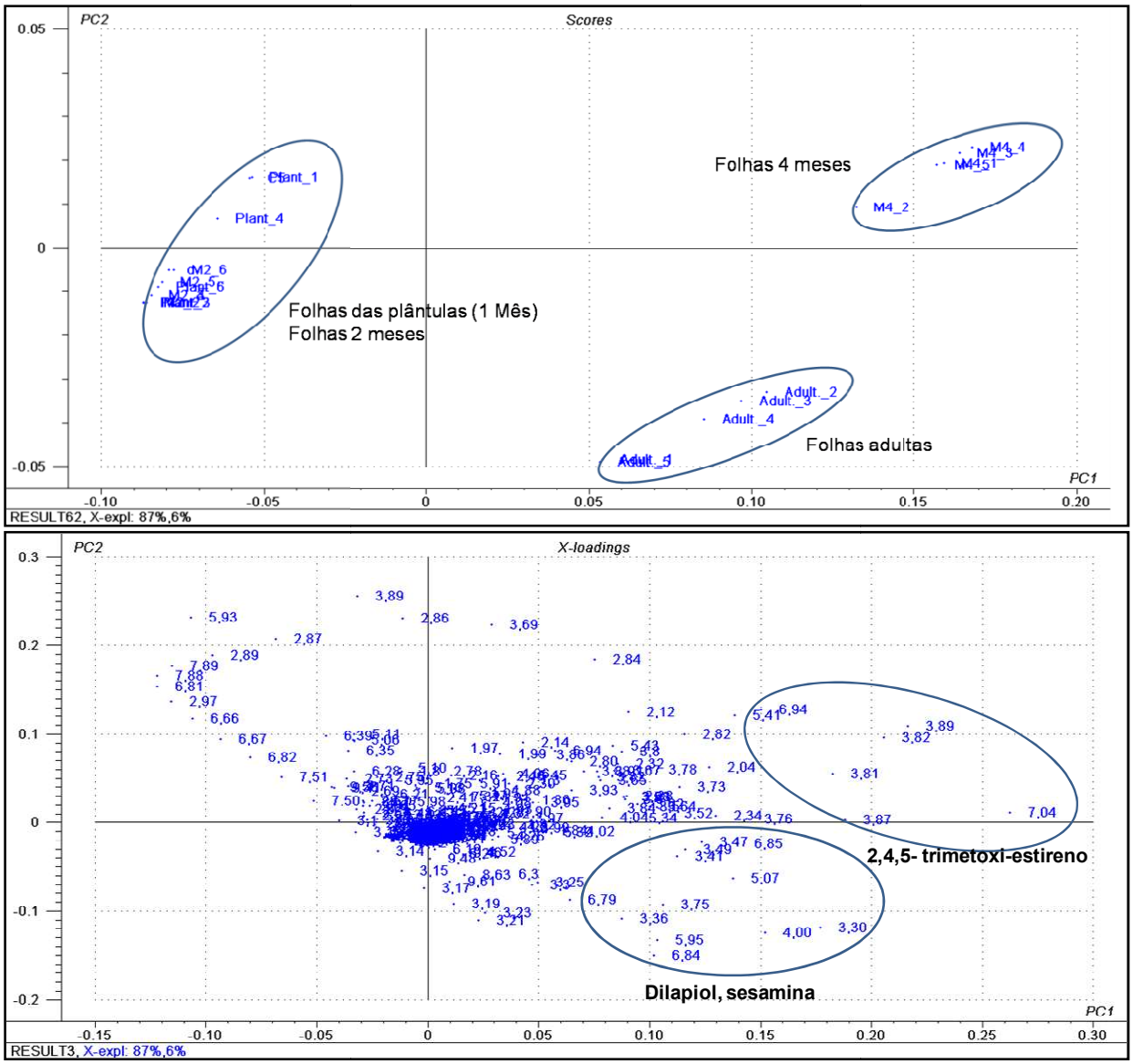


Figura 4.12. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de *P. pellucida* (folhas adultas e folhas das plântulas em diferentes estágios).

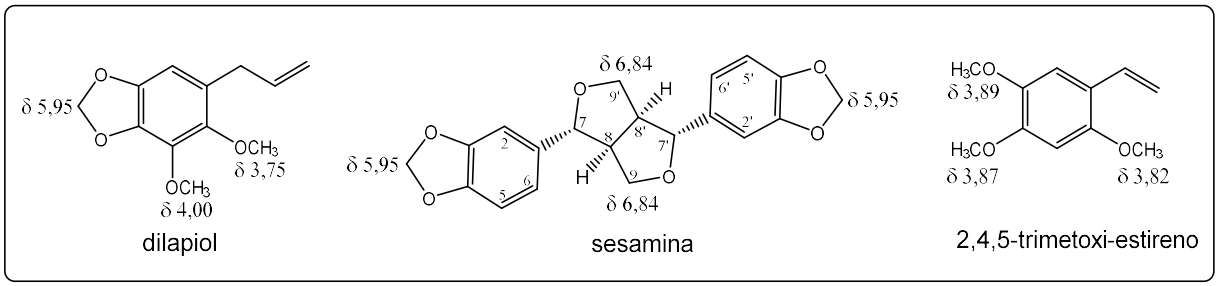


Figura 4.13. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de *P. pellucida*.

As análises por CLAE-UV (Figura 4.14) das folhas de *P. pellucida* em diferentes fases de desenvolvimento mostraram que a substância 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**) é encontrada como constituinte majoritário em todas as fases de desenvolvimento da planta. Na fase de plântula fica ainda mais evidente sua presença, uma vez que nesta fase a composição química da planta é constituída basicamente pela substância.

Com 4 meses de idade observa-se na planta além da 5,6,7-trimetoxi-flavona, a presença do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**), sesamina (**5**) dilapiol (**6**) e a pellucidina A (**7**), sendo os três últimos em baixo percentual relativo. O perfil cromatográfico do extrato das folhas na fase adulta apresenta além dos compostos já mencionados o ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**) e o 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**4**).

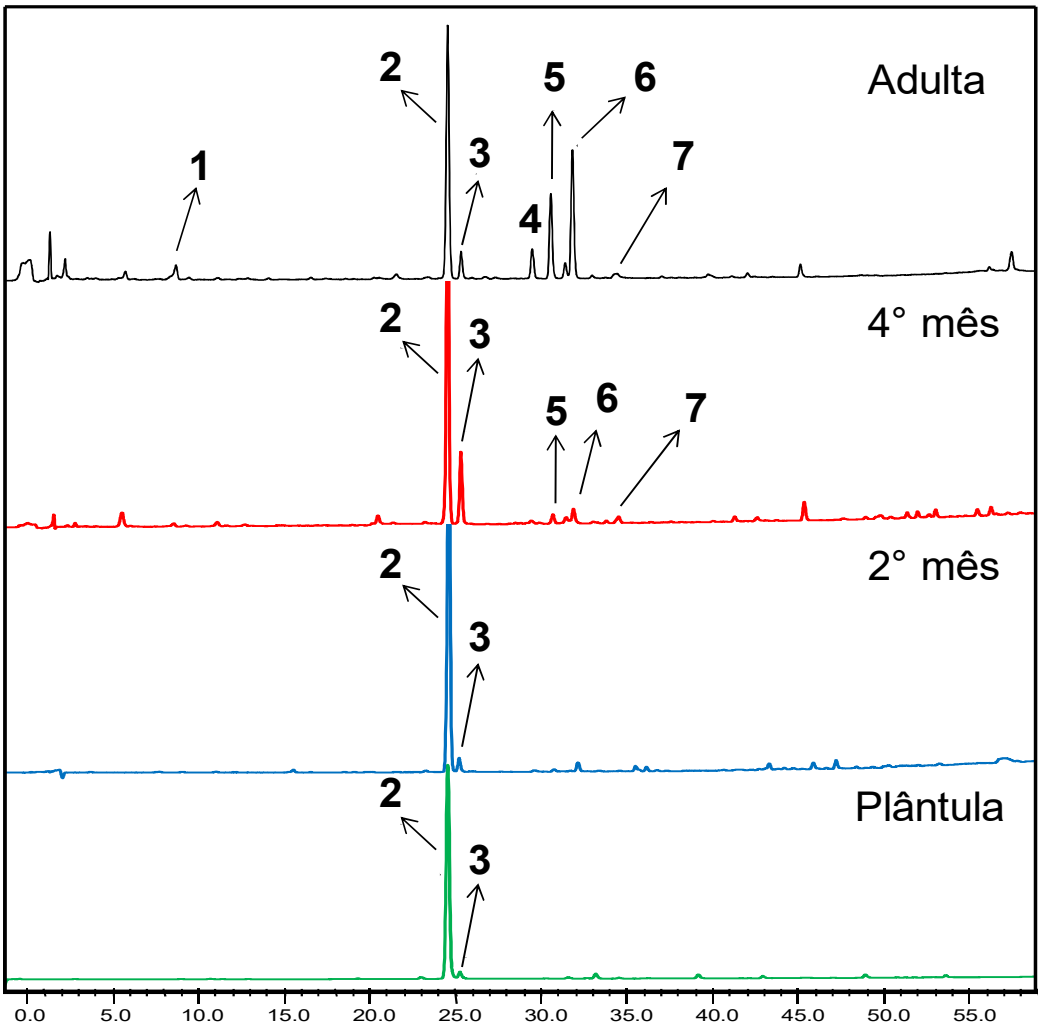


Figura 4.14. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. pellucida*. Ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**); 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**); 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**); sesamina (**4**); 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**); dilapiol (**6**) e pellucidina A (**7**).

Diversos estudos mostram a ocorrência de variações quantitativas e qualitativas dos metabólitos secundários encontrados em plântulas que podem estar relacionados à defesa contra inimigos naturais (Barton, 2008). Outro fator que pode estar relacionado é o custo biossintético na produção de várias substâncias pode ser alto para plântulas considerando que nos primeiros estágios há limitação de área fotossintética. Assim, plântulas podem ser forçadas a produzir uma menor variedade de metabólitos (Boege and Marquis, 2005).

Variações quantitativa e qualitativa no perfil químico de plantas em diferentes estágios de crescimento após sua a germinação é relatada em outras espécies como *P. gaudichaudianum* (Gaia et al., 2014), *Cannabis sativa* (Vogelmann et al., 1988), *Virola sebifera* (Danelutte et al., 2000) e *Araucaria angustifolia* (Fonseca et al., 2000).

No caso da *P. pellucida* variações qualitativas e quantitativas são observadas, porém, em nenhuma das fases estudadas observou-se uma maior produção da pellucidina A, como desejado para fins de estudos biossintéticos.

4.5. Variações metabólicas no perfil químico das folhas da *P. pellucida* sob estresses.

Diante da baixa produção de pellucidina A pela *P. pellucida,* foi iniciada uma série de estudos no qual a planta foi condicionada a diferentes condições de estresses, objetivando investigar a ocorrência de variações quantitativas na produção desta substância.

Dessa forma, além das plantas controle (cultivada sem algum tipo de interferente) alguns espécimes da *P. pellucida* foram condicionados a diferentes condições de estresses como: injúria mecânica, estresse hídrico, ausência de luz, exposição à luz UV, aumento de temperatura (40°C) e adição de ácido jasmônico. A planta também foi mantida em condições de estresse biótico com sua exposição a predadores naturais como *Edessa meditabunda* (Hemiptera)*, Monoplatus* sp. (Coleoptera)*,* e Geometridae sp. (Lepidoptera). Os espécimes da *P. pellucida* foram mantidos nas diferentes condições por 24, 48, 72 e 120 h e, após o decorrer desse período, as folhas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e os extratos foram obtidos (Seção 3.5.) Todos os extratos foram analisados por RMN ^{1}H de 300 MHz e os espectros obtidos foram então submetidos à análise de PCA (Figura 4.15).

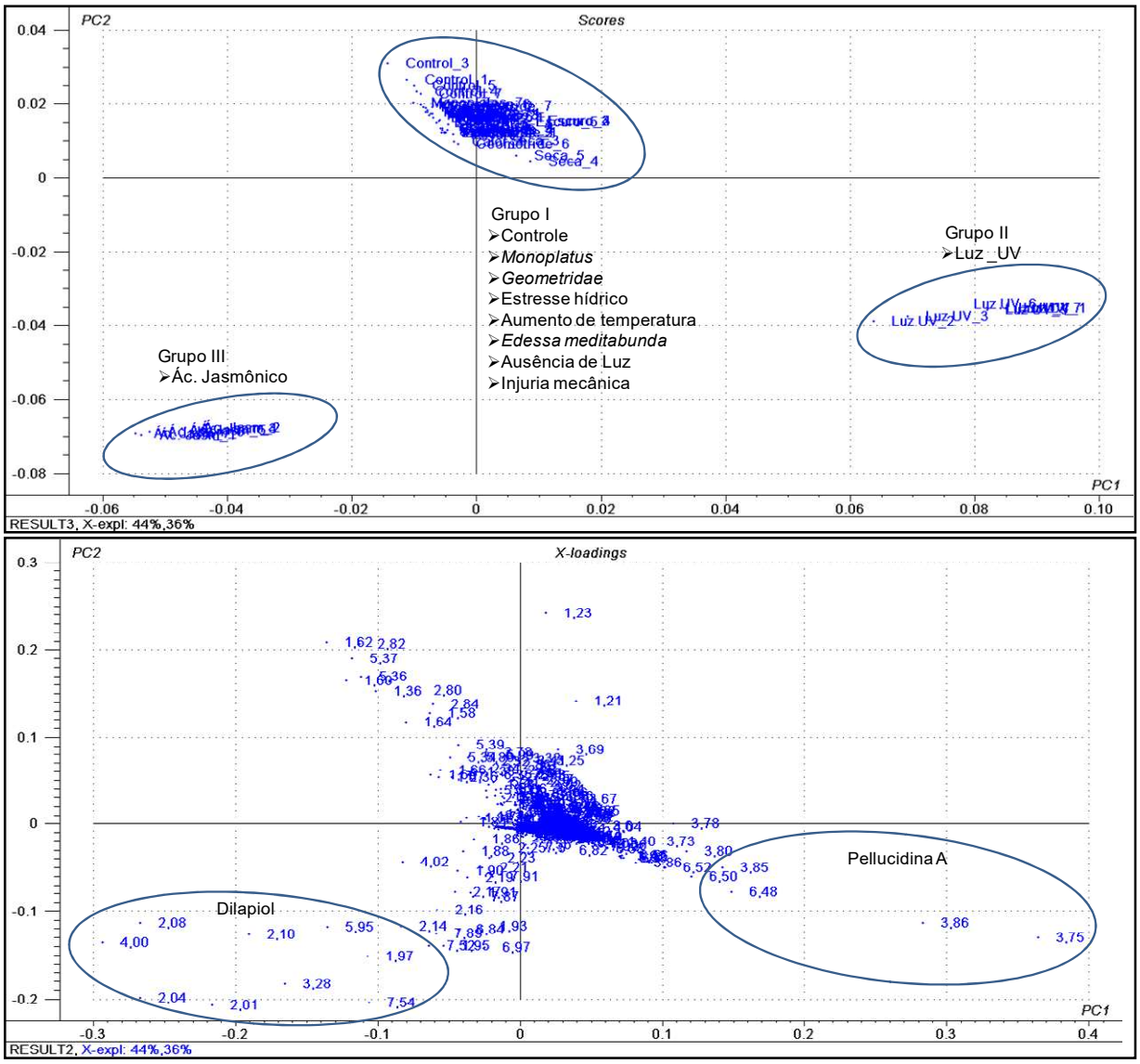


Figura 4.15. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de *P. pellucida* (sob diferentes condições de estresses).

Na análise por PCA das amostras (Figura 4.15) os componentes principais (PC1 e PC2) representaram 80% da separação das amostras. No gráfico scores foi possível observar a formação de três agrupamentos distintos. O grupo principal (I) foi constituído pela maior parte dos extratos analisados: estresse hídrico, injúrias mecânicas, ausência de luz, aumento de temperatura (40°C), herbivoria por *E. meditabunda, Monoplatus* sp., Geometridae e o controle. Esse agrupamento sobrepondo-se as amostras controle, indicou que essas condições aplicadas a *P. pellucida* não indicaram diferenças

significativas em seu perfil químico, isto é a planta não apresentou nenhuma resposta em nível de metabólitos secundários diante desses tratamentos.

No entanto, observou-se que as amostras de *P. pellucida* mantidas sob luz UV e tratadas com ácido jasmônico apresentaram diferenças significativas para serem separadas das amostras do grupo (I).

Analisando-se o gráfico de *loadings* do grupo das amostras que foram mantidas sob luz UV (grupo II) verificou-se entre as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos valores correspondentes aos deslocamentos químicos da pellucidina A (Figura 4.16), sendo observados valores em δ 3,75, 3,85 e 3,86 correspondentes as metoxilas e em δ 6,48 relativo aos hidrogênios 3/3' dos anéis aromáticos.

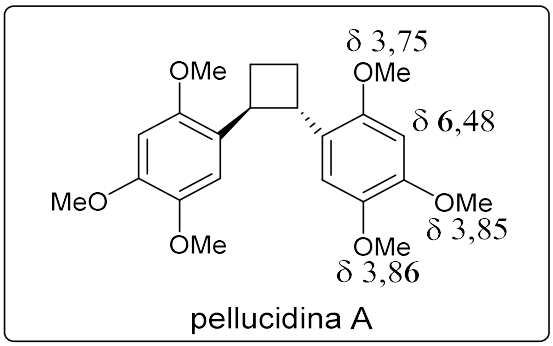


Figura 4.16. Estrutura da pellucidina A e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de *P. pellucida*.

Para o grupo (III) correspondente às amostras tratadas com ácido jasmônico, o gráfico de *loadings* mostra entre as principais variáveis responsáveis pela separação do grupo, valores correspondentes aos deslocamentos químicos do dilapiol (Figura 4.17) em δ 5,95 relativos ao grupo metilenodioxila, δ 4,00 relativos ao grupo metoxila e em δ 3,28 relativo aos hidrogênios metilênicos.

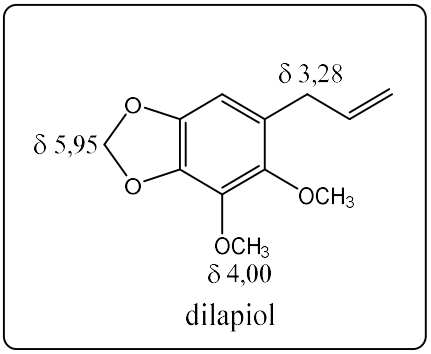


Figura 4.17. Estrutura do dilapiol com atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{1}H encontrado.

As análises por CLAE-UV (Figura 4.18) mostraram que os extratos das folhas de *P. pellucida* submetidas a estresse hídrico, injúrias mecânicas, ausência de luz, aumento de temperatura, herbivoria por *E. meditabunda, Monoplatus* sp. e Geometridae não apresentaram diferenças das amostras e o controle.

As análises de CLAE-UV dos extratos de folhas das amostras que foram tratadas com o ácido jasmônico mostraram um aumento na produção de dilapiol quando comparada com as amostras controle. O aumento na produção do composto é o responsável pelos sinais que aparecem no gráfico de *loadings* causando a separação da amostra na análise de PCA.

O dilapiol é relatado na literatura por apresentar atividade contra herbívoros. Assim, o aumento na produção do dilapiol pela *P. pellucida* tratada com ácido jasmônico esta de acordo com a literatura uma vez que a aplicação do ácido jasmônico nas folhas de plantas simula sinais de predação, estimulando assim como resposta a produção de metabólitos secundários, que desempenham atividade protetora contra herbívoros (Babst et al., 2005; Baldwin, 1996; Reinbothe et al., 1994; Thaler et al., 1996).

Na análise de CLAE-UV e CG-EM das amostras de *P. pellucida* sob o tratamento de luz UV indicaram um aumento na produção da pellucidina A. Esse resultado está de acordo com diversos autores que afirmam que a formação dos diferentes ciclobutanos encontrados na natureza deve ocorrer por meio de reações de cicloadição [2+2] mediada por luz UV (Bach and Hehn, 2011; Hong and Tantillo, 2014; Liu et al., 2011; Pan et al., 2015; Tang et al., 2015; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2013).

Com esse o aumento na produção da pellucidina A outros experimentos foram realizados com *P. pellucida* sob a mesma condição de luz em maiores períodos de tempo.

Porém a exposição da planta em períodos maiores do que 120h não indicaram nenhum aumento na produção da pellucidina A.

O aumento na produção da pellucidina A pela *P. pellucida* sob luz UV indica que a substância pode exercer na planta uma função fotoprotetora. O tratamento de luz UV que foi aplicada à *P. pellucida,* quando aplicado a outras duas espécies de *Peperomia*: *P. glabela* e *P. obtusifolia,* levaram essas plantas à morte em períodos superiores à 48h.

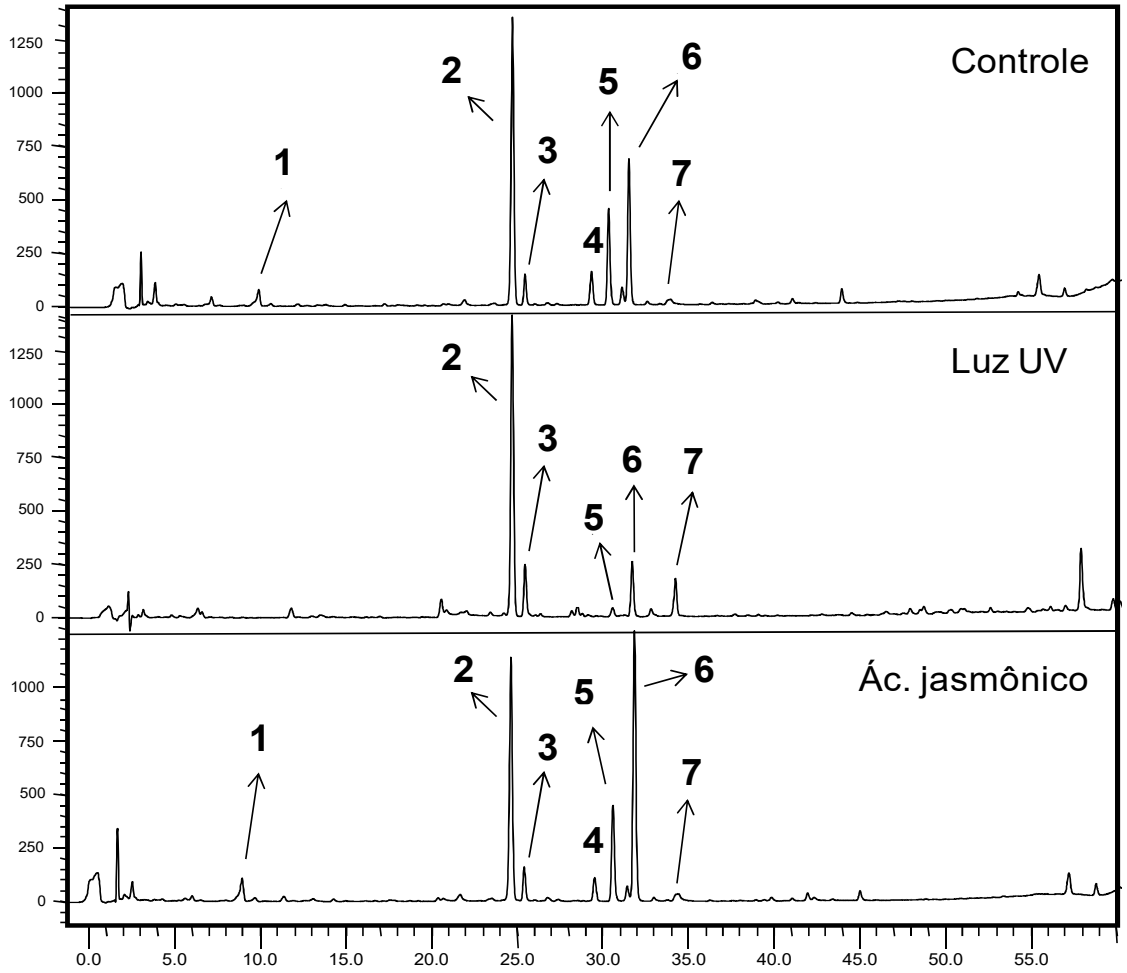
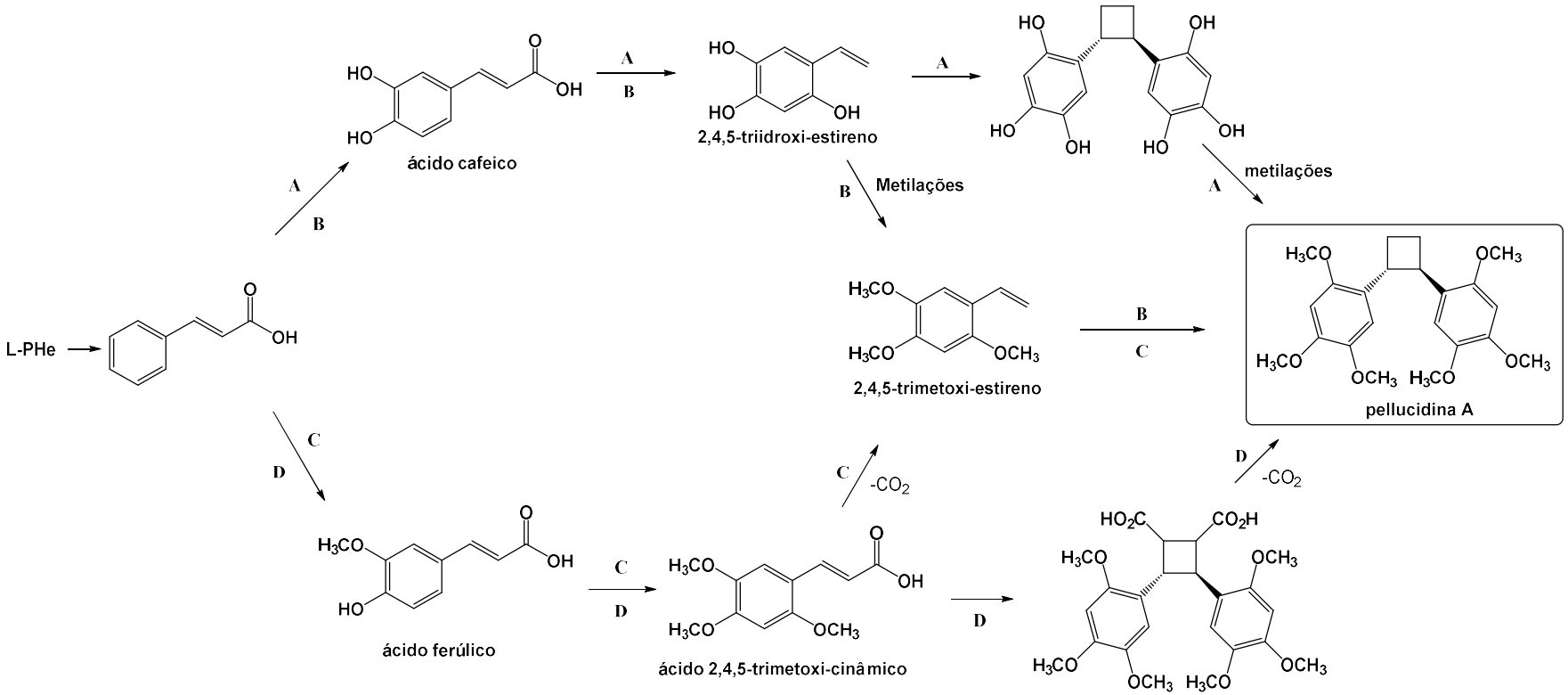


Figura 4.18. Análise por CLAE dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* sob diferentes condições de estresses. Ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**); 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**); 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**); sesamina (**4**); 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**); dilapiol (**6**) e pellucidina A (**7**).

4.6. Proposta biossintética para a formação da pellucidina A

Os resultados das análises fitoquímicas indicaram a presença do 2,4,5-trimetoxi-estireno e o ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico nos extratos da *P. pellucida,* sugerindo a possibilidade desses dois compostos estarem envolvidos na biossíntese da pellucidina A. Além disso, o aumento na produção da pellucidina A quando a planta foi exposta a luz UV, nos remete mais uma vez a possibilidade do envolvimento de uma reação de cicloadição [2+2] na formação da pellucidina A.

Dessa forma, foi elaborada uma proposta de estudo biossintético considerando-se quatro possibilidades para a formação da pellucidina A (Esquema 4.4). Na primeira (A) foi levada em consideração as afirmações dos autores (Bayma et al., 2000) em que duas unidades de 2,4,5-triidroxi-estireno sofrem uma dimerização seguida por uma série de metilações resultando na pellucidina A. Numa segunda (B) o 2,4,5-triidroxi-estireno é metilado formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno que em seguida sofre uma dimerização. Numa terceira (C) o 2,4,5-trimetoxi-estireno é proveniente do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico decorrente de uma descarboxilação. Na quarta (D), haveria uma dimerização entre duas unidades de ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico seguida por duas descarboxilações formando a pellucidina A.



Esquema 4.4. Proposta biossintética para a formação da pellucidina A.

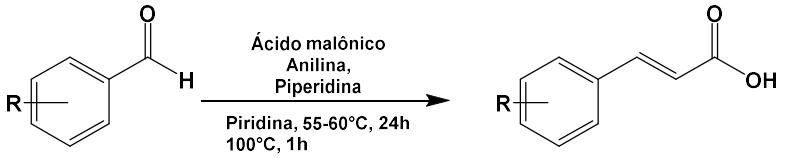
4.7. Preparação dos derivados de ácidos cinâmicos e estirenos

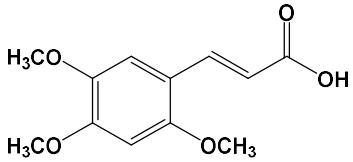
Com o objetivo de se investigar a especificidade da *P. pellucida* na biossíntese da pellucidina a partir de estirenos com padrões de substituição específicos, foram preparados uma série de derivados de ácidos cinâmicos e estirenos. Esses precursores foram avaliados através de incorporações na *P. pellucida in vivo* e também incubados em experimentos de conversão enzimática.

A preparação da série contendo os derivados de ácidos cinâmicos foi realizada através da reação de condensação de Knoevenagel (Katayama et al., 1992). Os ácidos isotopicamente marcado com carbono treze foram preparados usando o ácido malônico marcado adquirido junto a *Sigma Aldrich*. Foram obtidos quinze ácidos cinâmicos diferentes e um derivado hidrogenado (**A1**-**A15**, Tabela 4.5). Todas as reações apresentaram rendimento acima de 90%. As estruturas dos ácidos cinâmicos foram confirmadas com os dados disponíveis na literatura (Katayama et al., 1992; Mitra et al., 1999).

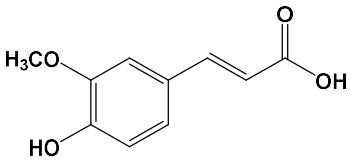
Os derivados de estirenos foram preparados através da reação de Wittig (Farina et al., 2007). Os estirenos isotopicamente marcados com carbono treze foram preparados a partir da metil-trifenilfosfina preparada com o iodeto de metila isotopicamente marcado com carbono treze, adquirido junto a *Sigma Aldrich*. Foram obtidos dezessete estirenos diferentes e dois derivados hidrogenados (**E1**-**E17**, Tabela 4.6). Todas as reações apresentaram rendimento acima de 80%. As estruturas dos estirenos foram confirmadas por comparação com os dados disponíveis na literatura (Albert et al., 2011; Simpson et al., 2005; Sinha et al., 2007).

Tabela 4.5. Preparações dos ácidos cinâmicos.

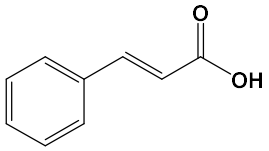




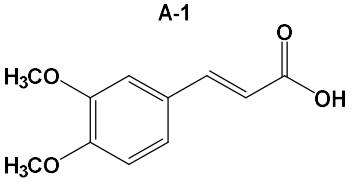
ác. 2,4,5-trimetoxi-cinâmico
A-1



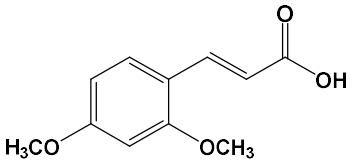
ác. ferúlico
A-2



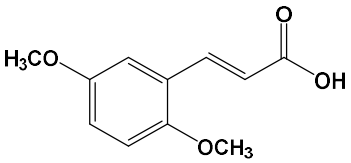
ác. cinâmico
A-3



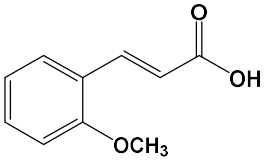
ác. 3,4-dimetoxi-cinâmico
A-4



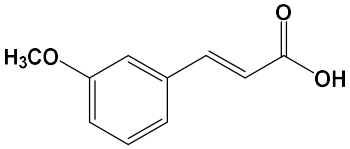
ác. 2,4-dimetoxi-cinâmico
A-5



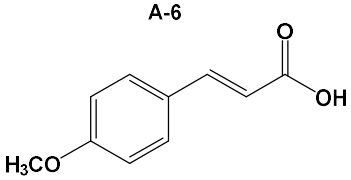
ác. 2,5-dimetoxi-cinâmico
A-6



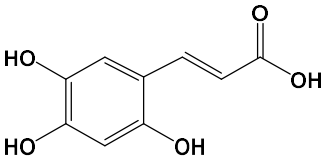
ác. 2-metoxi-cinâmico
A-7



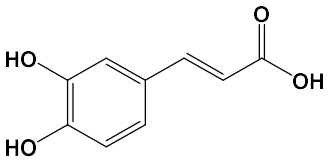
ác. 3-metoxi-cinâmico
A-8



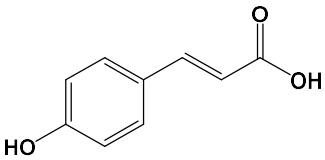
ác. 4-metoxi-cinâmico
A-9



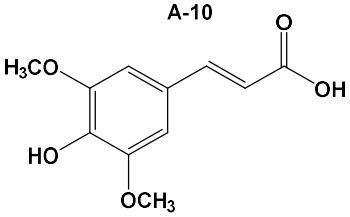
ác. 2,4,5-triidroxi-cinâmico
A-10



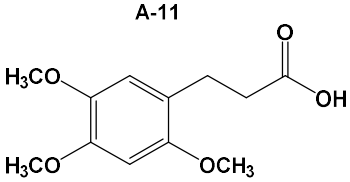
ác. caféico
A-11



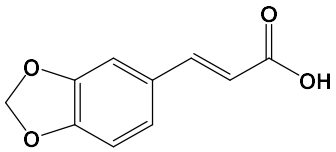
ác. 4-hidroxi-cinâmico
A-12



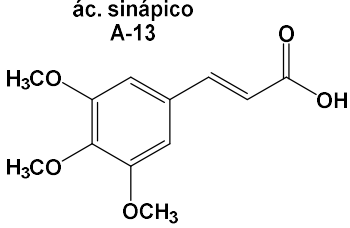
ác. sinápico
A-13



ác. 2,4,5-trimetoxi-fenil-propanóico
A-14

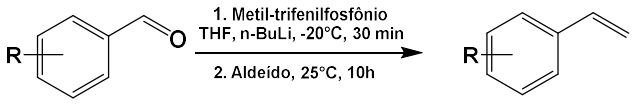


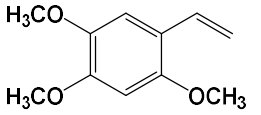
ác. 3,4-metilenodioxi-cinâmico
A-15



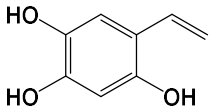
ác. 3,4,5-trimetoxi-cinâmico
A-16

Tabela 4.6. Preparações dos estirenos.

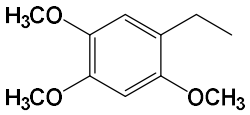




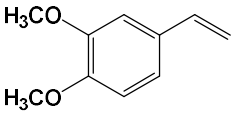
2,4,5-trimetoxi-estireno
E-1



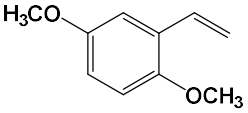
2,4,5-triidroxi-estireno
E-2



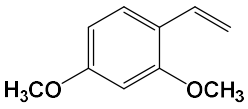
2,4,5-trimetoxi-fenil-1-etil
E-3



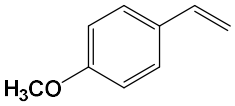
3,4-dimetoxi-estireno
E-4



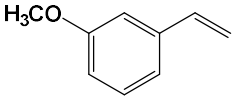
2,5-dimetoxi-estireno
E-5



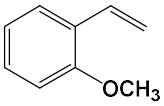
2,4-dimetoxi-estireno
E-6



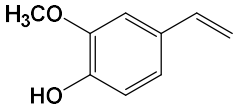
4-metoxi-estireno
E-7



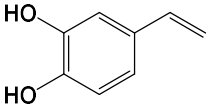
3-metoxi-estireno
E-8



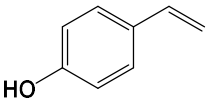
2-metoxi-estireno
E-9



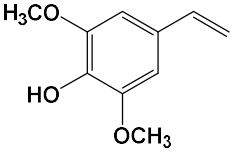
3-metoxi-4-hidroxi-estireno
E-10



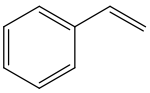
3,4-diidroxi-estireno
E-11



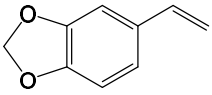
4-hidroxi-estireno
E-12



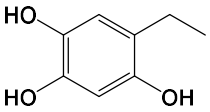
3,5-dimetoxi-4-hidroxi-estireno
E-13



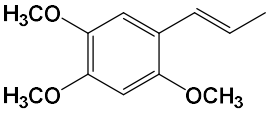
Estireno
E-14



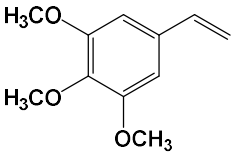
Ác. 3,4-metilenodioxi-estireno
E-15



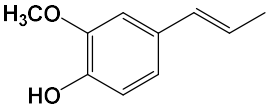
2,4,5-triidroxi-fenil-1-etil
E-16



2,4,5-trimetoxi-fenil-1-propenil
E-17



3,4,5-dimetoxi-estireno
E-18



3-hidroxi-4-metoxi-fenil-1-propenil
E-19

4.8. Incorporação dos precursores na pellucidina A

4.8.1. Análise da incorporação de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina

Com o objetivo de se elucidar a rota biossintética da pellucidina A (*m/z* = 388 Da), foram realizados experimentos de incorporação com precursores isotopicamente marcados com carbono treze. Inicialmente foram realizados experimentos de incorporação com o isotopômero de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina. O percentual de incorporação de carbono treze na pellucidina A foi determinado por meio de análises de CG-EM, dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* incubadas com o precursor isotopicamente marcado, comparando com o extrato das folhas controle e com a pellucidina A pura. Os cálculos para determinação do percentual de incorporação dos precursores isotopicamente marcados com carbono treze foi realizado seguindo a metodologia descrita (seção 3.12) (Opitz et al., 2014).

No espectro de massas da pellucidina A, as massas referentes a 388,0 ($[M]^+$); 194,0 e 179,0 Da indicam alguns sinais esperados para a substância. O aumento do percentual dos íons em *m/z* = 389,0 ($[M+1]^+$), 195,0, 180 e 152,0 foram atribuídas a pellucidina A enriquecida com um átomo carbono treze enquanto o aumento do percentual das massas moleculares de 390,0 ($[M+2]^+$), 196,0, 181,0 e 153 foram atribuídas a pellucidina A enriquecida com dois átomos de carbono treze.

As análises realizadas confirmaram o enriquecimento de carbono treze, proveniente da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina, na pellucidina A. A comparação do espectros mostraram um aumento no percentual das massas 389,0 ($[M+1]^+$), 195,0, 180,0 e 152,0 (Figura 4.19). Os percentuais de incorporação são expressos graficamente nos diferentes tempos de incubação (Figura 4.20), onde é verificada uma maior incorporação do isotopômero de *L*-fenilalanina após 72 horas de incubação com máximo de incorporação de carbono treze de 0,71%.

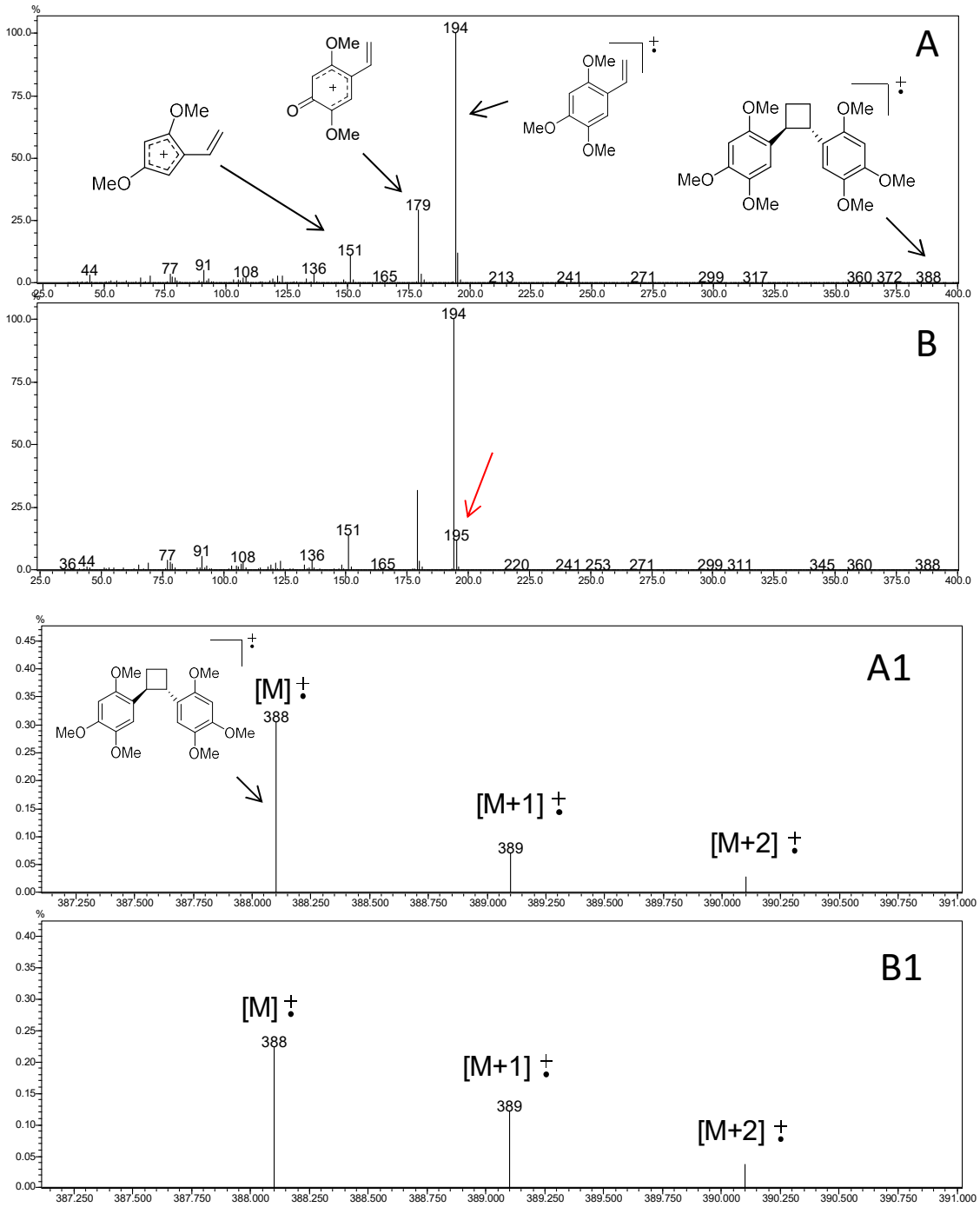


Figura 4.19. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (A); (B) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina.

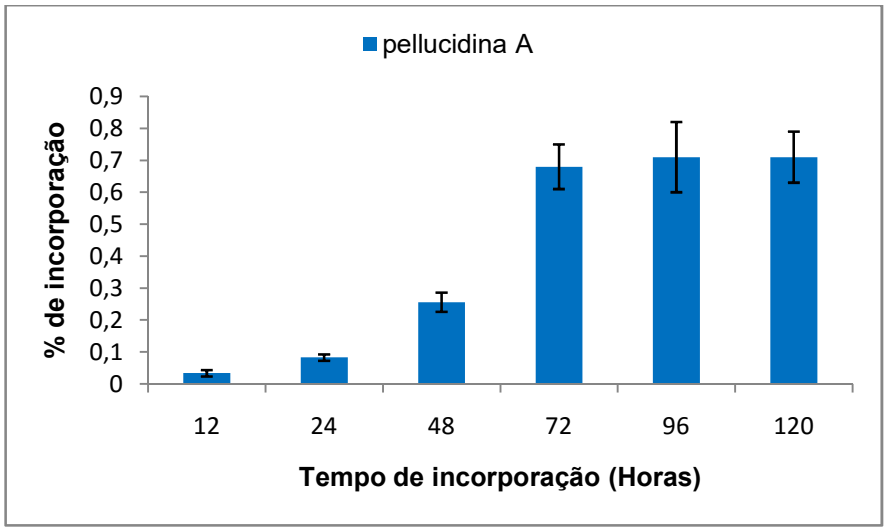


Figura 4.20. Incorporação da pellucidina A enriquecida com isotopômeros de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina.

Considerando-se as possibilidades biossintéticas da pellucidina A (Esquema 4.5), foram realizados rastreamentos por espectometria de massas dos extratos incubados com *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina, com o objetivo de verificar possíveis enriquecimentos por carbono treze nos compostos considerados como possíveis precursores como o 2,4,5-trimetoxi-estireno, 2,4,5-triidroxi-estireno e ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico. A constatação de um enriquecimento por carbono treze a partir desses compostos forneceria de suas participações na biossíntese da pellucidina A.

Por outro lado, foi verificado o enriquecimento de carbono treze proveniente da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina no ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico e no 2,4,5-trimetoxi-estireno (Figura 4.21 e 4.22). Os compostos apresentaram percentual de incorporação de carbono treze de 1,49 e 3,92%, respectivamente. Os percentuais de incorporação são expressos graficamente nos diferentes tempos de incubação (Figura 4.23). Estes resultados estão de acordo com uma das propostas para a rota biossintética da pellucidina A (Rota C; Esquema 4.4). A incorporação de carbono treze encontrado no 2,4,5-trimetoxi-estireno deve ocorrer através de uma etapa de desaminação da *L*-fenilalanina, formando o ácido cinâmico (Esquema 4.5), seguida por uma série de oxidação e metilações até ser convertida no ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico que, por sua vez, sofre uma descarboxilação formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno.

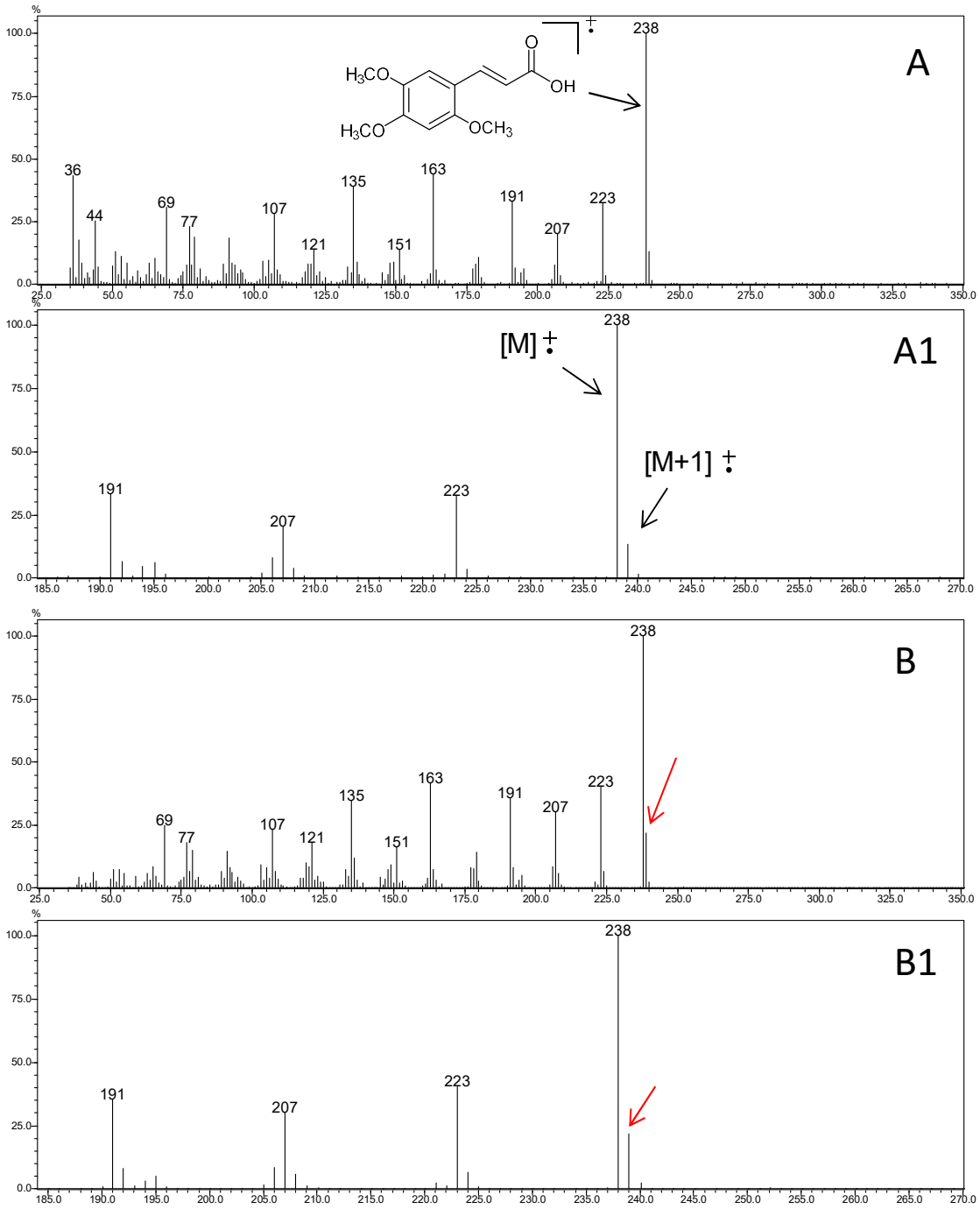


Figura 4.21. Espectro de massas (IE) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico com abundância natural (**A**); (**B**) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina; (**A1**) Ampliação de (**A**); (**B1**) Ampliação de (**B**).

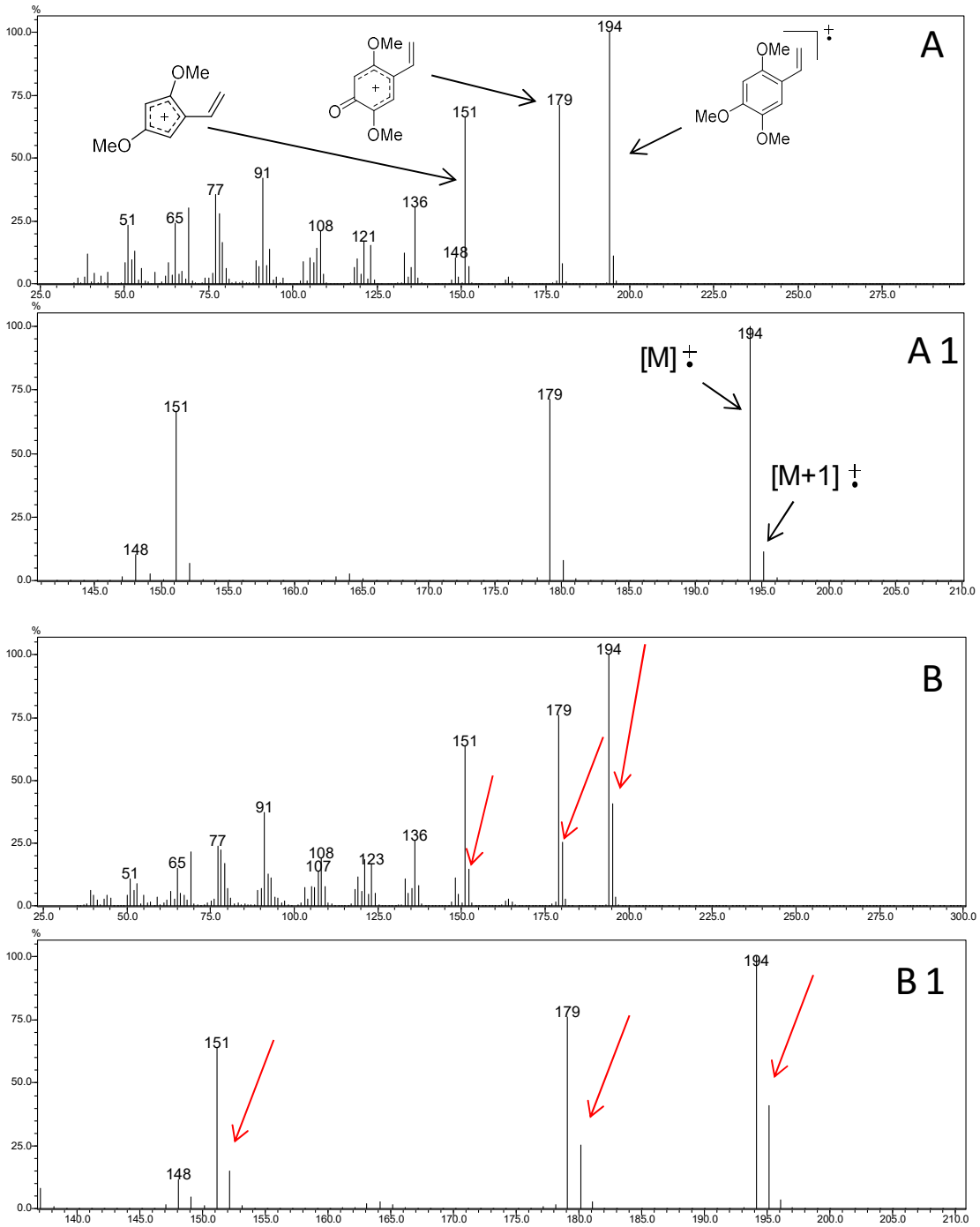


Figura 4.22. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno com abundância natural (**A**); (**B**) Incorporação da *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina; (**A1**) Ampliação de (**A**); (**B1**) Ampliação de (**B**).

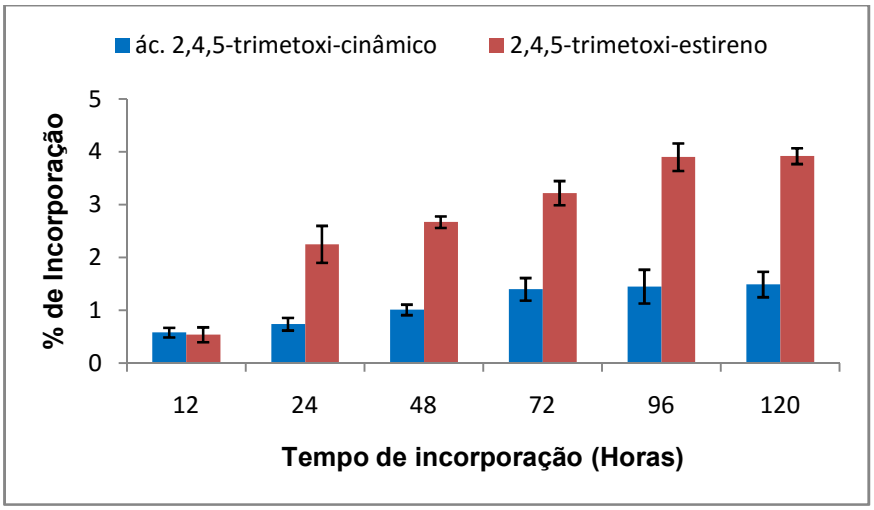
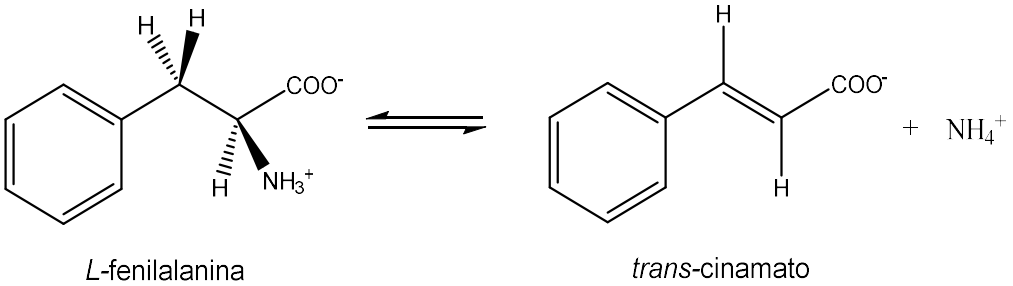


Figura 4.23. Incorporação do isotopômeros de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina no ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico e no 2,4,5-trimetoxi-estireno.



Esquema 4.5. Reação de desaminação da *L*-fenilalanina em *trans*-cinamato.

Os estudos biossintéticos do fenilpropanoide anetol em *Pimpinella anisum* utilizando-se a *L*-fenilalanina marcada com carbono quatorze indicou a incorporação de toda a cadeia lateral (Manitto et al., 1974). Nesta reação, ocorre desaminação catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e eliminação de amônia. O hidrogênio vicinal é retirado do aminoácido dando origem ao ácido *trans*-cinâmico (Esquema 4.4) (Wightman et al., 1972). Estudos biossintéticos mostram a incorporações com *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina em várias lignanas como, por exemplo, na *E*-isoelemicina (0,02-0,8%) e verrucosina (0,09-0,012%) em *Virola surinamensis* e na sesamina (0,11%) e sesamolina (0,16%) em *Sesamun indicum* (Kato et al., 1998; Lopes et al., 2004).

4.8.2. Análises da incorporação do ácido [8-^{13}C]-cinâmico e ácido [8-^{13}C]-ferúlico.

As análises por CG-EM dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* incubadas com ácido [8-^{13}C]-cinâmico e ácido [8-^{13}C]-ferúlico, mostraram a incorporação desses precursores na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno.

As incorporações do ácido [8-^{13}C]-cinâmico ao longo de 12-120h resultaram na incorporação na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno com um percentual máximo de incorporação do carbono treze de 1,32 e 2,89%, respectivamente (Figura 4.24).

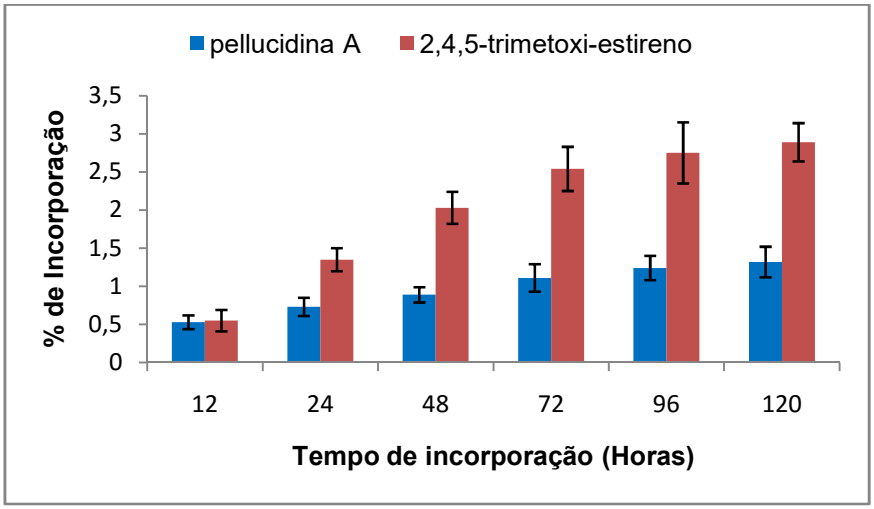


Figura 4.24. Incorporação na pellucidina A e do 2,4,5-trimetoxi-estireno enriquecidos com isotopômeros de ácido [8-^{13}C]-cinâmico.

A incubação da *P. pellucida* com o ácido [8-^{13}C]-ferúlico apresentou um percentual de incorporação de carbono treze tanto na pellucidina A (0,51%) quanto no 2,4,5-trimetoxi-estireno (0,69%) (Figura 4.25). O baixo percentual de incorporação pode ser justificado pelo fato das amostras incubadas com o composto por período maior do que 48h apresentavam sinais de oxidação. Outro fator pode ser devido a baixa solubilidade do ácido [8-^{13}C]-ferúlico em solução aquosa, que pode ter causado dificuldades no seu transporte para o(s) sítio(s) da biossíntese (Davin et al., 2003; Vassao et al., 2006).

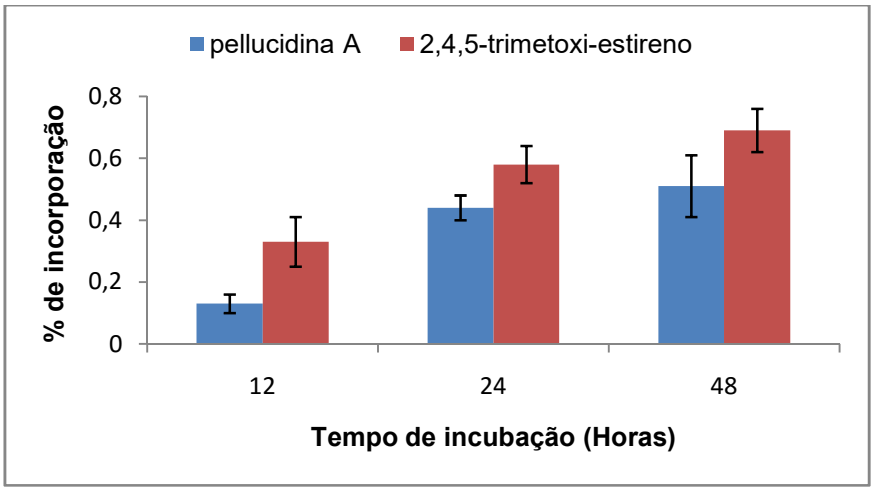


Figura 4.25. Incorporação na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno enriquecidos com isotopômeros de ácido [8-^{13}C]-ferúlico.

Diversos estudos biossintéticos mostraram baixos níveis incorporação do ácido cinâmicos e ácido ferúlico em lignanas como no caso da podofilotoxina, em plantas jovens (2 a 3 anos) de *Podophyllum hexandrum.* Os percentuais de incorporação dos ácidos foram de 0,040 e 0,053%, respectivamente (Jackson and Dewick, 1984). É relatada a incorporação dos ácidos no estudo biossintético da (+)-lioniresinol encontrado na *Lyonia ovalifolia* com percentuais de incorporação de 0,013-2,750 % e nos caules entre 0,036-0,380 % (Rahman et al., 2007). Em lignanas ciclobutânicas como os ácidos (-)-*cis*-blechinico, (-)-*trans*-blechinico e o ácido (-)-brainico de *Blechnum spicant*, os percentuais de incorporação foram entre 1,0-4,2% (Davin et al., 2003).

A incorporação desses ácidos também foi descrita em trabalhos de biossíntese de norlignanas como (*Z*)-hinokiresinol encontrada em *Asparagus officinalis* (Suzuki et al., 2001) e agataresinol encontrada em *Cryptomeria japonica* e *Agathis australis* (Imai et al., 2006).

4.8.3. Análises da incorporação do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico.

As análises por CG-EM dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* incubadas com o ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico, mostrou a incorporação do precursor na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno (Figuras 4.26 e 4.27). Os percentuais de incorporação máximo de carbono treze proveniente do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico no 2,4,5-trimetoxi-estireno e na pellucidina A (Figura 4.28) foram de 9,6% e 7,9%, respectivamente.

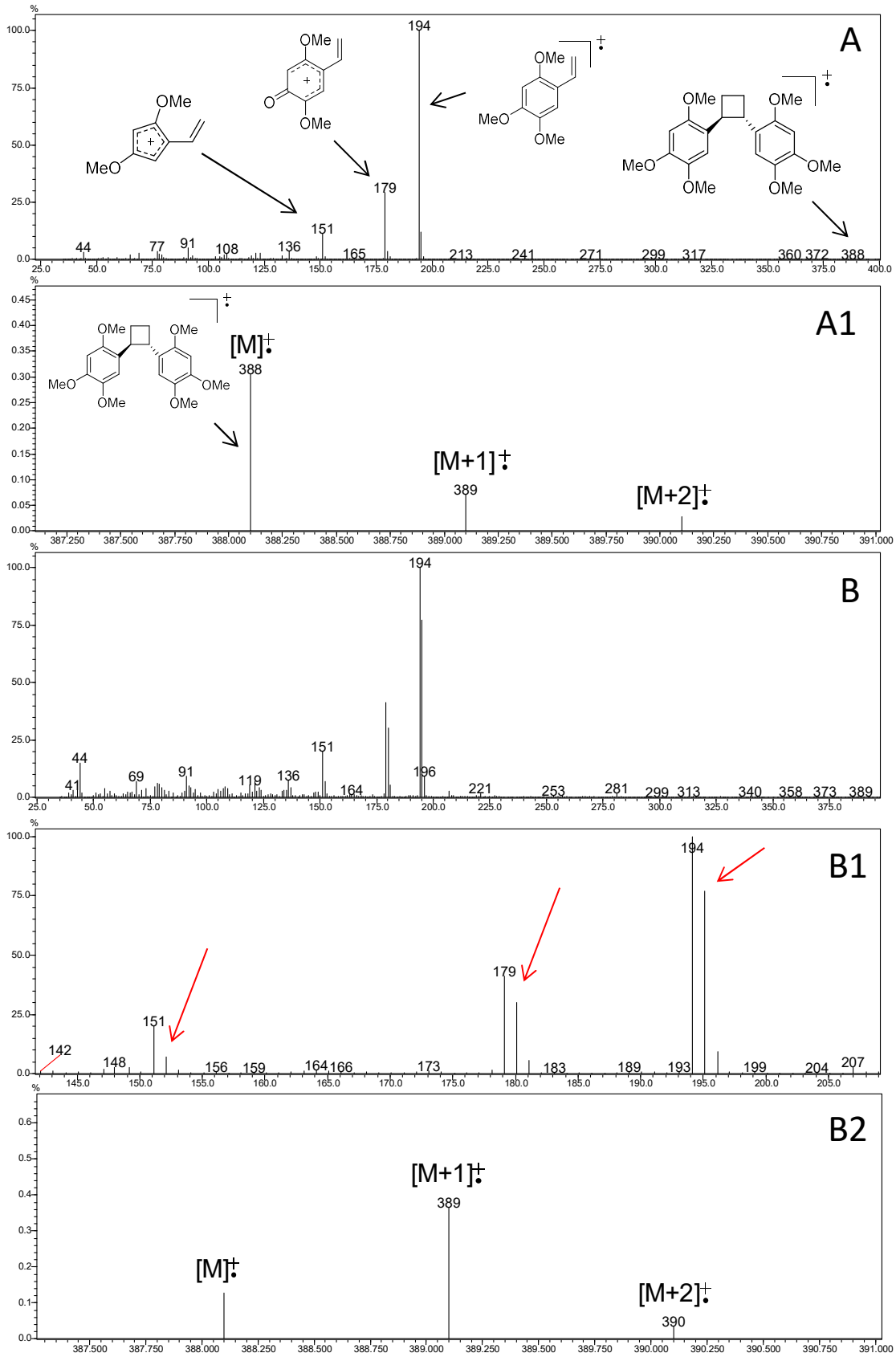


Figura 4.26. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (**A**); (**B**) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico; (**A1**) Ampliação de (**A**); (**B1**) e (**B2**) Ampliação de (**B**).

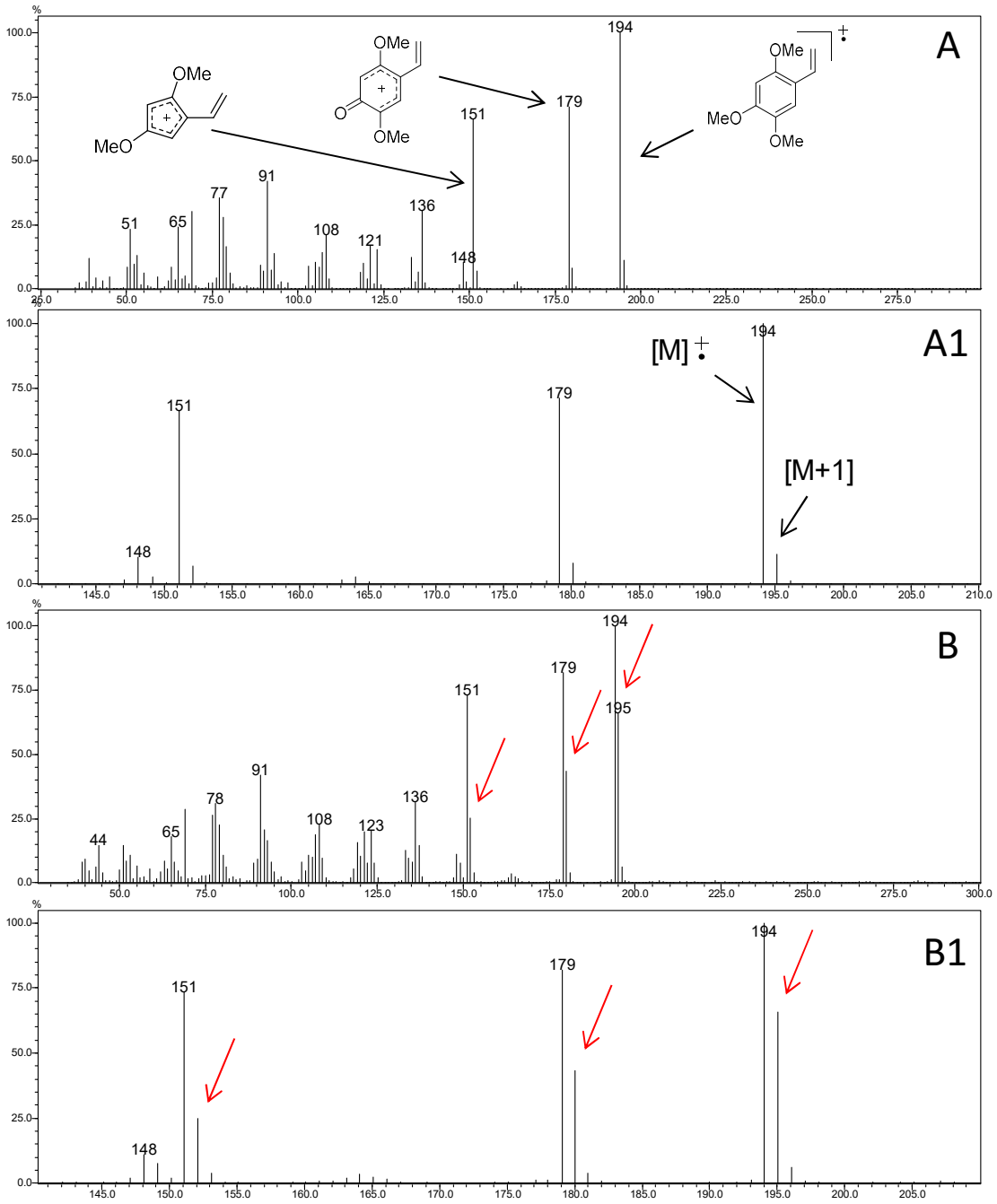


Figura 4.27. Espectro de massas (IE) do 2,4,5-trimetoxi-estireno com abundância natural (**A**); (**B**) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico; (**A1**) Ampliação de (**A**); (**B1**) Ampliação de (**B**).

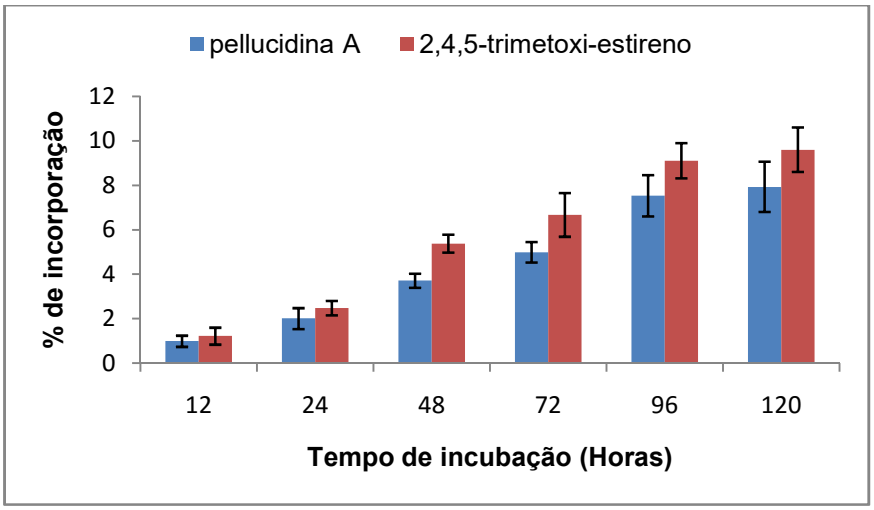
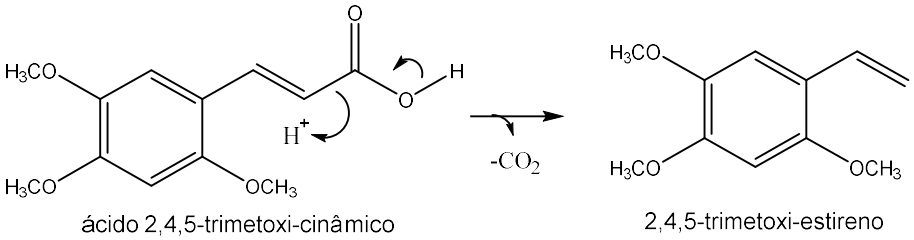


Figura 4.28. Incorporação do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico na pellucidina A e no 2,4,5-trimetoxi-estireno.

Estes resultados mostram o envolvimento do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico na biossíntese da pellucidina A, sendo o ácido primeiramente convertido a 2,4,5-trimetoxi-estireno através de uma etapa de descarboxilação. O 2,4,5-trimetoxi-estireno, por sua vez, pode dimerizar formando a pellucidina A (Esquema 4.6).



Esquema 4.6. Reação de descarboxilação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno.

4.8.4. Análises da incorporação do 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno

As análises por CG-EM dos extratos brutos das folhas de *P. pellucida* resultantes da incubação com o 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno, mostraram a incorporação do precursor na pellucidina A com um percentual máximo de incorporação de carbono treze de 13,3% (Figura 4.29 e 4.30).

Com esse resultado, podemos afirmar que a formação da pellucidina A tem como precursor direto o 2,4,5-trimetoxi-estireno. A formação da pellucidina A deve ocorre através de uma reação de dimerização entre duas unidades de 2,4,5-trimetoxi-estireno (Esquema 4.7).

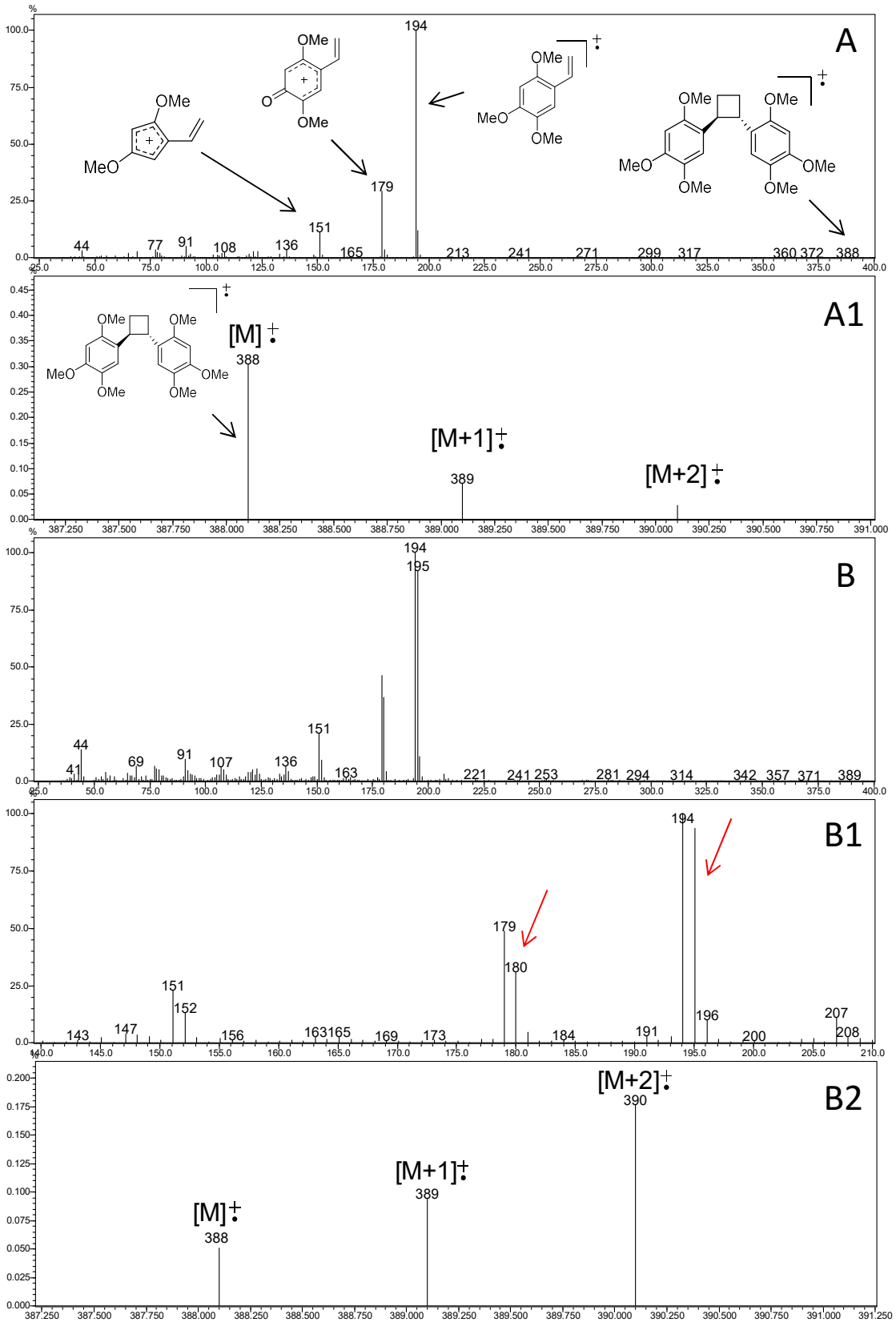


Figura 4.29. Espectro de massas (IE) da pellucidina A com abundância natural (**A**); (**B**) Incorporação ácido 2,4,5-trimetoxi-estireno; (**A1**) Ampliação de (**A**); (**B1**) e (**B2**) Ampliação de (**B**).

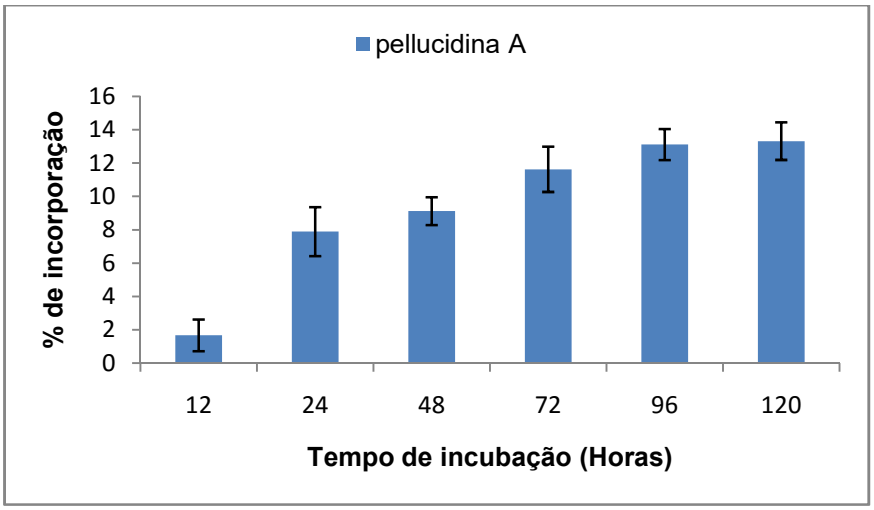
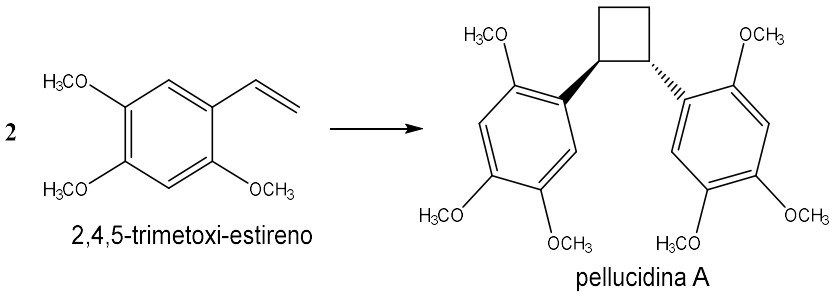


Figura 4.30. Incorporação da pellucidina A enriquecida com isotopômeros do 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno.

Esse resultado contraria a proposta biossintética para a pellucidina A publicado por Bayma e colaboradores (2000) que descarta a possibilidade de dimerização entre duas unidades de 2,4,5-trimetoxi-estireno por conta de impedimento estéricos provenientes das metoxilas nas posições 2/2' dos anéis aromáticos. Porém, como discutido anteriormente, a pellucidina A tem configuração *trans* no anel ciclobutânico, o que minimiza a repulsão entre as metoxilas nas posições 2/2'.



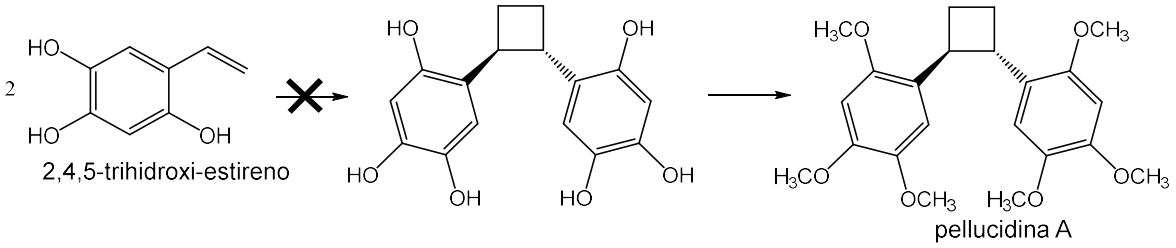
Esquema 4.7. Reação de dimerização do 2,4,5-trimetoxi-estireno formando a pellucidina A.

4.8.5. Análises da incorporação do 2,4,5-triidroxi-[8-^{13}C]-estireno

De acordo com a proposta biossintética de Bayma e colaboradores a incorporação do 2,4,5-triidroxi-[8-^{13}C]-estireno levaria a formação de um dímero ciclobutânico (*m/z* = 304,0), que seguido por uma série de metilações formaria a pellucidina A (Esquema 4.8).

Comparando-se os espectros de massas da pellucidina A e do 2,4,5-trimetoxi-estireno controle com aquelas resultantes das incubações, não foi observado nenhum aumento no percentual nas massas que indicariam a incorporação do 2,4,5-triidroxi-[8-

^{13}C]-estireno, além disso as análises de RMN ^{1}H e massas de alta resolução não mostraram a presença do dímero ciclobutânico proveniente de duas unidades de 2,4,5-triidroxi-estireno. Este resultado confirma que a formação da pellucidina A não deve ocorrer por meio da dimerização de duas unidades de 2,4,5-triidroxi-estireno através de acoplamento oxidativo (Bayma et al., 2000).

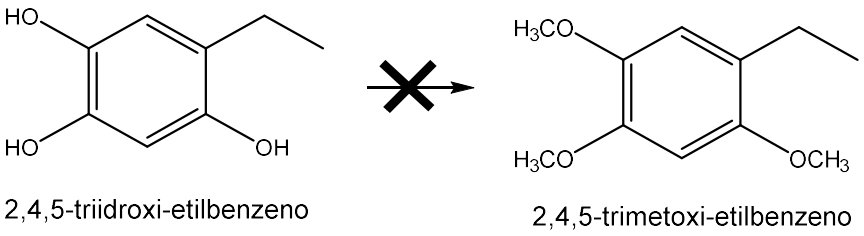


Esquema 4.8. Proposta biossintética para a formação da pellucidina A partindo do 2,4,5-triidroxi-estireno.

4.8.6. Análises da metilação do 2,4,5-triidroxi-etilbenzeno, 3,4-diidroxi-estireno e 4-hidroxi-estireno

Uma das etapas biossintéticas da pellucidina A proposta por Bayma e colaboradores é a ocorrência de sucessivas metilações nas hidroxilas fenólicas do 2,4,5-triidroxi-estireno, possível precursor da pellucidina A. Desta forma, foram avaliados nos experimentos de incorporação na *P. pellucida,* além do 2,4,5-triidroxi-[8-^{13}C]-estireno o 2,4,5-triidroxi-etilbenzeno (**E-3**), o 3,4-diidroxi-estireno (**E-11**) e o 4-hidroxi-estireno (**E-12**) com o objetivo de verificar a ocorrência de metilações em suas hidroxilas fenólicas (Esquema 4.9).

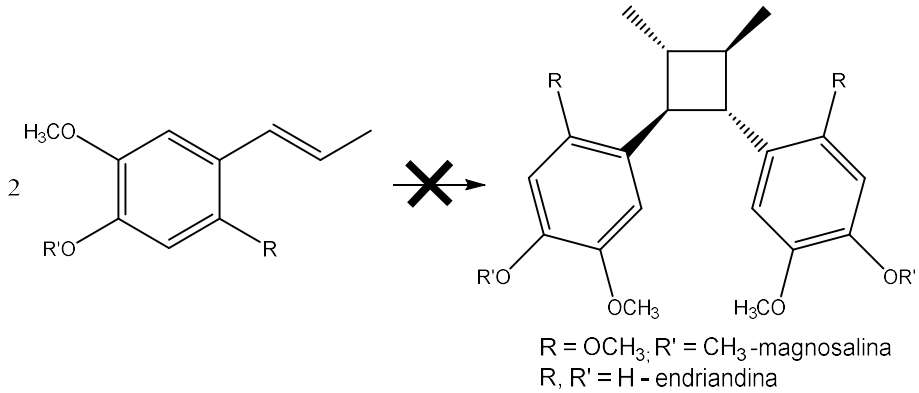
Os experimentos de incorporações dos compostos citados acima não revelaram nenhuma evidencia referente às metilações nas hidroxilas fenólicas de nenhum dos compostos análisados.



Esquema 4.9. Análise da incorporação do 2,4,5-triidroxi-etilbenzeno formando 2,4,5-trimetoxi-etilbenzeno.

4.8.7. Análises de incorporação da série de derivados do ácido cinâmico e estireno.

Além dos ácidos cinâmicos e estirenos utilizados nos experimentos de incorporação discutidos, outros ácidos cinâmicos (**A4**-**A16**) e estirenos (**E4**-**E18**) foram sintetizados (Tabelas 4.5 e 4.6) para serem usados nos experimentos de incorporação na *P. pellucida*. O objetivo seria verificar a especificidade da planta na produção do anel ciclobutânico da pellucidina A. Isto é, verificar a formação de diferentes compostos contendo anel ciclobutânicos pela *P. pellucida*, como por exemplo, a produção da endiandrina A ou magnosalina encontradas em *Endiandra anthropophagorum* e *Piper cubeba*, respectivamente (Badheka et al., 1987; Davis et al., 2007) (Esquema 4.10).



Esquema 4.10. Biossíntese de magnosalina e endiandrina A na *P. pellucida.*

As análises dos extratos por CG-EM da *P. pellucida* submetida à incubação com os diferentes derivados de ácido cinâmico e estirenos mostraram que com exceção aos ácidos cinâmicos e estirenos já discutidos a planta, não apresentaram a formação de nenhum outro composto contendo anel ciclobutânico. Este resultado mostra que a *P. pellucida* apresenta uma seletividade frente aos diferentes precursores testados.

4.9. Conversão enzimática

4.9.1. Experimentos de conversão enzimática com os precursores da pellucidina A.

Com o objetivo de se testar a conversão do 2,4,5-trimetoxi-estireno e do 2,4,5-triidroxi-estireno resultando na pellucidina A, tais substratos foram submetidos às

diversas condições com as frações enzimáticas da *P. pellucida* variando-se temperatura, pH e tempo de reação.

Os extratos resultantes dos ensaios com as frações enzimáticas da *P. pellucida* foram analisados por CLAE para verificar a capacidade de conversão dos possíveis precursores em pellucidina A. Porém, em nenhum dos experimentos foi verificado a formação da pellucidina A. Também foram testados os diferentes estirenos sintetizados, porém em nenhum dos casos, verificou-se a formação de nenhum dímero ciclobutânico.

Como nos experimentos de incorporação *in vivo* o ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico foi convertido na pellucidina A, foram conduzidos experimentos de conversão enzimática com o composto. A comparação das análises por CLAE do controle (extrato enzimático) (Figura 4.31), com as frações enzimáticas e os respectivos padrões permitiu identificar a conversão do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico em 2,4,5-trimetoxi-estireno como produto da conversão enzimática. Este resultado sugere a ocorrência de uma reação de descarboxilação por via enzimática do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico resultando no 2,4,5-trimetoxi-estireno (Esquema 4.11).

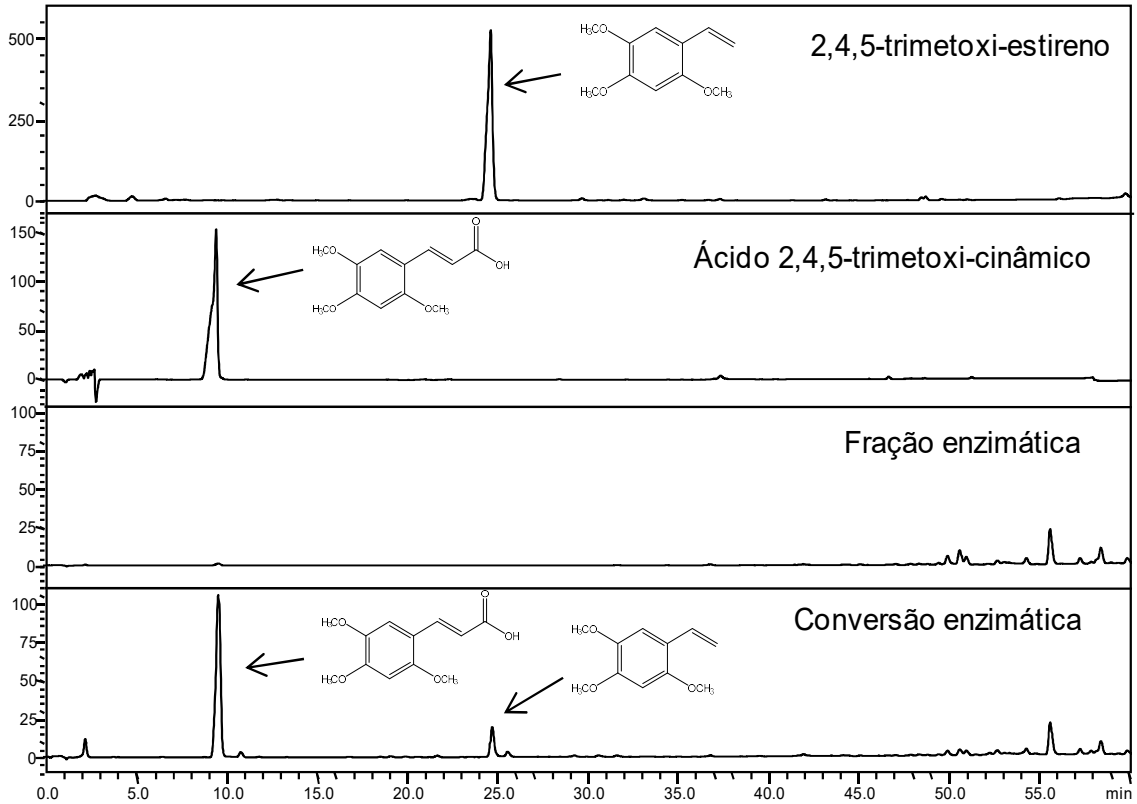
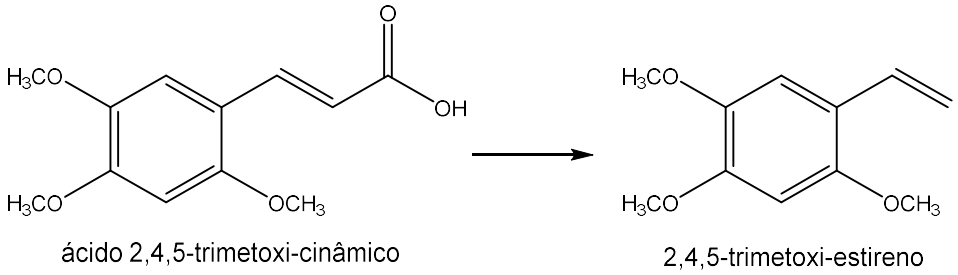


Figura 4.31. Análise por CLAE do 2,4,5-trimetoxi-estireno, ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, da amostra controle (extrato enzimático) reação de bioconversão do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico a 2,4,5-trimetoxi-estireno.



Esquema 4.11. Descarboxilação por via enzimática do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico formando o 2,4,5-trimetoxi-estireno.

Diante desse resultado foram realizados experimentos de conversão enzimática com os diferentes ácidos cinâmicos preparados no item 3.13.6 com o objetivo de se verificar a formação de seus respectivos estirenos. Com os experimentos de conversão enzimática dos diferentes ácidos cinâmicos verificou-se que além do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico apenas o ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico e o ácido 3,4-dimetoxi-cinâmico foram convertidos em seus respectivos estirenos.

O experimento nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos de reação mostrou que nos primeiros 30 minutos uma maior taxa de conversão dos ácidos cinâmicos e após esse tempo a formação dos produtos permanece praticamente constante até 120 minutos (Figura 4.32).

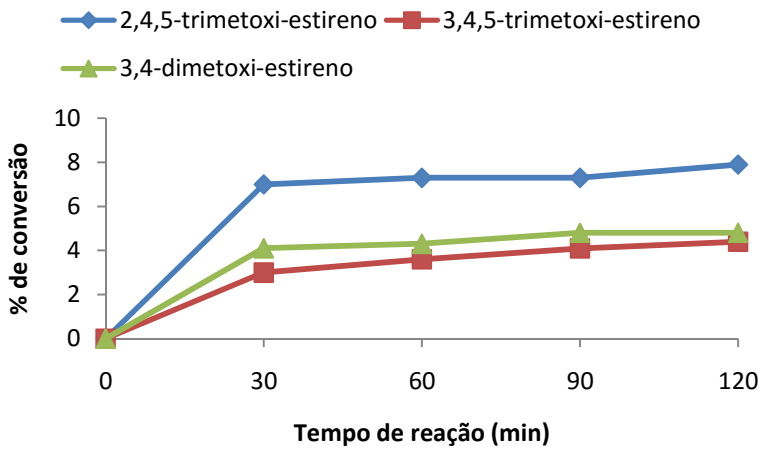


Figura 4.32. Cinética de reação dos estirenos formados durante a conversão enzimática.

Enzimas capazes de realizar reações de descarboxilação têm sido descritas, como é o caso da enzima ácido ferúlico descarboxilase encontrada em *Bacillus pumilus* e em *Enterobacter sp*. (Gu et al., 2011; Zago et al., 1995) bem como a enzima ácido *p*-cumárico descarboxilase purificada de *Lactobacillus plantarum* (Cavin et al., 1997). A presença dessas enzimas em plantas é relatada para espécies de

Catharanthus roseus, Nicotiana tabacum e *Daucus carota* (Takemoto and Achiwa, 1999). Também foi verificada a ação de descarboxilases na biossíntese das norlignanas (*E*)- e (*Z*)-hinokiresinol em *Asparagus officinalis,* onde na última etapa biossintética o 4-cumarato de 4-cumaroil sofre uma descarboxilação seguida da formação de uma ligação entre os carbonos C7-C8' formando o hinokiresinol (Suzuki et al., 2002; Suzuki and Umezawa, 2007).

4.10. SÍNTESE DA PELLUCIDINA A

Com o objetivo de verificar a relação entre a incidência de luz UV e a formação da pellucidina A em *P. pellucida*, como indicaram os resultados de estresse da planta com luz UV, o 2,4,5-trimetoxi-estireno foi submetido à luz UV para se avaliar a formação da pellucidina A.

O 2,4,5-trimetoxi-estireno foi irradiado com luz UV em acetona sob atmosfera inerte. O experimento também foi realizado utilizando-se como sensibilizadores a benzofenona (Torikai et al., 1983) e a 5,6,7-trimetoxi-flavona. Todas as reações foram acompanhadas por CCD e os produtos analisados por CG-EM.

Verificou-se que a irradiação do 2,4,5-trimetoxi-estireno sem sensibilizador produziu a pellucidina A com um rendimento de 0,89%. No entanto, os experimentos realizados utilizando-se como sensibilizadores a benzofenona e a 5,6,7-trimetoxi-flavona resultaram em um rendimento de 11,15% e 18,45%, respectivamente (Figura 4.33). Estes resultados indicam que a formação da pellucidina A em *P. pellucida* pode ocorrer através de uma via fotossintética sensibilizada pela 5,6,7-trimetoxi-flavona.

A reação fotoquímica da pellucidina A foi realizada utilizando-se transferência de elétrons fotoinduzida com sal tetrafluoroborato de 2,4,6-tri-(4-metoxi-fenil)-pirílio (Riener and Nicewicz, 2013). Além da pellucidina A (34%) outros ciclobutanos de ocorrencia natural como a magnosalina (50%) e endiandrina (59%) também foram obtidos através da mesma metodologia.

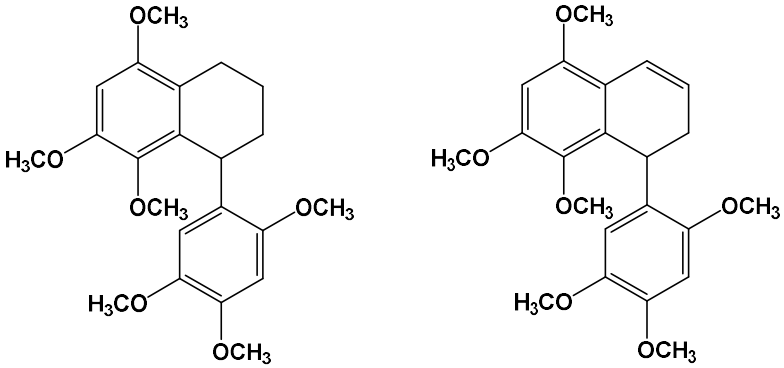
Figura 4.33. Perfil cromatográfico (CG-EM) das reações da pellucidina A. (**A**) reação sem sensibilizador, (**B**) reação com a 5,6,7-trimetoxi-flavona (**C**) reação com a benzofenona.

A síntese da pellucidina A sensibilizada com a benzofenona produziu além da pellucidna A, a pachipostaudina A (3) (23,65%) e a pachipostaudina B (4) (3,18%). A identificação desses compostos foi realizada através da comparação das massas obtidas com os dados da literatura (Ngadjui et al., 1989) (Figura 4.34 e 4.35; Esquema 4.12 e 4.13).

A pachipostaudina A e B são encontradas em formas racêmicas nos extratos da casca da *Pachypodathium staudtii* onde são descritas como produtos de uma reação de Diels-Alder por via não enzimática (Ngadjui et al., 1989). No mesmo trabalho os

autores sintetizaram a pachipostaudina A e B através de uma síntese térmica do 2,4,5-trimetoxiestireno. Neste caso os compostos foram obtidos apenas na forma de traços.

A dimerização de estireno também é relatada através de reação térmica a 130°C com um rendimento 7% para o composto contendo o anel ciclobutânico e de aproximadamente 70% para o análogo da pachipostaudina A (Mayo, 1967).



pachipostaudina A (3) pachipostaudina B (4)

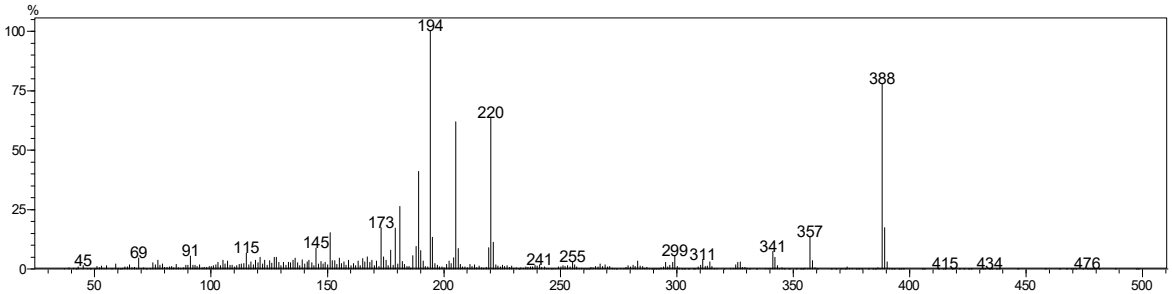


Figura 4.34. Espectro de massas (IE) da pachipostaudina A.

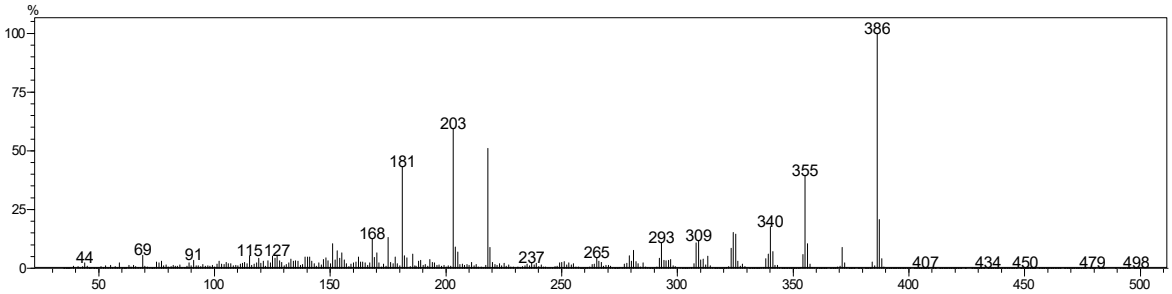
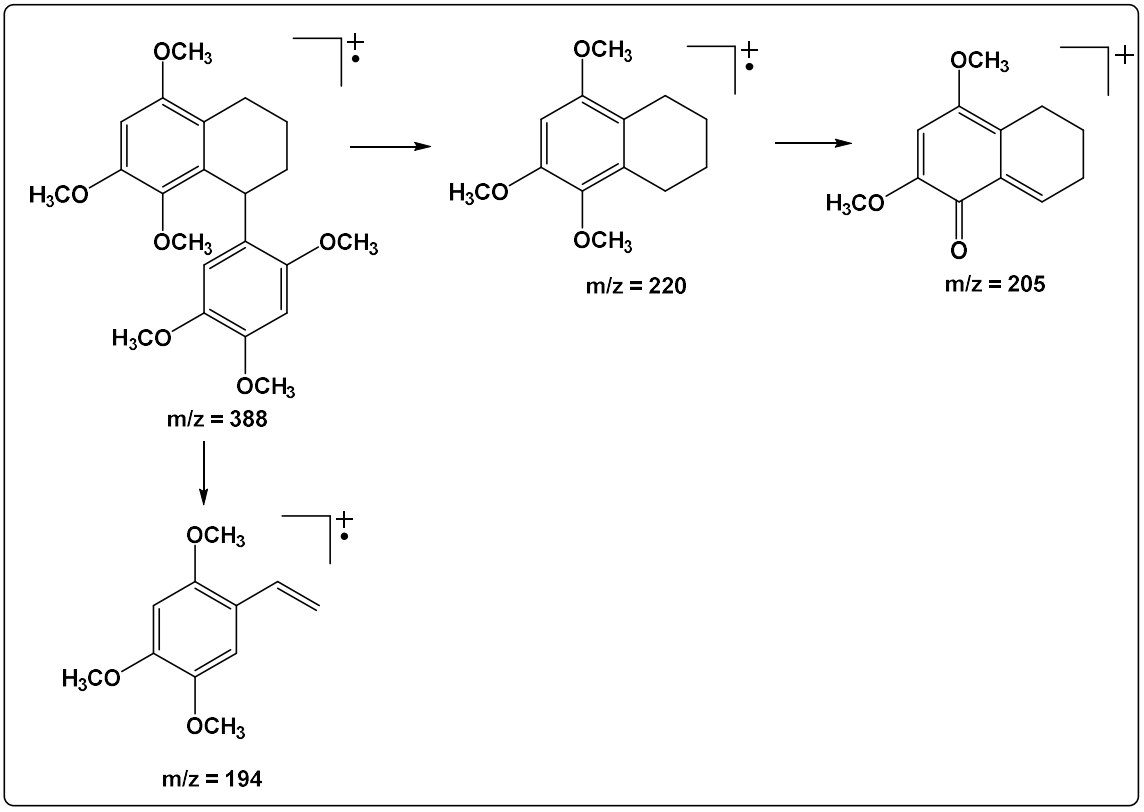
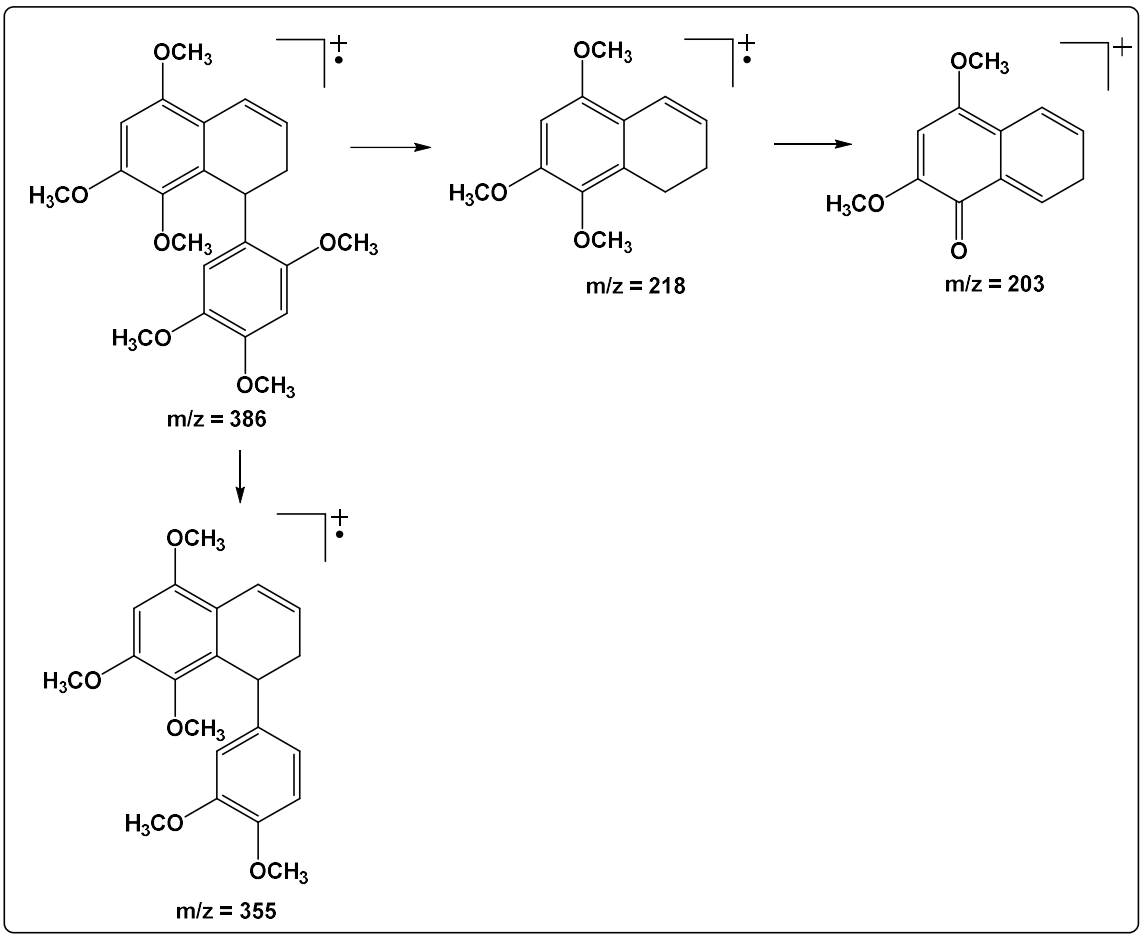


Figura 4.35. Espectro de massas (IE) da pachipostaudina B.



Esquema 4.12. Proposta de fragmentação no espectro de massas para a pachipostaudina A.



Esquema 4.13. Proposta de fragmentação no espectro de massas para a pachipostaudina B.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da *P. pellucida* cultivada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo permitiu a caracterização do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico, 5,6,7-trimetoxi-flavona, 2,4,5-trimetoxi-estireno, 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído, sesamina, dilapiol e pellucidina. Entre esses a 5,6,7-trimetoxi-flavona foi identificado como o constituinte majoritário nos extratos de todas as partes da planta. Com exceção da pellucidina A, o 2,4,5-trimetoxi-estireno e o dilapiol e as demais substâncias não haviam sido descritas para a espécie.

O estudo dos metabólitos secundários durante a ontogenia de *P. pellucida* apresentou uma diferenciação entre a fase de plântula que é constituída basicamente pela 5,6,7-trimetoxi-flavona e a fase adulta onde são encontrados os demais constituintes. Porém, em nenhuma fase de desenvolvimento da *P. pellucida* foi verificado um acúmulo expressivo da pellucidina A.

Os experimentos de estresse biótico e abiótico com a *P. pellucida* mostraram que a administração de ácido jasmônico induziu o aumento na produção do dilapiol, uma vez que o ácido jasmônico simula na planta sinais de predação estimulando assim a produção de metabólitos como o dilapiol que são responsáveis pela defesa da planta frente a herbívoros. Por outro lado a planta quando foi colocada sob condições de predação por *E. meditabunda, Monoplatus* sp. e Geometridae não apresentou nenhuma resposta. A literatura relata que a produção desses metabólitos responsáveis pela defesa da planta representa um custo energético e, por isso, as plantas apresentam um nível de resistência a predação.

Os experimentos em que a planta foi submetida a luz UV mostraram um aumento na produção da pellucidina A, sugerindo que sua produção na planta deve estar associada à absorção de luz e desta forma a pellucidina A pode ser um produto de uma reação de cicloadição [2+2].

Análises por espectrometria de massas detectaram o enriquecimento com carbono treze com o isotopômero de *L*-[2-^{13}C]-fenilalanina, ácido [8-^{13}C]-cinâmico e ácido [8-^{13}C]-ferúlico confirmando que a formação da pellucidina A é proveniente da via fenilpropanoídica. A investigação biossintética envolvendo um precursor de caráter mais especializado na via, mostrou a incorporação do ácido 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-cinâmico no 2,4,5-trimetoxi-[8-^{13}C]-estireno na pellucidina A. A incorporação do 2,4,5-trimetoxi-estireno mostrou que este é o precursor direto da pellucidina A (Figura 5.1).

Nos ensaios de conversão enzimática com o 2,4,5-trimetoxi-estireno não foi verificada a formação da pellucidina A. Porém, mostraram a descarboxilação do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico gerando o 2,4,5-trimetoxi-estireno.

Estes resultados indicam que a última etapa da formação da pellucidina A deve estar associada a uma reação de cicloadição do tipo [2+2] mediada pela absorção de luz UV na planta.

O 2,4,5-trimetoxi-estireno foi convertido de forma eficiente na pellucidina A na presença de agentes fotosensibilizadores como a 5,6,7-trimetoxi-flavona que co-ocorre na planta.

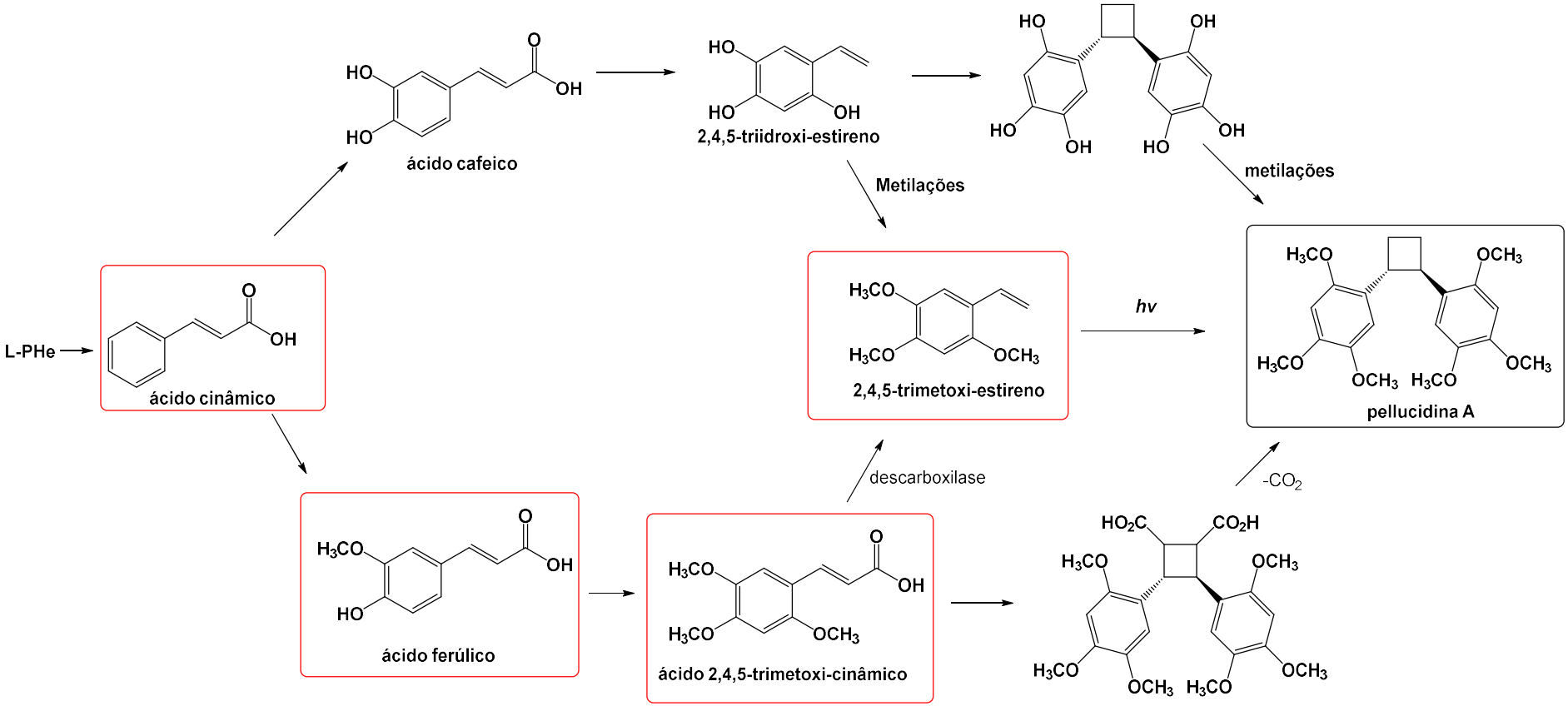


Figura 5.1. Proposta biossintética para a pellucidina A em *P. pellucida.* Precursores testados e incorporados na pellucidina A (vermelho).

6. REFERÊNCIAS

Adams, R. P., 2007. In Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois.

Albert, S., Horbach, R., Deising, H. B., Siewert, B., Csuk, R., 2011. Synthesis and antimicrobial activity of (*E*) stilbene derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry 19, 5155-5166.

Anterola, A. M., Lewis, N. G., 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. Phytochemistry 61, 221-294.

Aqil, M. K., I. Z., Ahmad, M. B., 1993. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. Scientist of Physical Sciences 5, 213-215.

Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L., 2003. Purification of Laboratory Chemicals

Arrigoni-Blank, M. D., Dmitrieva, E. G., Franzotti, E. M., Antoniolli, A. R., Andrade, M. R., Marchioro, M., 2004. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology 91, 215-218.

Avotinsh, F. M., 1993. Amino-acids of cyclobutane series. Uspekhi Khimii 62, 949-958.

Aziba, P. I., Adedeji, A., Ekor, M., Adeyemi, O., 2001. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. Fitoterapia 72, 57-58.

Babst, B. A., Ferrieri, R. A., Gray, D. W., Lerdau, M., Schlyer, D. J., Schueller, M., Thorpe, M. R., Orians, C. M., 2005. Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in Populus. New Phytologist 167, 63-72.

Bach, T., Hehn, J. P., 2011. Photochemical reactions as key steps in natural product synthesis. Angewandte Chemie-International Edition 50, 1000-1045.

Badheka, L. P., Prabhu, B. R., Mulchandani, N. B., 1987. Lignans from *Piper-cubeba*. Phytochemistry 26, 2033-2036.

Baker, M., 2011. Metabolomics: From small molecules to big ideas. Nature Methods 8, 117-121.

Baldwin, I. T., 1996. Methyl jasmonate-induced nicotine production in *Nicotiana attenuata*: Inducing defenses in the field without wounding. Entomologia Experimentalis Et Applicata 80, 213-220.

Baranowska, K. M., 2002. Truxillic and truxinic acids-occurrence in plant kingdom. Acta Pol Pharm 59, 403-410.

Barton, K. E., 2008. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. Oikos 117, 917-925.

Bassani, D. M., 2004. The dimerization of cinnamic acid derivatives. In: Horspool, W. M., Lenci, F. (Ed.), CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology, vol. 2, pp. 1-20.

Bastos, E. L., Ciscato, L., Baader, W. J., 2005. Microwave-assisted protection of phenols as tert-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers under solvent-free conditions. Synthetic Communications 35, 1501-1509.

Bayma, J. D., Arruda, M. S. P., Muller, A. H., Arruda, A. C., Canto, W. C., 2000. A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. Phytochemistry 55, 779-782.

Bierlleonhardt, B. A., Moreno, D. S., Schwarz, M., Fargerlund, J., Plimmer, J. R., 1981. Isolation, identification and synthesis of the sex-pheromone of the *citrus mealybug*, *planococcus-citri* (Risso). Tetrahedron Letters 22, 389-392.

Boege, K., Marquis, R. J., 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. Trends in Ecology & Evolution 20, 441-448.

Bojo, A. C., Garcia, E.A, Pocsidio, G.N., 1994. The antibacterial activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). Asia Life Sciences 3, 35-44.

Booth, D. C., Phillips, T. W., Claesson, A., Silverstein, R. M., Lanier, G. N., West, J. R., 1983. Aggregation pheromone components of 2 species of *pissodes-weevils* (coleoptera, curculionidae) - isolation, identification, and field activity. Journal of Chemical Ecology 9, 1-12.

Cavin, J. F., Barthelmebs, L., Divies, C., 1997. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. Applied and Environmental Microbiology 63, 1939-1944.

Chan, W.-H., 2014. Cytotoxic effects of dillapiole on embryonic development of mouse blastocysts *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Molecular Sciences 15, 10751-10765.

Cheng, M.-J., Chen, I.-S., 2008. Secondary metabolites from *Peperomia* sui. Journal of the Chilean Chemical Society 53, 1539-1542.

Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2014. Metabolomics: What you see is what you extract. Phytochemical Analysis 25, 289-290.

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; Organic Chemistry, Oxford: New York, 2007. 905p.

Collins, M. D., Wasmund, L. M., Bosland, P. W., 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using High Performance Liquid-Chromatography. Hortscience 30, 137-139.

Costa, R. M. A., Chigancas, V., Galhardo, R. D., Carvalho, H., Menck, C. F. M., 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie 85, 1083-1099.

Cox, D. G., Oh, J., Keasling, A., Colson, K. L., Hamann, M. T., 2014. The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1840, 3460-3474.

Croteau, R., Kutchan TmM. Lewis, N.G., 2000. Natural products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., G. W., Jones R. (Ed.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants Willey, Rockville, p. 2150.

Cuong, N. M., Taylor, W. C., Van Sung, T., 2001. A new cyclobutane lignan from *Cinnamomum balansae*. Natural Product Letters 15, 331-338.

da Silva A.M. 2008. Metabólitos secundários e ligninas de espécies de *Piper*. Instituto de Química – USP, Universdade de São Paulo, São Paulo, p. 125.

da Silva, M. H. L., Zoghbi, M. D. B., Andrade, E. H. A., Maia, J. G. S., 1999. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* Link var. circinnata. Flavour and Fragrance Journal 14, 312-314.

Danelutte, A. P., Cavalheiro, A. J., Kato, M. J., 2000. Lignoids in seedlings of *Virola sebifera*. Phytochemical Analysis 11, 383-386.

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., Wang, C. Z., Helms, G. L., Lewis, N. G., 2003. [C-13]-Specific labeling of 8-2' linked (-)-cis-blechnic, (-)-trans-blechnic and (-)-brainic acids in the fern *Blechnum spicant*. Phytochemistry 62, 501-511.

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, 362-366.

Davis, R. A., Carroll, A. R., Duffy, S., Avery, V. M., Guymer, G. P., Forster, P. I., Quinn, R. J., 2007. Endiandrin a, a potent glucocorticoid receptor binder isolated from the australian plant *Endiandra anthropophagorum*. Journal Natural Products 70, 1118-1121.

De Lira, P. N., da Silva, J. K., Andrade, E. H., Sousa, P. J., Silva, N. N., Maia, J. G., 2009. Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. Natural Products Communications 4, 427-430.

Dembitsky, V. M., 2008. Bioactive cyclobutane-containing alkaloids. Journal of Natural Medicines 62, 1-33.

Dembitsky, V. M., 2014. Naturally occurring bioactive cyclobutane-containing (CBC) alkaloids in fungi, fungal endophytes, and plants. Phytomedicine 21, 1559-1581.

Dewick, P. M., 2001. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Ltda, Chichester.

Dey, B., Mukherjee, P., Mondal, R. K., Chattopadhyay, A. P., Hauli, I., Mukhopadhyay, S. K., Fleck, M., 2014. Femtomolar level sensing of inorganic arsenic(III) in water and in living-systems using a non-toxic fluorescent probe. Chemical Communications 50, 15263-15266.

Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites 2, 303-336.

Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D. J., Parvathi, K., 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? Phytochemistry 57, 1069-1084.

Dixon, R. A. a. S. R. M. S., 2003. Biosynthesis of monolignols. Genomic and reverse genetic approaches. Phytochemistry Reviews 2, 289–306.

Dos Santos, P. R. D., Moreira, D. D., Guimaraes, E. F., Kaplan, M. A. C., 2001. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. Phytochemistry 58, 547-551.

Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R., Griffin, J. L., 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chemical Society Reviews 40, 387-426.

Dunn, W. B., Ellis, D. I., 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. Trac-Trends in Analytical Chemistry 24, 285-294.

Duportet, X., Aggio, R. B. M., Carneiro, S., Villas-Bôas, S. G., 2012. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. Metabolomics 8, 410-421.

Farina, A., Ferranti, C., Marra, C., Guiso, M., Norcia, G., 2007. Synthesis of hydroxystilbenes and their derivatives via Heck reaction. Natural Product Research 21, 564-573.

Felippe, L. G., Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Bolzani, V. d. S., Guimaraes, E. F., Cicarelli, R. M. B., Furlan, M., 2008. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. Phytochemistry 69, 445-450.

Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., Jr., Noe, J. P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiology and Biochemistry 46, 356-370.

Fiehn, O., 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology 48, 155-171.

Fonseca, F. N., Ferreira, A. J. S., Sartorelli, P., Lopes, N. P., Floh, E. I. S., Handro, W., Kato, M. J., 2000. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. Phytochemistry 55, 575-580.

Francke, W., 1986. Convergency and diversity in multicomponent insect pheromones. Advances in Invertebrate Reproduction 4, 327-336.

Francke, W., Bartels, J., Krohn, S., Schulz, S., Baader, E., Tengo, J., Schneider, D., 1989. Terpenoids from bark beetles, solitary bees and danaine butterflies. Pure and Applied Chemistry 61, 539-542.

François, T., Michel, J. D. P., Vyry, W. N. A., Fabrice, F. B., Lambert, S. M., Henri, A. Z. P., Chantal, M., 2013. Composition and antifungal properties of essential oils from five plants growing in the mountainous area of the west Cameroon. Journal of Essential Oil Bearing Plants 16, 679-688.

Fujimori, T., Kasuga, R., Kaneko, H., Sakamura, S., Noguchi, M., Furusaki, A., Hashiba, N., Matsumoto, T., 1978. Solanascone - novel sesquiterpene ketone from *Nicotiana tabacum* - X-ray structure determination of corresponding oxime. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 563-564.

Fukusaki, E., Kobayashi, A., 2005. Plant metabolomics: Potential for practical operation. Journal of Bioscience and Bioengineering 100, 347–354.

Gaia, A. M., Yamaguchi, L. F., Jeffrey, C. S., Kato, M. J., 2014. Age-dependent changes from allylphenol to prenylated benzoic acid production in *Piper gaudichaudianum* Kunth. Phytochemistry 106, 86-93.

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 now paradigm for lignin and lignan biosynthesis. Chemistry & Biology 6, 143-151.

Goldstone, D. C., Villas-Bôas, S. G., Till, M., Kelly, W. J., Attwood, G. T., Arcus, V. L., 2009. Structural and functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (Est E) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics 78, 1457-1469.

Gottlieb, O. R., 1978. Neolignans. Fortschr. Chem. Org. 35, 1-72.

Gottlieb, O. R., 1989. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. Phytochemistry 28, 2545-2558.

Govindachari, T. R., Kumari, G. N. K., Partho, P. D., 1998. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. Phytochemistry 49, 2129-2131.

Gu, W., Li, X., Huang, J., Duan, Y., Meng, Z., Zhang, K.-Q., Yang, J., 2011. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter* sp PX6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. Applied Microbiology and Biotechnology 89, 1797-1805.

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

Hanley, A. B., Russell, W. R., Chesson, A., 1993. Formation of substituted truxillic and truxinic acids in plant-cell walls - a rationale. Phytochemistry 33, 957-960.

Hao, E., Fromont, J., Jardine, D., Karuso, P., 2001. Natural products from sponges of the genus *Agelas* - on the trail of a [2+2]-photoaddition enzyme. Molecules 6, 130-141.

Haworth, R. D., 1936. Natural resins. Annual Reports on the Progress of Chemistry 33, 266-279.

Hedin, P. A., Dollar, D. A., Collins, J. K., Dubois, J. G., Mulder, P. G., Hedger, G. H., Smith, M. W., Eikenbary, R. D., 1997. Identification of male pecan weevil pheromone. Journal of Chemical Ecology 23, 965-977.

Hirai, M. Y., Sawada, Y., Kanaya, S., Kuromori, T., Kobayashi, M., Klausnitzer, R., Hanada, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Saito, K., Shinozaki, K., 2010. Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolic system: metabolic profiling of large-scale bioresources. Journal of Plant Research 123, 291-298.

Hoffmann, N., 2008. Photochemical reactions as key steps in organic synthesis. Chemical Reviews 108, 1052-1103.

Hong, Y. J., Tantillo, D. J., 2014. How cyclobutanes are assembled in nature - insights from quantum chemistry. Chemical Society Reviews 43, 5042-5050.

Imai, T., Nomura, M., Fukushima, K., 2006. Evidence for involvement of the phenylpropanoid pathway in the biosynthesis of the norlignan agatharesinol. Journal of Plant Physiology 163, 483-487.

Ivanisevic, J., Thomas, O. P., Lejeusne, C., Chevaldonne, P., Perez, T., 2011. Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among *Homoscleromorpha sponges*. Metabolomics 7, 289-304.

Jackson, D. E., Dewick, P. M., 1984. Biosynthesis of podophyllum lignans, cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum-hexandrum*. Phytochemistry 23, 1029-1035.

Jiao, W.H., Gao, H., Li, C.Y., Zhao, F., Jiang, R.W., Wang, Y., Zhou, G.X., Yao, X.S., 2010. Quassidines A-D, Bis-beta-carboline alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides*. Journal Natural Products 73, 167-171.

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

Katayama, T., Davin, L. B., Lewis, N. G., 1992. An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free-extracts of *Forsythia intermedia* - evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. Phytochemistry 31, 3875-3881.

Kato, M. J., Chu, A., Davin, L. B., Lewis, N. G., 1998. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. Phytochemistry 47, 583-591.

Kaul, R. B., 1997. The role of the multiple epidermis in foliar succulence of *Peperomia* (Piperaceae). Botanical Gazette 138, 213-218.

Khan, A., Rahman, M., Islam, M. S., 2008. Neuropharmacological effects of *Peperomia pellucida* leaves in mice. Daru-Journal of Faculty of Pharmacy 16, 35-40.

Khan, M. R., Omoloso, A. D., 2002. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. Fitoterapia 73, 251-254.

Kikuchi, T., Kadota, S., Yanada, K., Tanaka, K., Watanabe, K., Yoshizaki, M., Yokoi, T., Shingu, T., 1983. Isolation and structure of magnosalin and magnoshinin, new

neolignans from *Magnolia saliciforia*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 31, 1112-1114.

Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. Nature Protocols. 5, 536-549.

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.

Kumar, S. T. K., Pandey, G., 2014. Role of natural products in discovery of novel medicinal agents: A historical review. Journal of Applicable Chemistry 3, 209-227.

Lee-Ruff, E., Mladenova, G., 2003. Enantiomerically pure cyclobutane derivatives and their use in organic synthesis. Chemical Reviews 103, 1449-1483.

Li, Y.Z., Huang, J., Gong, Z., Tian, X.Q., 2007. A novel norlignan and a novel phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. Helvetica Chimica Acta 90, 2222-2226.

Li, Y.Z., Tong, A.-P., Huang, J., 2012. Two new norlignans and a new lignanamide from *Peperomia tetraphylla*. Chemistry & Biodiversity 9, 769-776.

Liu, J.Y., Li, N., Yang, J., Li, N., Qiu, H., Ai, D., Chiamvimonvat, N., Zhu, Y., Hammock, B. D., 2010. Metabolic profiling of murine plasma reveals an unexpected biomarker in rofecoxib-mediated cardiovascular events. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 17017-17022.

Liu, J., Shu, J., Zhang, R., Zhang, W., 2011. Two new pterosin dimers from *Pteris mutifida* Poir. Fitoterapia 82, 1181-1184.

Liu, R., Zhang, M., Wyche, T. P., Winston-McPherson, G. N., Bugni, T. S., Tang, W., 2012. Stereoselective preparation of cyclobutanes with four different substituents: total synthesis and structural revision of pipercyclobutanamide A and piperchabamide G. Angewandte Chemie-International Edition 51, 7503-7506.

Lopes, N. P., Yoshida, M., Kato, M. J., 2004. Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas 40, 53-57.

Lu, F. C., Ralph, J., Morreel, K., Messens, E., Boerjan, W., 2004. Preparation and relevance of a cross-coupling product between sinapyl alcohol and sinapyl p-hydroxybenzoate. Organic & Biomolecular Chemistry 2, 2888-2890.

Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A., DeArias, A. R., Inchausti, A., Yaluff, G., Fournet, A., 1996. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. Journal Natural Products 59, 694-697.

Majumder, P., 2011. Evaluation of pharmacognostic, phytochemical profile along with quantitative physicochemical standards on the root of the medicinal herb *Peperomia pellucida* (L.) HBK. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences 10, 1-4.

Malhotra, S., Koul, S. K., Taneja, S. C., Pushpangadan, P., Dhar, K. L., 1990. A neolignan from *Piper sumatranum*. Phytochemistry 29, 2733-2734.

Manalo, J. B., Han, B. H., Han, Y. N., Park, M. H., Anzaldo, F. E., 1983. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. Archives of Pharmacal Research 6, 133-136.

Manitto, P., Monti, D., Gramatic, P., 1974. Biosynthesis of anethole in *Pimpinella-anisum*-L Tetrahedron Letters, 1567-1568.

Mann, J., 1995. Chemical Aspects of Biosynthesis. New York.

Martins, R. C. C., 2002. Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). Instituto de Química, USP., Universidade de São Paulo, . Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 200.

Mbah, J. A., Ngemenya, M. N., Abawah, A. L., Babiaka, S. B., Nubed, L. N., Nyongbela, K. D., Lemuh, N. D., Efange, S. M. N., 2012. Bioassay-guided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 11.

McCracken, S. T., Kaiser, M., Boshoff, H. I., Boyd, P. D. W., Copp, B. R., 2012. Synthesis and antimalarial and antituberculosis activities of a series of natural and unnatural 4-methoxy-6-styryl-pyran-2-ones, dihydro analogues and photo-dimers. Bioorganic & Medicinal Chemistry 20, 1482-1493.

Mitra, A. K., De, A., Karchaudhuri, N., 1999. Application of microwave irradiation techniques for the syntheses of cinnamic acids by Doebner condensation. Synthetic Communications 29, 573-581.

Monache, F. D., Compagnone, R. S., 1996. A secolignan from Peperomia glabella. Phytochemistry 43, 1097-1098.

Moreira, D. L., de Souza, P. O., Kaplan, M. A. C., Guimaraes, E. F., 1999. Essential oil analysis of four *Peperomia* species (Piperaceae). In: Caffini, N., Bernath, J.,

Craker, L., Jatisatienr, A., Gilberti, G. (Eds.), Proceedings of the 2nd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants, pp. 65-69.

Moreno, D. S., 1972. Location of site of production of sex pheromone in yellow scale and California red scale *Homoptera-diaspididae*. Annals of the Entomological Society of America 65, 1283-&.

Moss, G. P., 2000. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). Pure and Applied Chemistry 72, 1493-1523.

Munoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Arrazola, S., Callapa, J., Ruiz, G., Choque, J., Deharo, E., 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach - Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Altenos Indians. Journal of Ethnopharmacology 71, 123-131.

Natarajan, A., Ramamurthy, V., 2005. Solvent-Free photosynthesis of cyclobutanes: photodimerization of crystalline olefins. In: Rappoport, Z. a., Liebman, J. F. (Eds.), The chemistry of cyclobutanes. John Wiley, Chichester, pp. 807-872.

Newman, D. J., Cragg, G. M., 2012. Natural Products as Sources of new Drugs over the period 1981-2010. Journal Natural Products 75, 311-335.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. Journal Natural Products 66, 1022-1037.

Ngadjui, B. T., David L., Ayafor, J. F., Sondengam, B. L., 1989. Pachypophyllin and Pachypostaudins a and b: three bisnorlignans from *Pachypodanthium staudtzi*. Phytochemistry 28, 231-234.

Nguyen, H. L., Nguyen Hoang, B., Kim, T.G., Yang, M.-S., 2010. Tissue culture and expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic *Peperomia pellucida*. Protein Expression and Purification 72, 82-86.

Nishiumi, S., Shinohara, M., Ikeda, A., Yoshie, T., Hatano, N., Kakuyama, S., Mizuno, S., Sanuki, T., Kutsumi, H., Fukusaki, E., Azuma, T., Takenawa, T., Yoshida, M., 2010. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. Metabolomics 6, 518-528.

Obata, T., Fernie, A. R., 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. Cellular and Molecular Life Sciences 69, 3225-3243.

Ogunwande, I. A., Ogunbinu, A. O., Flamini, G., Cioni, P. L., Okeniyi, S. O., 2009. Essential oil profiles of some Nigerian medicinal plants. Journal of Essential Oil Bearing Plants 12, 225-235.

Olabanji, S. O., Adebajo, A. C., Omobuwajo, O. R., Ceccato, D., Buoso, M. C., Moschini, G., 2014. PIXE analysis of some Nigerian anti-diabetic medicinal plants (II). Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms 318, 187-190.

Oloyede, G. K., 2010. Chemical composition, toxicity, antimicrobial and antioxiclant activities of the essential oil of *Peperomia pellucida* (Piperaceae) from Nigeria. The International Journal of Essential Oil Therapies 4, 143-148.

Ooi, D. J., Iqbal, S., Ismail, M., 2012. Proximate composition, nutritional attributes and mineral composition of *Peperomia pellucida* L. (Ketumpangan Air) grown in Malaysia. Molecules 17, 11139-11145.

Opitz, S., Nes, W. D., Gershenzon, J., 2014. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. Phytochemistry 98, 110-119.

Ortuno, R. M., Moglioni, A. G., Moltrasio, G. Y., 2005. Cyclobutane biomolecules: Synthetic approaches to amino acids, peptides and nucleosides. Current Organic Chemistry 9, 237-259.

Pan, Z., Ning, D., Wu, X., Huang, S., Li, D., Lv, S., 2015. New clerodane diterpenoids from the twigs and leaves of *Croton euryphyllus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 25, 1329-1332.

Pappachen, L. K., Chacko, A., 2013. *In-vitro* antioxidant activity and determination of total phenolic, flavonoid contents of *Peperomia Pellucida* Linn. American Journal of Pharmacy and Health Research. 1, 93-101.

Pearce, A. N., Chia, E. W., Berridge, M. V., Maas, E. W., Page, M. J., Harper, J. L., Webb, V. L., Copp, B. R., 2008. Orthidines A-E, tubastrine, 3,4-dimethoxyphenethyl-beta-guanidine, and 1,14-sperminedihomovanillamide: Potential anti-inflammatory alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium orthium* that act as inhibitors of neutrophil respiratory burst. Tetrahedron 64, 5748-5755.

Phillips, T. W., West, J. R., Foltz, J. L., Silverstein, R. M., Lanier, G. N., 1984. Aggregation pheromone of the *deodar weevil*, *Pissodes-nemorensis* (coleoptera, curculionidae) - isolation and activity of grandisol and grandisal. Journal of Chemical Ecology 10, 1417-1423.

Piao, S.-J., Song, Y.-L., Jiao, W.-H., Yang, F., Liu, X.-F., Chen, W.-S., Han, B.-N., Lin, H.-W., 2013. Hippolachnin A, a new antifungal polyketide from the South China sea sponge *Hippospongia lachne*. Organic Letters 15, 3526-3529.

Pichersky, E., Gang, D. R., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in Plant Science 5, 439-445.

Pinheiro, B. G., Silva, A. S. B., Souza, G. E. P., Figueiredo, J. G., Cunha, F. Q., Lahlou, S., da Silva, J. K. R., Maia, J. G. S., Sousa, P. J. C., 2011. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. Journal of Ethnopharmacology 138, 479-486.

Rahman, M. A., Katayama, T., Suzuki, T., Nakagawa, T., 2007. Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. elliptica I: isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood. Journal of Wood Science 53, 161-167.

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.

Rappoport, Z., Liebman, J.F, 2005. The Chemistry of Cyclobutanes. Chichester.

Regasa, C. Y., Dumato, M., Rideout, J. A., 1998. Antifungal compounds from *Peperomia pellucida*. ACGC Chemical Research Communications 7, 54-61.

Reigada, J. B., 2009. Bioprospecção em espécies de Piperaceae. Instituto de Química, vol. Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 133.

Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbothe, C., 1994. JIPS and RIPS - The regulation of plant gene-expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. Plant Cell 6, 1197-1209.

Riener, M., Nicewicz, D. A., 2013. Synthesis of cyclobutane lignans via an organic single electron oxidant-electron relay system. Chemical Science 4, 2625-2629.

Rojas-Martinez, R., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Arrieta-Baez, D., Magdiel Velazquez-Mendez, A., Elena Sanchez-Mendoza, M., Dillapiole, isolated from *Peperomia*

pellucida, shows gastroprotector activity against ethanol-induced gastric lesions in wistar rats. Molecules. 18, 11327-11337.

Roslida, A. H., Noor, A. Z., 2009. Evaluation of gastroprotective effects of the ethanolic extract of *Peperomia pellucida* (l) Kunth Pharmacology Online. 2, 678-686.

Salazar, K. J. M., Lago, J. H. G., Guimaraes, E. F., Kato, M. J., 2012. Meroterpenes from *Peperomia oreophila* Hensch and *Peperomia arifolia* Miq. Journal of the Brazilian Chemical Society 23, 782-785.

Salazar, K. J. M., Paredes, G. E. D., Lluncor, L. R., Young, M. C. M., Kato, M. J., 2005. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. Phytochemistry 66, 573-579.

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 280, 251-254.

Sato, K., Akai, S., Youda, H., Kojima, M., Sakuma, M., Inaba, S., Kurosawa, K., 2005. Practical synthesis of *D*-[1-C-13]mannose, *L*-[1-C-13] and *L*-[6-C-13]fucose. Tetrahedron Letters 46, 237-243.

Schripsema, J., 2009. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. Phytochemical Analysis 21, 14-21.

Seidel, V., Bailleul, F., Waterman, P. G., 2000. (Rel)-1 beta,2 alpha-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3 beta,4 alpha-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniothalamus gardneri* and *Goniothalamus thwaitesii*. Phytochemistry 55, 439-446.

Sergeiko, A. P., V.V., Hanus L.O., Dembitsky, V.M., 2008. Cyclobutane-containing alkaloids: origin, synthesis, and biological activities. The Open Medicinal chemistry Journal. 15, 26-37.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R., 2008. Metabolomics for plant stress response. Physiologia Plantarum 132, 199-208.

Simpson, C. J., Fitzhenry, M. J., Stamford, N. P. J., 2005. Preparation of vinylphenols from 2-and 4-hydroxybenzaldehydes. Tetrahedron Letters 46, 6893-6896.

Sinha, A. K., Sharma, A., Joshi, B. P., 2007. One-pot two-step synthesis of 4-vinylphenols from 4-hydroxy substituted benzaldehydes under microwave

irradiation: a new perspective on the classical Knoevenagel-Doebner reaction. Tetrahedron 63, 960-965.

Sinha, S., Dey, G., Kumar, S., Mathew, J., Mukherjee, T., Mukherjee, S., Ghosh, S., 2013. Cysteamine-based cell-permeable Zn2+ specific molecular bioimaging materials: from animal to plant cells. ACS Applied Materials & Interfaces 5, 11730-11740.

Sinha, S., Mukherjee, T., Mathew, J., Mukhopadhyay, S. K., Ghosh, S., 2014. Green-emissive molecular marker with a TRIS-scaffold for fluorescence imaging of Zn2+ in biological systems. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry 277, 75-81.

Smith, J. F., Stevens, A. C., Tepe, E. J., 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.

Susilawati, Y., Nugraha, R., Muhtadi, A., Soetardjo, S. and Supratman, U., 2015. (S)-2-Methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-6-(propan-2-ylidene)-3,4,6,7-tetrahydropyrano-[4,3-g]-chromen-9(2H)-one. Molbank 2, 1-6.

Sussa, F. V., Damatto, S. R., Alencar, M. M., Mazzilli, B. P., Silva, P. S. C., 2013. Natural radioactivity determination in samples of *Peperomia pellucida* commonly used as a medicinal herb. Journal of Environmental Radioactivity 116, 148-151.

Suzuki, S., Nakatsubo, T., Umezawa, T., Shimada, M., 2002. First *in vitro* norlignan formation with *Asparagus officinalis* enzyme preparation. Chemical Communications, 1088-1089.

Suzuki, S., Umezawa, T., 2007. Biosynthesis of lignans and norlignans. Journal of Wood Science 53, 273-284.

Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M., 2001. Norlignan biosynthesis in *Asparagus officinalis* L.: the norlignan originates from two non-identical phenylpropane units. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 3252-3257.

Takeda, R., Jiro, H., Masateru, S., 1990. The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, *Anthocerotae* (hornworts). Tetrahedron Letters 31, 4159–4162.

Takemoto, M., Achiwa, K., 1999. Synthesis of styrenes through the decarboxylation of trans-cinnamic acids by plant cell cultures. Tetrahedron Letters 40, 6595-6598.

Tan, J. J., Tan, C. H., Wang, Y. Q., Jiang, S. H. Z., D.Y., 2006. Lindleyanin and Berdapten-8-yl sulfate from *Pheurospermum Llindleyanum*. Helvetica chimica Acta 89, 117-121.

Tang, B., Simion, R., Paton, R. S., 2015. Thermal and photochemical mechanisms for cyclobutane formation in Bielschowskysin biosynthesis. Synlett 26, 501-507.

Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R., Duffey, S. S., 1996. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. Journal of Chemical Ecology 22, 1767-1781.

Torikai, A., Takeuchi, T., Fueki, K., 1983. Photodegradation of polystyrene and polystyrene containing benzophenone. Polymer Photochemistry 3, 307-320.

Tumlinson, J., Hardee, D. D., Gueldner, R. C., Thompson, A. C., Hedin, P. A., 1969. Sex pheromones produced by male *boll weevil* - isolation, identification, and synthesis. Science 166, 1010-&.

Umezawa, T., Yamamura, M., Nakatsubo, T., Suzuki, S., Hattori, T., 2011. Stereoselectivity of the biosynthesis of norlignans and related compounds. In: Gang, D. R. (Ed.), The Biological Activity of Phytochemicals, vol. 41. Springer, Pullman, pp. 179-195.

Unver, Y., Meydanal, S., Sancak, K., Unluer, D., Ustabas, R., Dugdu, E., 2011. Synthesis, crystal structure, and antioxidant properties of novel 1,2,4-triazol-5-ones containing 3,4-dimethoxyphenyl and 3,4-dihydroxyphenyl moiety. Turkish Journal of Chemistry 35, 265-277.

Valdebenito, H. A., Stuessy, T. F., Crawford, D. J., 1990. A new biogeographic connection between islands in the Atlantic and pacific oceans. Nature 347, 549-550.

Valero, Y. G., Yamaguchi, L. F., Moraes, M. M., Jeffrey, C. S., Kato, M. J. 2016. Natural products from *Peperomiai*: occurrence, biogenesis and bioactivity. Phytocemistry Reviews. Published online: 01 April. 1-25.

Vassao, 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.

Verma, R. S., Padalia, R. C., Goswami, P., Chauhan, A., 2014. Essential oil composition of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth from India. Journal of Essential Oil Research 27, 89-95.

Verpoorte, R., Choi, Y., Mustafa, N., Kim, H., 2008. Metabolomics: back to basics. Phytochemistry Reviews 7, 525-537.

Villas-Bôas, S. G., Gombert, A., 2006. Análise do metaboloma. Biotecnologia ciência e desenvolvimento ano IX 36, 58-69.

Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 24, 613-646.

Villas-Bôas, S. G., Moon, C. D., Noel, S., Hussein, H., Kelly, W. J., Cao, M., Lane, G. A., Cookson, A. L., Attwood, G. T., 2008. Phenotypic characterization of transposon-inserted mutants of *Clostridium proteoclasticum* B316 (T) using extracellular metabolomics. Journal of Biotechnology 134, 55-63.

Vogelmann, A. F., Turner, J. C., Mahlberg, P. G., 1988. Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of *Cannabis-sativa*. Journal Natural Products. 51, 1075-1079.

Wang, Q.-W., Yu, D.-H., Lin, M.-G., Zhao, M., Zhu, W.-J., Lu, Q., Li, G.-X., Wang, C., Yang, Y.-F., Qin, X.-M., Fang, C., Chen, H.-Z., Yang, G.-H., 2012. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. Molecules 17, 4474-4483.

Wang, Q., Terreaux, C., Marston, A., Tan, R. X., Hostettmann, K., 2000. Lignans from Mosla scabra. Phytochemistry 54, 909-912.

Wang, S. C., Tantillo, D. J., 2008. Prediction of a new pathway to presilphiperfolanol. Organic Letters 10, 4827-4830.

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.

Wanke, S., Samain, M. S., Vanderschaeve, L., Mathieu, G., Goetghebeur, P., Neinhuis, C., 2006. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the *trnK*/*matK* region (cpDNA). Plant Biology 8, 93-102.

Wightman, R. H., Staunton, J., Hanson, K. R., Battersb.Ar, 1972. Studies of enzyme-mediated reactions. 1. Syntheses of deuterium-labeled (3*S*)-phenylalanines and (3*R*)-phenylalanines - stereochemical course of elimination catalyzed byL-phenylalanine ammonia-lyase. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 2355-&.

Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64, 3-19.

Wolfender, J. L., Rudaz, S., Choi, H. Y., Kim, H. K., 2013. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. Current Medicinal Chemistry 20, 1056-1090.

Wondrak, G. T., Jacobson, M. K., Jacobson, E. L., 2006. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. Photochemical & Photobiological Sciences 5, 215-237.

Wu, J. L., Li, N., Hasegawa, T., Sakai, J., Kakuta, S., Tang, W. X., Oka, S., Kiuchi, M., Ogura, H., Kataoka, T., Tomida, A., Tsuruo, T., Ando, M., 2005. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. Journal Natural Products. 68, 1656-1660.

Wu, J. L., Li, N., Hasegawa, T., Sakai, J., Mitsui, T., Ogura, H., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Tomida, A., Turuo, T., Li, M. J., Tang, W. X., Ando, M., 2006. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. Journal Natural Products. 69, 790-794.

Xu, S., Li, N., Ning, M. M., Zhou, C. H., Yang, Q. R., Wang, M. W., 2006. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. Journal Natural Products 69, 247-250.

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., Guimaraes, 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, 2371-2380.

Yamamura, S., Niwa, M., Nonoyama, M., Terada, T., 1978. Three novel neolignans from *Heterotopia Takami*. Tetrahedron Letters 49, 4891-4894.

Zago, A., Degrassi, G., Bruschi, C. V., 1995. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia-coli* of the *Bacillus-pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase. Applied and Environmental Microbiology 61, 4484-4486.

Zhang, G.L., Li, N., Wang, Y.H., Zheng, Y.T., Zhang, Z., Wang, M.W., 2007. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. Journal Natural Products. 70, 662-664.

Zhang, Q. Y., Zhao, Y. Y., Wang, B., Tu, G. Z., 2003. New triterpenoid saponins from *Stelmatocrypton khasianum*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 51, 574-578.

Zhang, X.J., Li, L.Y., Wang, S.S., Que, S., Yang, W.Z., Zhang, F.Y., Gong, N.B., Cheng, W., Liang, H., Ye, M., Jia, Y.-X., Zhang, Q.Y., 2013. Oxyfadichalcones A-C: three chalcone dimers fused through a cyclobutane ring from Tibetan medicine *Oxytropis falcata* Bunge. Tetrahedron 69, 11074-11079.

Zhao, B. X., Ying, W., Li, C., Guo. C.W., Huang, X.-J., Fan, C.-L., Li, Q.-M., Zhu, H.J., Chen, W.M., Ye, W.C., 2013. Flueggedine, a novel axisymmetric indolizidine alkaloid dimer from *Flueggea virosa*. Tetrahedron Letters 54, 4708-4711.

Zhou, M., Zhang, H.B., Wang, W.G., Gong, N.B., Zhan, R., Li, X.N., Du, X., Li, L.M., Li, Y., Lu, Y., Pu, J.X., Sun, H.-D., 2013. Scopariusic acid, a new meroditerpenoid with a unique cyclobutane ring isolated from *Isodon scoparius*. Organic Letters 15, 4446-4449.

Zoghbi, M. G. B., Andrade, E. H. A., Lobato, R. C. L., Tavares, A. C. C., Souza, A. P. S., Conceicao, C. C. C., Guimaraes, E. F., 2005. *Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes. Biochemical Systematics and Ecology 33, 269-274.

7. ANEXOS

7.A: Espectros das substâncias isoladas

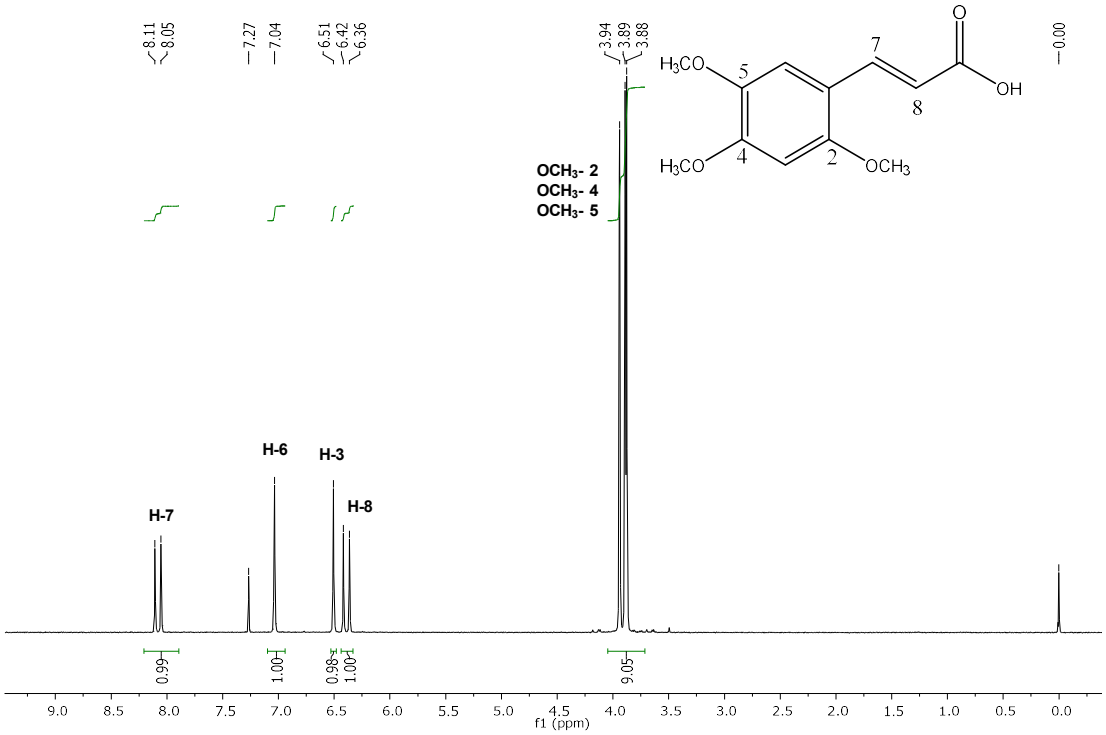


Figura 7A.1. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**).

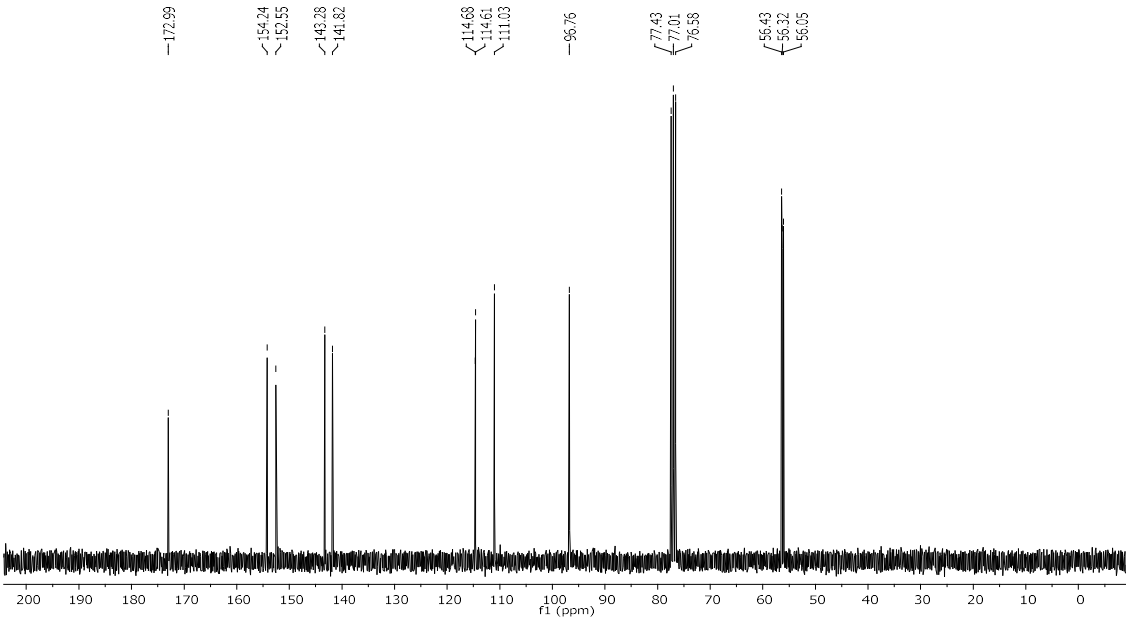


Figura 7A.2. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do ácido 2,4,5-trimetoxi-cinâmico (**1**).

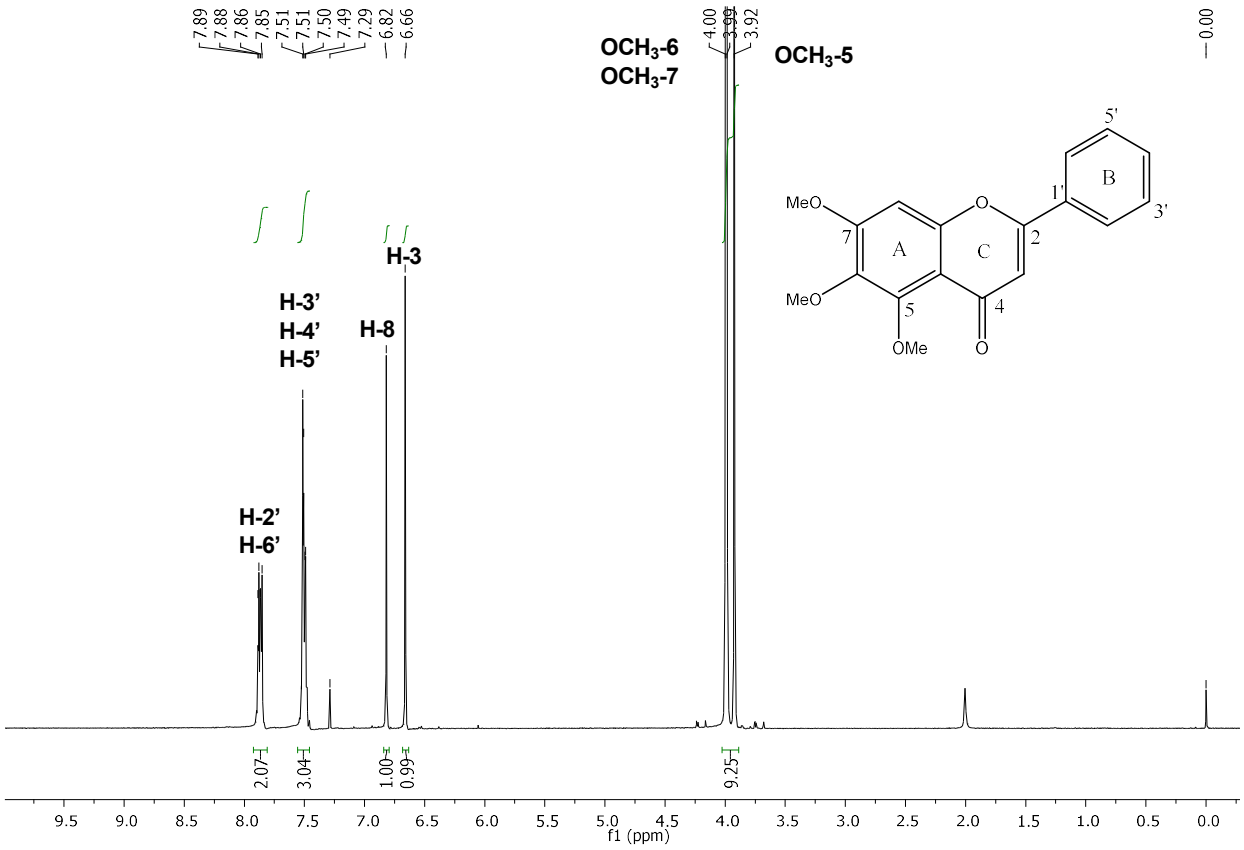


Figura 7A.3. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).

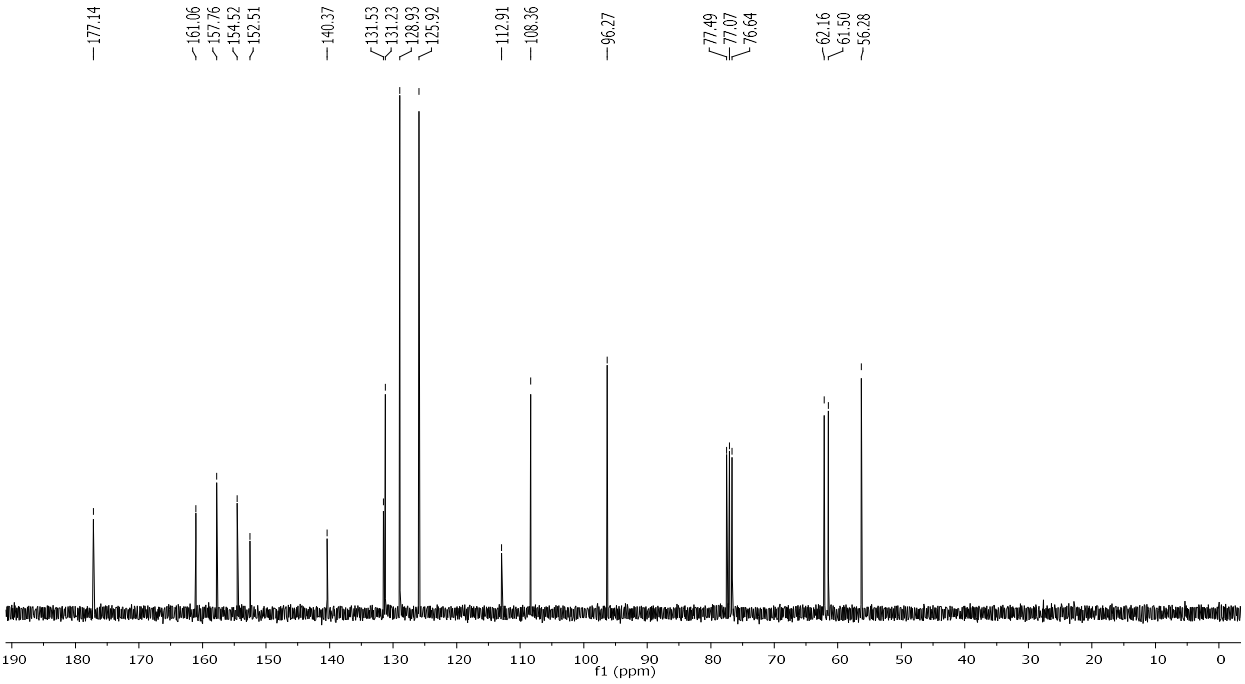


Figura 7A.4. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) da 5,6,7-trimetoxi-flavona (**2**).

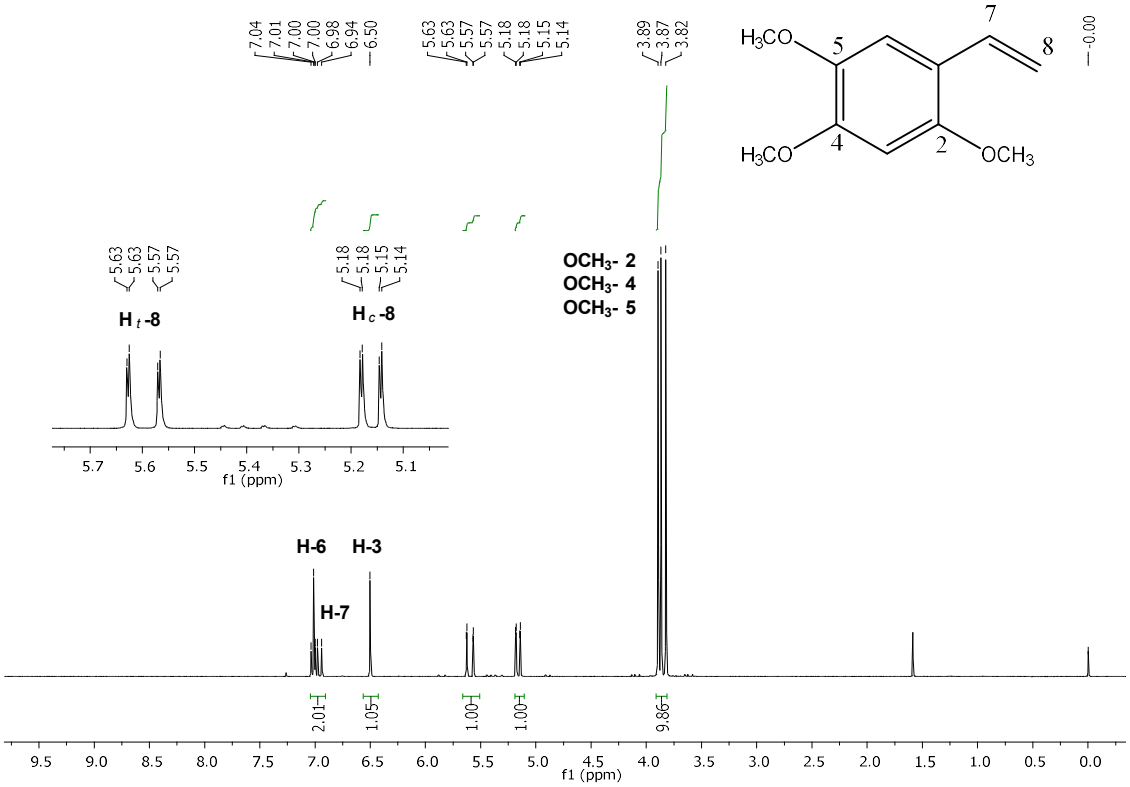


Figura 7A.5. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**).

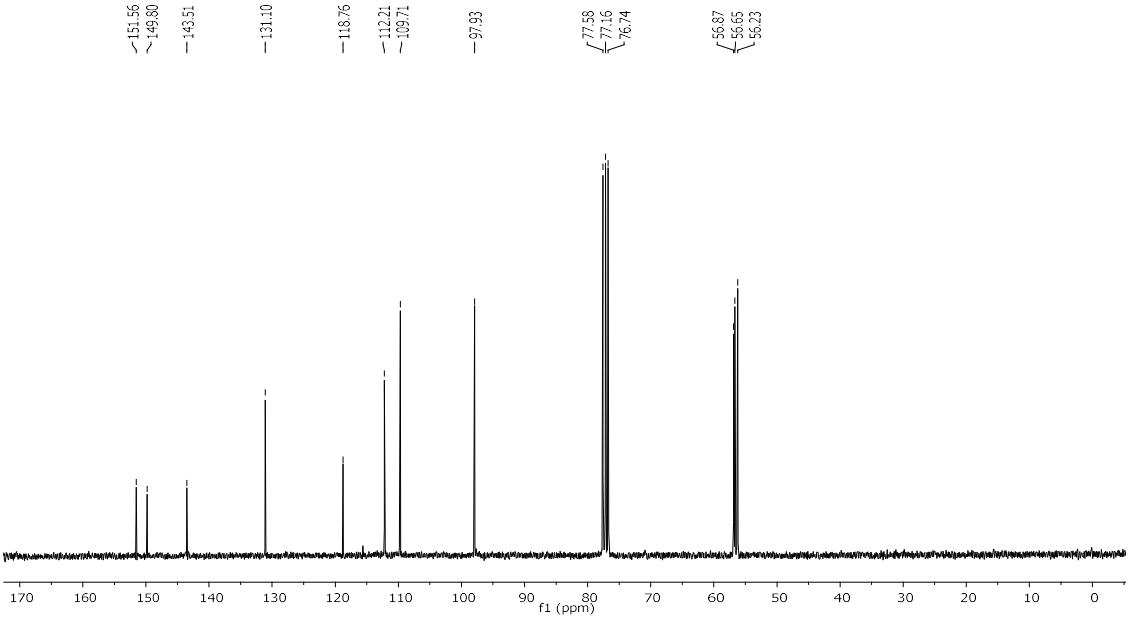


Figura 7A.6. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**3**).

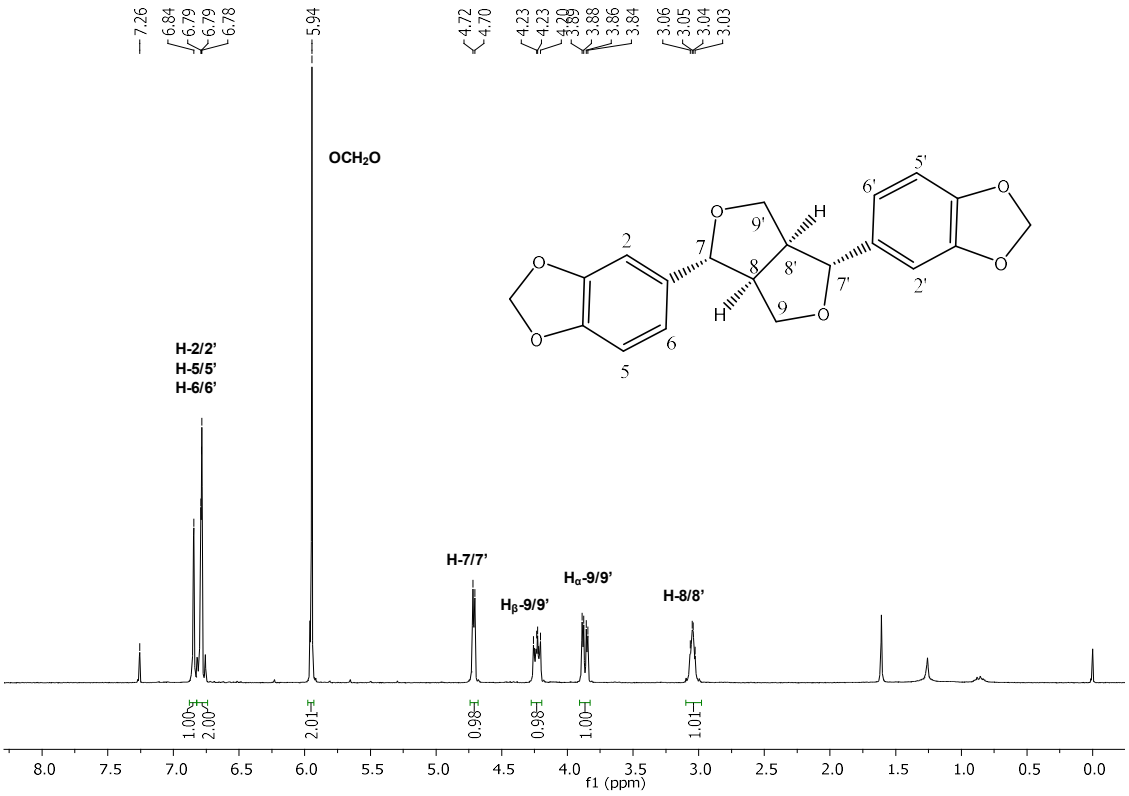


Figura 7A.7. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) da sesamina (**4**).

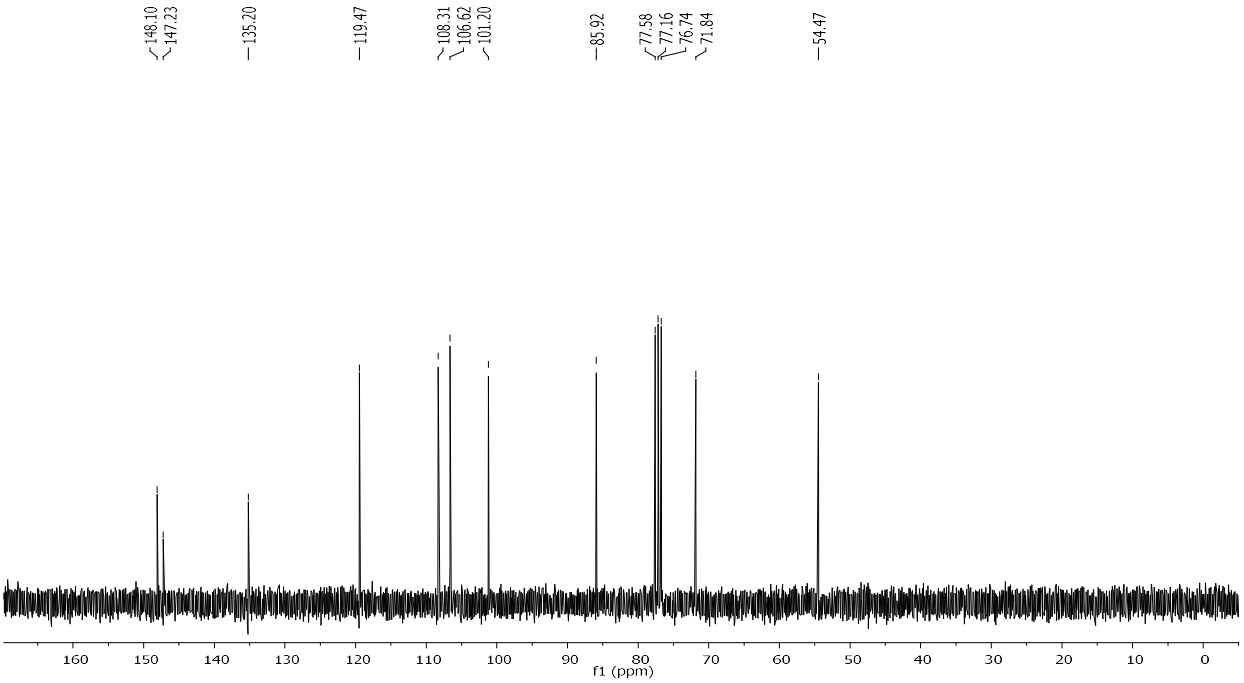


Figura 7A.8. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do sesamina (**4**).

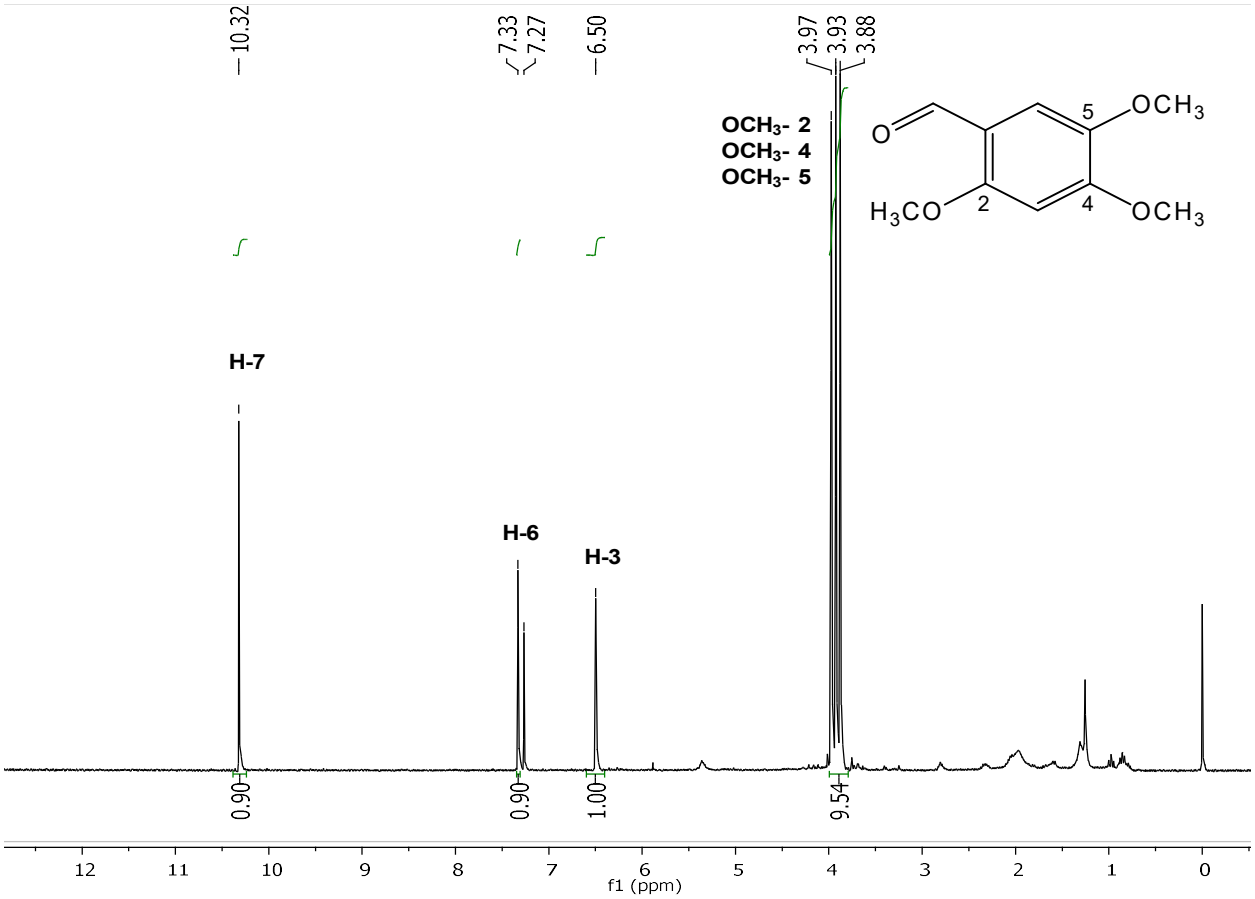


Figura 7A.9. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**).

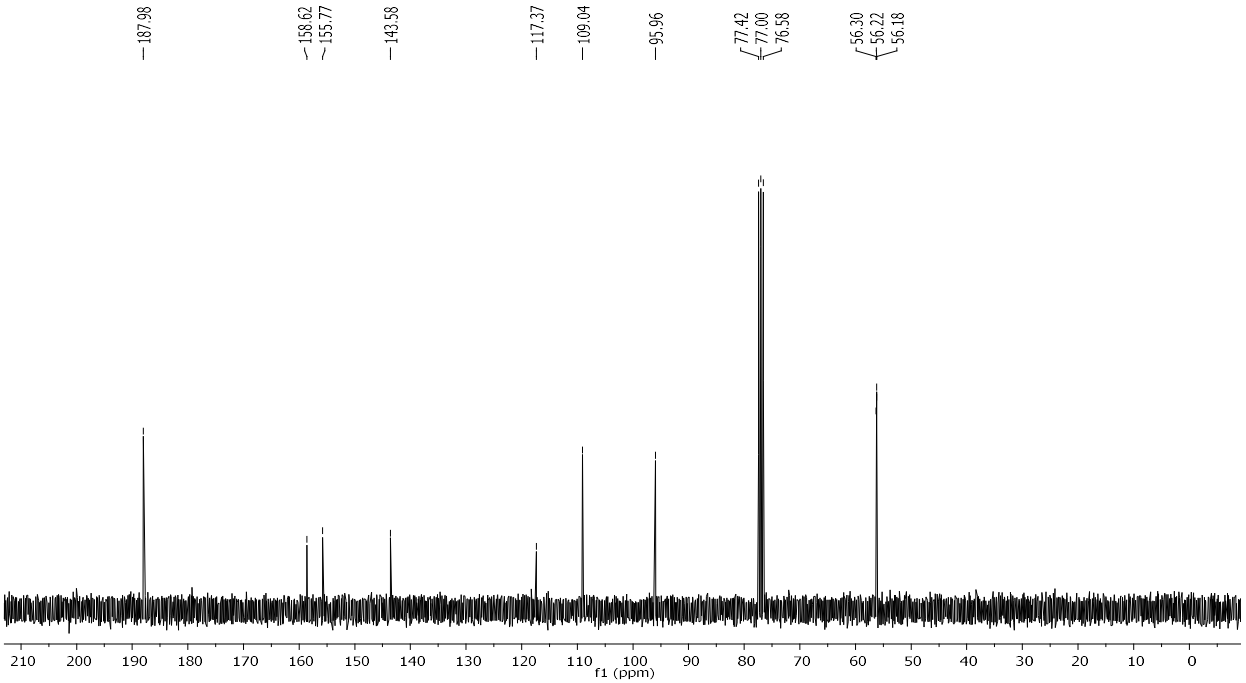


Figura 7A.10. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**5**).

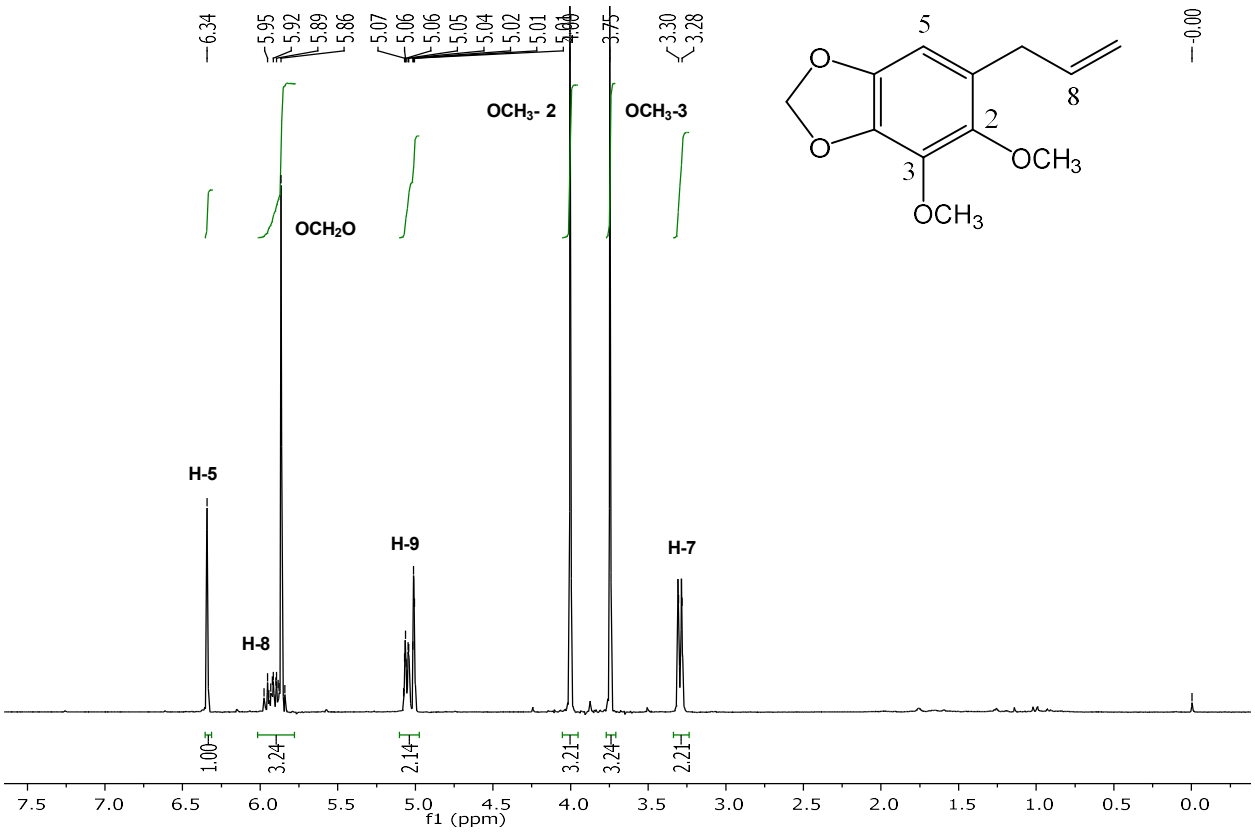


Figura 7A.11. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do dilapiol (**6**).

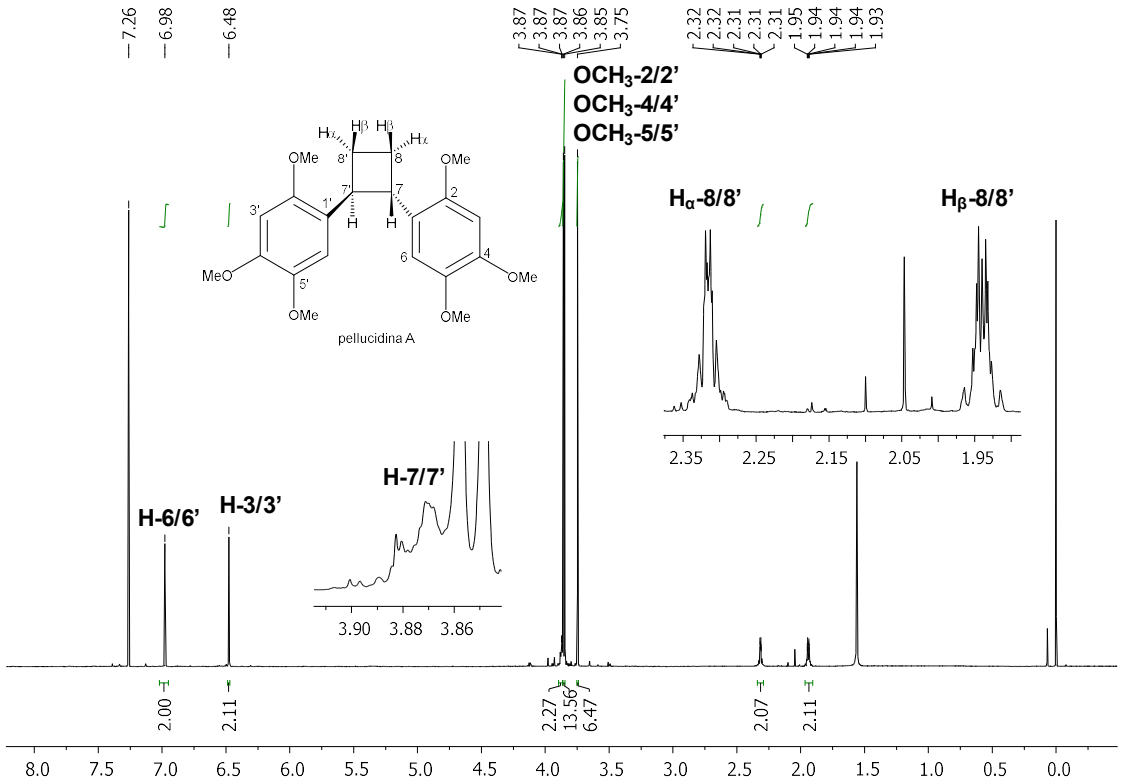


Figura 7A.12. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da pellucidina A (**7**).

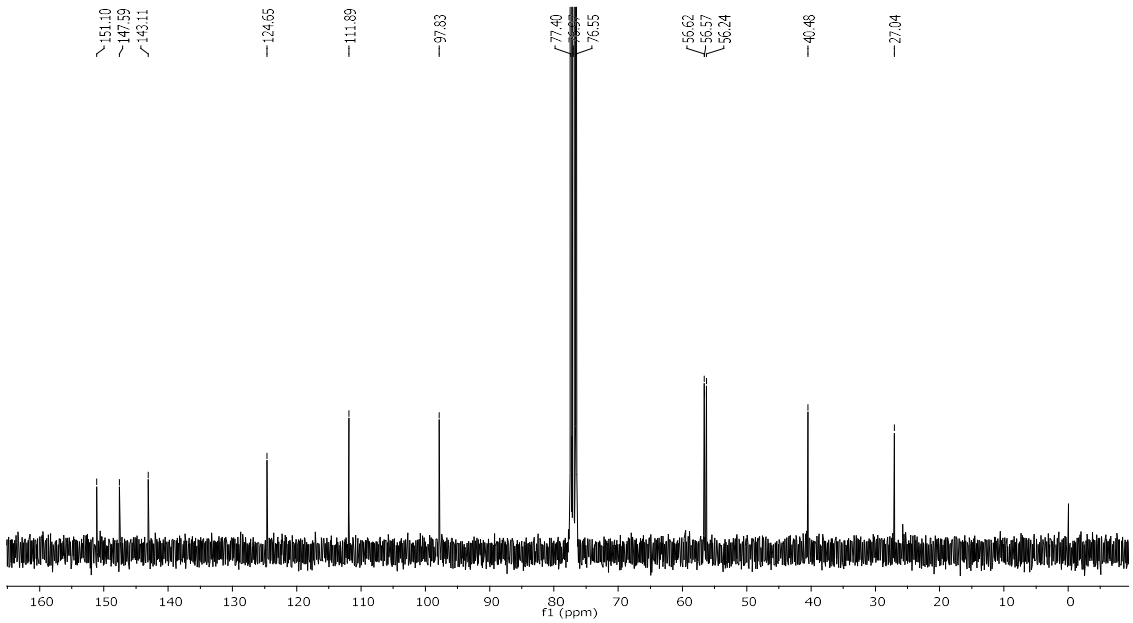


Figura 7A.13. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) da pellucidina A (**7**).